

ANTONI CANALDA SABATÉ

**DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER DETERMINAR
L'ACTIVITAT TIROSINASA AL MOST DE RAÏM; ESTUDI
D'INHIBIDORS DEL PARDEJAMENT ENZIMÀTIC
ALTERNATIUS AL DIÒXID DE SOFRE**

TREBALL FINAL DE MÀSTER

Dirigit per Fernando Zamora Marín

Màster en BEGUDES FERMENTADES

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
12 de Juny de 2024**

DESENVOLUPAMENT D'UN MÈTODE PER DETERMINAR L'ACTIVITAT TIROSINASA AL MOST DE RAÏM; ESTUDI D'INHIBIDORS DEL PARDEJAMENT ENZIMÀTIC ALTERNATIUS AL DIÒXID DE SOFRE

Antoni Canalda Sabaté

Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, Espanya

antoni.canalda@estudiants.urv.cat

Paraules clau: Most de raïm; Tirosinasa; Pardejament; Alternatives al SO₂; Glutatió; *Metschnikowia pulcherrima*

Aquest treball forma part del projecte *Desarrollo de nuevas herramientas para la bioprotección frente a la oxidación y la alteración por microorganismos en la elaboración del vino* (PID2022-139868OB-C33) finançat pel *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades* dins del Programa *Proyectos de generación de conocimiento y formación de investigadores predoctorales*.

Índex

1. Introducció	1
2. Materials i mètodes	6
2.1 Preparació del most	6
2.2 Clarificació del most	6
2.2.1 Clarificació del most amb carbó actiu	6
2.2.2 Clarificació del most amb PVPP	6
2.3 Mesura de l'activitat tirosinasa mitjançant el seguiment del pardejament del most.	7
2.4 Cinètica de pardejament degut a la tirosinasa en funció de substrat	7
2.5 Determinació de les constants cinètiques de la tirosinasa	8
2.6 Influència del pH sobre l'activitat tirosinasa	8
2.7 Influència de la temperatura sobre l'activitat tirosinasa	8
2.8 Influència de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa	9
2.9 Assajos d'inhibició de la tirosinasa	9
3. Resultats	10
3.1 Influència del tractament decolorant del most sobre l'activitat tirosinasa del most.	10
3.2 Cinètica de pardejament degut a la tirosinasa en funció del substrat	11
3.3 Influència del pH sobre l'activitat tirosinasa	13
3.4 Influència de la temperatura sobre l'activitat tirosinasa	15
3.5 Influència de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa	17
3.6 Assajos d'inhibició de la tirosinasa	18
3.6.1 Efecte del SO ₂ sobre l'activitat tirosinasa	19
3.6.2 Efecte del glutatió sobre l'activitat tirosinasa	21
3.6.3 Efecte de <i>Metschnikowia pulcherrima</i> sobre l'activitat tirosinasa	23
4. Conclusions	25
5. Bibliografia	27

Resum

L'oxidació enzimàtica és un dels majors problemes en l'enologia i una de les raons de l'ús del diòxid de sofre en vinificació. L'enzim polifenol oxidasa principal i present de forma natural en el raïm és la tirosinasa (EC 1.14.18.1). Aquest és capaç d'oxidar diferents fenols a quinones, que polimeritzen i formen pigments marrons, augmentant el color i el pardejament del most blanc. Per tal d'estudiar el pardejament enzimàtic del most, es va desenvolupar un mètode per mesurar l'activitat tirosinasa mitjançant la determinació de l'augment de l'absorbància a 420 nm en funció del temps. Per fer això, most procedent de raïm descongelat va ser decolorat amb PVPP i després enriquit amb diferents concentracions de diferents substrats de la tirosinasa (àcid caftàric, (-)-epicatequina, àcid gàl·lic i àcid p-hidroxibenzoic). Es van realitzar cinètiques de pardejament amb aquests diferents substrats, conclouent que l'àcid caftàric és el substrat que presenta major pardejament i afinitat. Es van realitzar cinètiques de pardejament amb diferents condicions i es va observar com el pardejament augmenta a mesura que augmenta la temperatura i el pH del medi, i disminueix en augmentar la concentració d'etanol. Per altra banda, es van realitzar cinètiques de pardejament addicionant inhibidors com el diòxid de sofre i alternatives a aquest, com el glutatió i el llevat no-*Saccharomyces Metschnikowia pulcherrima*. S'ha verificat que el diòxid de sofre té una inhibició notable sobre el pardejament i com augmenta aquesta inhibició en funció de la dosi. També s'ha vist com l'addició de glutatió al most presenta una reducció del pardejament i de la mateixa manera s'ha vist una bioprotecció per part de la *Metschnikowia pulcherrima*.

Abstract

Enzymatic oxidation is one of the major problems in enology and one of the reasons for the use of sulfur dioxide in winemaking. The main polyphenol oxidase enzyme naturally present in grapes is tyrosinase (EC 1.14.18.1). This enzyme is capable of oxidizing different phenols to quinones, which polymerize and form brown pigments, increasing the color and browning of the white must. To study the enzymatic browning of the must, a method was developed to measure tyrosinase activity by determining the increase in absorbance at 420 nm over time. For this purpose, must from frozen grapes was decolorized with PVPP and then enriched with different concentrations of various tyrosinase substrates (caftaric acid, (-)-epicatechin, gallic acid, and p-hydroxybenzoic acid). Browning kinetics were performed with these different substrates, concluding that caftaric acid is the substrate that exhibits the highest browning and affinity. Browning kinetics were conducted under different conditions, and it was observed that browning increases with higher temperature and pH levels, and decreases with higher ethanol concentrations. Additionally, browning kinetics were performed with the addition of inhibitors such as sulfur dioxide and alternatives to it, such as glutathione and the non-*Saccharomyces* yeast *Metschnikowia pulcherrima*. It has been verified that sulfur dioxide has a notable inhibition on browning and that this inhibition increases with the dose. It has also been observed that the addition of glutathione to the must results in a reduction of browning, and similarly, bioprotection by *Metschnikowia pulcherrima* has been noted.

1. Introducció

El pardejament enzimàtic degut a les polifenols oxidases és un dels majors problemes durant el procés de vinificació. Per una banda afecta a les propietats sensorials com és l'augment del color en els vins blancs, i per altra banda influeix en l'aroma, els sabors i comporta una disminució dels valors nutricionals del vi (Li et al., 2008). Durant el procés de trepitjat, premsat i altres mètodes de processament del raïm, l'oxigen entra en contacte amb el most, provocant l'oxidació enzimàtica de diferents substrats presents en el raïm com podrien ser els compostos fenòlics. Per que aquesta reacció es dugui a terme és necessari que els substrats (oxigen i els compostos fenòlics) i l'enzim hi siguin presents (du Toit et al., 2006), tot i que altres factors biològics (microorganismes), físics (pH) o químics (inhibidors o estimuladors) estan involucrats en les reaccions de pardejament (Macheix et al., 1991).

Els compostos fenòlics són substàncies formades per un o més grups hidroxils units a un o més anells de benzè. Es troben de forma natural als vegetals i fruites, incloent el raïm, i per tant també són presents en el most i el vi (Gutiérrez-Escobar et al., 2021). Els compostos fenòlics contribueixen en les diferents característiques organolèptiques del vi com són el color, el cos, l'estructura, el sabor i l'astringència (Kennedy, 2008). Alguns estudis han descrit els polifenols com a compostos anticancerígens i han establert que presenten beneficis per la salut degut al seu impacte en les malalties cardiovasculars, la diabetis, i la flora intestinal (Buljeta et al., 2023). En la taula 1 es mostra la classificació general dels compostos fenòlics.

Taula 1. Classificació dels compostos fenòlics. Adaptat de Clarke et al., 2023

	Flavanols	Llavor i pell del raïm
Flavonoids	Flavonols	Pell del raïm
	Antocians	Pell del raïm negre
No flavonoids	Àcids hidroxicinàmics	Polpa del raïm
	Àcids hidroxibenzoics	Llavor del raïm

Els vins negres tenen una concentració alta de polifenols (1-5 g/L), ja que durant gran part de la vinificació el most està en contacte amb les parts sòlides del raïm, extraient compostos de les pells i la llavor com són els antocians i els flavanols. En canvi, en el vi blanc la concentració de polifenols és més baixa (0,2 – 0,5 g/L) i aquests provenen

majoritàriament de la polpa com són els àcids fenols (Gutiérrez-Escobar et al., 2021), ja que en la majoria dels casos el contacte de les parts sòlides del raïm amb el most es dona durant poc temps i durant el procés de premsat (Hernanz et al., 2007). Aproximadament el 50% dels compostos fenòlics totals del vi blanc són àcids hidroxicinàmics com l'àcid caftàric, els quals són compostos fàcilment oxidables per l'acció de les polifenol oxidases com la tirosinasa o la lacasa. (Clarke et al., 2023). Amb un augment del temps de contacte del most amb la pell i les llavors del raïm s'extreuen altres compostos fenòlics i amb més quantitat (Cejudo-Bastante et al., 2011) com per exemple els àcids hidroxibenzoics, sent l'àcid gàl·lic el més comú en el vi blanc (Waterhouse, 2002). També s'extreuen flavonols, encarregats del color groc en el vi blanc, i flavanols monomers com l'(-)-epicatequina, que poden contribuir a l'amargor del vi (Kennedy et al., 2006; Lea et al., 1979).

L'enzim polifenol oxidasa més important que es troba de forma natural en el raïm és la tirosinasa (EC 1.14.18.1) en el cas dels raïms sans (du Toit et al., 2006; Oliveira et al., 2011) i es troba en el raïm a concentracions variables entre 40 i 400 mg/L depenent de la varietat de *Vitis vinífera* (Singleton, 1987). Un altre polifenol oxidasa és la lacasa (EC 1.10.3.2), que es troba en el cas dels raïms infectats pel fong *Botrytis cinerea* (Oliveira et al., 2011). Aquesta última, és més resistent al diòxid de sofre i és capaç d'oxidar un nombre més elevat de compostos fenòlics (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Els àcids hidroxicinàmics com l'àcid caftàric són els principals substrats de la tirosinasa i per tant els principals causants del pardejament enzimàtic (Singleton et al., 1985). La reacció enzimàtica no s'inicia fins al trencament del raïm (Queiroz et al., 2008) ja que, quan el raïm està sencer els àcids hidroxicinàmics estan presents a la vacuola i per tant, no estan en contacte amb la tirosinasa, allotjada al citoplasma (Li et al., 2008; Queiroz et al., 2008).

Les polifenol oxidases utilitzen l'oxigen molecular per oxidar els substrats (Claus, 2010). Tal com es mostra en la Figura 1, l'àcid caftàric és oxidat per la tirosinasa i produeix quinones (Li et al., 2008). Aquestes quinones i els seus derivats són polimeritzats fins crear melanines, les quals són pigments de coloració marró sent les causants del pardejament del most (Peñalver et al., 2005).

La forma més usual de protegir el most envers l'oxidació és l'addició de diòxid de sofre (SO₂), ja que presenta activitat antioxidant i antioxidàsica així com també activitat antimicrobiana (Ribéreau-Gayon et al., 2000). Tot i els avantatges de la utilització del SO₂, s'ha descrit que pot actuar com al·lèrgen per alguns consumidors (Vally et al.,

2009) sent així de gran interès actual la cerca d'alternatives al diòxid de sofre en vinificació (Santos et al., 2012).

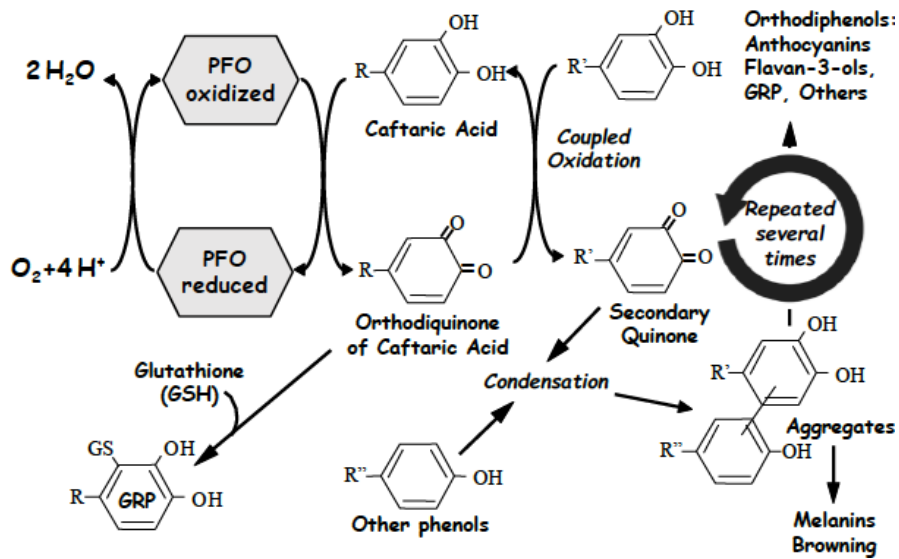


Figura 1. Mecanisme de l'oxidació enzimàtica i producció de GRP (Giménez Gil, 2023)

Per aquesta raó, s'han proposat alguns altres additius com a alternatives al diòxid de sofre per evitar el pardejament del most, com l'àcid ascòrbic (Ribéreau-Gayon et al., 2006), els gasos inerts (Martinez & Whitaker, 1995), els tanins enològics (Vignault et al., 2019) i, més recentment, l'ús de glutatió reduït (Bustamante, et al., 2024b; Giménez et al., 2022; Kritzing et al., 2013) o llevats secs inactivats rics en glutatió (Bahut et al., 2020; Bustamante et al., 2024b; Gabrielli et al., 2017) i la bioprotecció (Bustamante, et al., 2024a; Chacon-Rodriguez et al., 2020; Giménez et al., 2023; Simonin et al., 2022; Windholtz et al., 2023)

L'àcid ascòrbic es va definir com una alternativa del SO_2 i ha sigut utilitzat com antioxidant en el vi, especialment en el blanc, principalment pel seu caràcter reductor i per la capacitat d'absorció d'oxigen (Bradshaw et al., 2001). No obstant, s'ha descrit que l'àcid ascòrbic retarda el pardejament però acaba incrementant-lo. Aquest fenomen és atribuït a la reacció de l'àcid ascòrbic amb l'oxigen molecular formant peròxid d'hidrogen, el qual pot provocar oxidacions addicionals (Peng et al., 1998). Per tant, l'addició d'àcid ascòrbic sempre ha d'anar acompanyada de SO_2 per evitar l'oxidació (Barril et al., 2016; Bradshaw et al., 2001; Peng et al., 1998).

L'ús de gasos inerts minimitza la presència d'oxigen, eliminant un dels substrats de les polifenol oxidases i evitant l'oxidació i per tant el pardejament enzimàtic (du Toit et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2006).

També s'ha demostrat que els tanins enològics són inhibidors efectius de l'activitat lacasa (Vignault et al., 2019; Vignault et al., 2020). A més a més, s'ha comprovat que els tanins enològics consumeixen oxigen (Vignault et al., 2018). En conseqüència, quan els mosts i els vins es complementen amb tanins enològics, aquests exerceixen un efecte protector sobre el color del vi.

Una altra alternativa és el glutatió. El glutatió és un tripèptid format per L-glutamat, L-cisteïna i glicina (Anderson, 1998). És present naturalment en el raïm, depenent de la varietat es troba en concentracions d'entre 17 mg/kg i 114 mg/kg (Cheynier et al., 1989) i per tant, és present en el most. La concentració de glutatió en el most depèn de diferents factors com l'exposició a l'oxigen, l'activitat tirosinasa, la maceració pel·licular i el procés de premsat (Patel et al., 2010). En els últims anys, el glutatió ha anat agafant interès en l'indústria vitivinícola, principalment per la seva capacitat de controlar el pardejament del vi (Kritzinger et al., 2013) així com també s'ha vist un efecte protector sobre diferents compostos aromàtics presents en el vi (Ugliano et al., 2011). Per aquesta raó, s'han provat suplementacions de glutatió o llevats inactius rics amb glutatió en el most (Bustamante et al., 2024b) per protegir el most del pardejament. Tal com es pot observar en la Figura 1, quan un substrat és oxidat per la tirosinasa i es forma la corresponent quinona, el glutatió ràpidament reacciona amb aquesta quinona formant l'anomenat *Grape Reaction Product* (GRP), un compost incolor, limitant així el pardejament del most (Salgues et al., 1986). Segons el contingut en glutatió, es pot caracteritzar el potencial de pardejament, ja que els mostos que contenen una elevada concentració de glutatió presenten menys augment del color (Waterhouse, 2002).

Una altra de les alternatives al SO₂ recentment estudiades és la bioprotecció. Aquest mètode consisteix en l'addició de microorganismes al most abans de la fermentació (Simonin et al., 2020). Així, al desenvolupar-se aquests microorganismes, altres que podrien ser negatius per la qualitat del vi no creixerien i per tant el most/vi estaria protegit davant dels seus efectes negatius. En aquest sentit, *Metschnikowia pulcherrima* mostra un gran potencial per la bioprotecció ja que presenta una gran capacitat de consumir oxigen (Giménez et al., 2023; Puyo et al., 2023; Windholtz et al., 2023), dificultant l'aparició d'altres microorganismes (Windholtz et al., 2023) i impedit el pardejament enzimàtic degut a la carència d'oxigen (Giménez et al., 2023; Puyo et al., 2023).

La hipòtesi del present estudi és que, mitjançant el desenvolupament d'un mètode per determinar l'activitat tirosinasa del most de raïm, serà possible estudiar la cinètica de pardejament del most davant de diferents substrats i estudiar procediments alternatius al diòxid de sofre per protegir el most.

Per això ens vam plantejar els següents objectius:

- I. Posar a punt un mètode per determinar l'activitat tirosinasa del most de raïm.
- II. Caracteritzar la cinètica de pardejament causat per la tirosinasa del most davant de diferents substrats.
- III. Estudiar la influència del pH, de la temperatura i de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa del most.
- IV. Estudiar l'efecte protector del glutatió sobre el pardejament del most.
- V. Estudiar l'efecte protector de la bioprotecció amb *M. pulcherrima* sobre el pardejament del most.

2. Materials i mètodes

2.1. Preparació del most

El most utilitzat per realitzar els diferents estudis de pardejament prové de raïm de la varietat Moscatell d'Alexandria del celler experimental Mas dels Frares, el qual va ser congelat en el moment de la verema. A l'hora de dur a terme els diferents experiments, el raïm va ser descongelat, es va triturar amb batidora (Silvercrest SSM550C1, Kompernass GMBH, Bochum, Alemanya) i es va realitzar una maceració pel·licular durant 24 hores a una temperatura de 4 °C per tal d'afavorir l'extracció de l'enzim tirosinasa. Passat aquest temps va ser tamisat, premsat i centrifugat (Allegra-X-30R, Beckman coulter, CA, EEUU) per separar les parts sòlides i obtenir el most net.

2.2. Clarificació del most

Els polifenols presents en el most podrien ser oxidats durant els experiments i interferir en la mesura del pardejament. Per tal de garantir que la tirosinasa actuï només sobre els substrats seleccionats és necessari eliminar tots els compostos fenòlics presents al most. En aquest sentit, es van realitzar proves de clarificació amb dos agents clarificants, el carbó actiu i el Polivinilpolipirrolidona (PVPP). Una vegada fetes aquestes proves, es va determinar l'activitat tirosinasa a fi de seleccionar el procediment que menys afectava la dita activitat enzimàtica.

2.2.1. Clarificació del most amb carbó actiu

Es va addicionar 5 g/L de carbó actiu al most i es va deixar en contacte durant 5 minuts. Seguidament, es va centrifugar per tal de separar el carbó actiu i obtenir el most clarificat. La dosi de carbó va ser la mínima necessària per obtenir un Índex de Polifenols total (IPT o Absorbància a 280 nm) més baix de 2.

2.2.2. Clarificació del most amb PVPP

El most es va percolar emprant una columna de PVPP. Específicament, es va realitzar una dissolució de PVPP amb aigua destil·lada en una concentració de 200 g/L. Es van preparar 5 columnes de PVPP dipositant-hi 10 mL d'aquesta dissolució en cada una. El most es va percolar a través d'aquestes columnes amb l'ajuda d'una bomba de buit. Es va repetir el procés 4 cops fins assolir un IPT més baix de 2.

2.3 Mesura de l'activitat tirosinasa mitjançant el seguiment del pardejament del most.

Per realitzar la mesura de l'activitat tirosinasa del most, es van realitzar cinètiques d'augment del color groc en el most mesurant l'absorbància a 420 nm (A420) en funció del temps utilitzant diferents substrats. Per això, en una cubeta d'espectrofotometria de 10 mm de camí òptic es van addicionar 1,8 mL de most preparat i clarificat. A continuació, a partir d'una solució mare dels diferents substrats a analitzar, es va addicionar un determinat volum fins a arribar a la concentració de substrat desitjada i el volum definitiu es va ajustar amb aigua destil·lada fins arribar a 2 mL. Finalment, es va agitar enèrgicament la cubeta per tal d'homogeneïtzar i saturar en oxigen el most. Per tal de monitoritzar la reacció de pardejament, es van realitzar mesures periòdiques de l'absorbància a 420 nm amb espectrofotòmetre UV/Vis (Jenway 7205, Cole-Parmer Ltd, Regne Unit) al llarg del temps fins que es va veure un comportament asimptòtic. La durada d'aquestes mesures va dependre de cada substrat utilitzat i/o de les condicions experimentals, comprenent temps entre 40 i 240 minuts. Tots els experiments es van realitzar per triplicat.

2.4 Cinètica de pardejament degut a la tirosinasa en funció del substrat.

Per tal d'analitzar l'afinitat de la tirosinasa amb diferents substrats es van realitzar cinètiques de pardejament addicionant diferents compostos fenòlics: dos ortodifenols (àcid caftàric ($\geq 99,9\%$) Biosynth S.R.O., Bratislava, Slovakia i (-)-epicatequina ($\geq 99,9\%$) Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya), un trifenol (àcid gàl·lic ($\geq 97,5\%$) Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) i un monofenol (àcid p-hidroxibenzoic ($\geq 99,9\%$) Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya). Es van realitzar mesures del pardejament del most tal com estan descrites a l'apartat 2.3, utilitzant els diversos substrats a diferents concentracions tal com es pot observar en la Taula 2. El most va ser preparat i clarificat amb PVPP degut a que donava millors valors d'activitat tirosinasa. Tots els experiments per cada substrat i concentració es van realitzar per triplicat.

Taula 2. Substrats i concentracions utilitzades per realitzar la cinètica de pardejament.

Substrat	Concentració (mM)
Àcid caftàric	0,0 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 1,5
(-)-Epicatequina	0,0 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 1,5 / 2,0
Àcid gàl·lic	0,0 / 0,5 / 1,0 / 1,5 / 2,0 / 2,5
Àcid p-hidroxibenzoic	0,0 / 0,25 / 0,5 / 1,0 / 1,5

2.5 Determinació de les constants cinètiques de la tirosinasa.

Per tal d'estudiar la cinètica de pardejament provocada per la tirosinasa del most, es va representar el diagrama de Michaelis-Menten (Michaelis i Menten, 1913) per a cada substrat. També es va representar el diagrama de Lineweaver-Burk (Lineweaver i Burk, 1934) per tal de determinar les constants cinètiques, constant de Michaelis (K_M) i velocitat màxima (V_{max}), de la tirosinasa davant de cadascun del substrats. En el cas de que la cinètica observada per algun del substrats no mostrés un comportament Michaelià, es va procedir a representar el diagrama de Hill que permet determinar la $K_{0.5}$ que és l'equivalent de la K_M per comportament al·lostèrics (Tsao & Madley, 1972).

2.6 Influència del pH sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar com actua la tirosinasa en funció del pH es van realitzar mesures del pardejament del most tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.3 a diferents valors de pH. El most es va preparar i clarificar amb PVPP. Es van ajustar els pH amb àcid clorhídric fins arribar a valors de 3,87, 3,53 i 3,10 de pH. En els tres casos es va utilitzar només l'àcid caftàric en les condicions prèviament descrites degut a que es va comprovar que era el millor substrat per la tirosinasa de tots els estudiats. Tots els experiments per cada pH i concentració es van realitzar per triplicat.

2.7 Influència de la temperatura sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar l'efecte de la temperatura sobre l'activitat tirosinasa es van realitzar mesures del pardejament del most tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.3 a diferents temperatures. Específicament, es van realitzar les mesures de pardejament del most a temperatures de 15 °C, 25 °C i 35 °C. Per tal de garantir l'estabilitat de la temperatura al llarg de l'experiment es van mantenir les cubetes en un bany amb gel en el cas de la condició de 15 °C, i en un bany amb aigua calenta en les condicions de 25 °C i 35 °C. En els tres casos es va utilitzar només l'àcid caftàric com a substrat en les condicions prèviament descrites. Tots els experiments per cada condició de temperatura i concentració es van realitzar per triplicat.

2.8 Influència de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar la influència de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa es van realitzar mesures del pardejament del most tal i com s'han descrit en l'apartat 2.3 a diferents concentracions d'etanol. El most va ser preparat i clarificat amb PVPP. Es va addicionar etanol fins obtenir 3 concentracions diferents, 0%, 6% i 12% vol/vol d'etanol. Com a substrat es va utilitzar només l'àcid caftàric en les condicions prèviament descrites. Tots els experiments per cada concentració d'etanol i substrat es van realitzar per triplicat.

2.9 Assajos d'inhibició de la tirosinasa

Per tal d'estudiar l'efecte dels diferents inhibidors de la tirosinasa i per tant del pardejament del most, es van realitzar mesures del pardejament tal i com s'ha descrit en l'apartat 2.3. El most va ser preparat i clarificat amb PVPP. En aquest cas sempre es va utilitzar l'àcid caftàric com a substrat a les concentracions prèviament descrites. Es van estudiar com a inhibidors del pardejament el diòxid de sofre, el glutatió (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya) i el llevat no-*Saccharomyces Metschnikowia pulcherrima* LEVEL² INITIA™ (Lallemand, Québec, Canadà). A l'inici de cada reacció es van addicionar els diferents inhibidors per separat en les dosis que es detallen en la Taula 3. Es va monitoritzar l'absorbància a 420 nm al llarg del temps durant 40 minuts en totes les condicions. En tots els casos els experiments es van realitzar per triplicat.

Taula 3. Inhibidors i dosis emprades en la cinètica de pardejament del most

Inhibidor	Dosis (mg/L)
Diòxid de sofre	0 / 5 / 10 / 20
Glutatió	0 / 20
<i>M. pulcherrima</i>	0 / 250

3. Resultats

3.1 Influència del tractament decolorant del most sobre l'activitat tirosinasa del most.

Per tal de garantir que la tirosinasa actuï només sobre els substrats seleccionats és necessari eliminar tots els compostos fenòlics presents al most realitzant una clarificació. Es van provar el carbó actiu i el PVPP com a clarificants fins arribar a un IPT més baix de 2,0, per tal de definir l'agent clarificant a utilitzar en el disseny experimental.

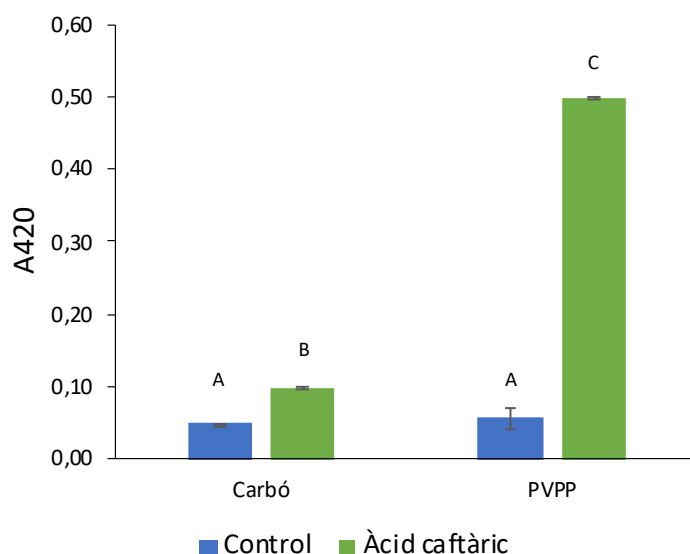


Figura 2. Increment de l'absorbància a 420 nm d'un most al cap de 72 hores degut a l'activitat tirosinasa. (Carbó: Condicions amb most clarificat amb carbó actiu. PVPP: Condicions amb most clarificat amb PVPP. Control: Most sense addició d'àcid caftàric. Àcid caftàric: most amb una addició de 0,64 mM d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

En la Figura 2 està representat l'increment d'absorbància a 420 nm (A420) en un most amb i sense addició d'àcid caftàric i en funció de l'agent clarificant utilitzat com a tractament, carbó actiu o PVPP. Es van observar diferències en l'augment del pardejament depenent del tractament de clarificació. Quan es va utilitzar el PVPP com agent clarificant, l'augment de l'A420 al cap de 72 hores va ser 5 cops més elevada que quan es va utilitzar el carbó actiu. Aquest fet ens indica que el tractament amb PVPP manté més activitat tirosinasa que el tractament amb carbó actiu. Per aquesta raó, es va emprar el PVPP com a clarificant en el disseny experimental dels estudis posteriors sobre la cinètica oxidativa.

3.2 Cinètica de pardejament degut a la tirosinasa en funció del substrat.

Per estudiar les diferències entre el pardejament del most en funció del substrat utilitzat per la tirosinasa es van realitzar diferents cinètiques d'oxidació utilitzant 4 diferents substrats per separat. Específicament, es va treballar amb un monofenol (àcid *p*-hidroxibenzoic), dos difenols (àcid caftàric i (-)-epicatequina) i un trifenol (àcid gàl·lic). En la Figura 3 està representat l'augment de l'A420 al llarg del temps degut a l'oxidació enzimàtica dels diferents compostos fenòlics. Tal com es pot observar, l'àcid caftàric i la (-)-epicatequina són els compostos que presenten un major augment de l'A420 i per tant, del pardejament del color. En el cas de l'àcid gal·lic l'augment de l'A420 va ser molt menys elevat i en el cas de l'àcid *p*-hidroxibenzoic no es va veure cap increment en cap de les concentracions. Aquests resultats ens indiquen que els ortodifenols (àcid caftàric i (-)-epicatequina) són millors substrats per la tirosinasa que els trifenols (àcid gàl·lic) i els monofenols (àcid *p*-hidroxibenzoic).

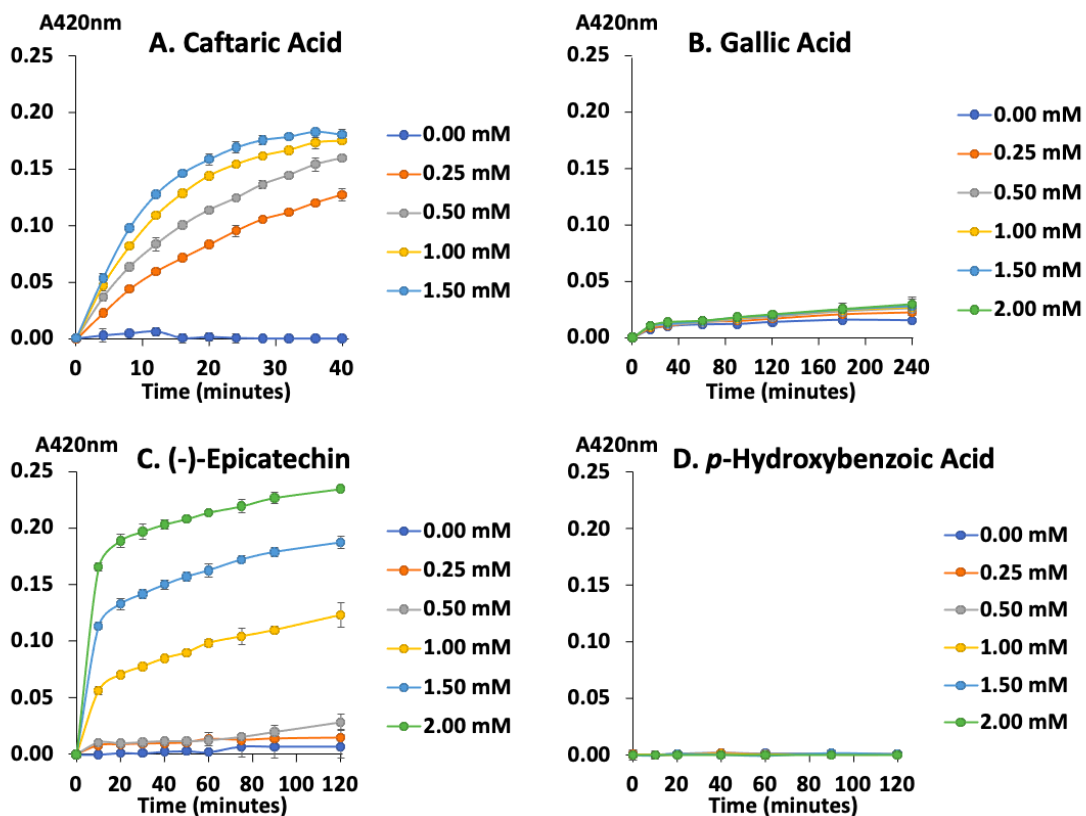


Figura 3. Augment del pardejament del most en funció del substrat per acció de la tirosinasa. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

En la Figura 4 estan representats els diagrames Michaelis-Menten, on s'indica la velocitat del pardejament en funció de la concentració de substrat. Com es pot observar, tant l'àcid caftàric com l'àcid gàl·lic presenten un comportament Michaelià, però no es dona el cas amb la (-)-epicatequina, que sembla al·lostèric. A més a més, podem veure la diferència de velocitat que presenten els substrats, sent la (-)-epicatequina i l'àcid caftàric els substrats que presenten una velocitat més alta, mentre que l'àcid gàl·lic presenta aproximadament 50 cops menys velocitat que aquests dos.

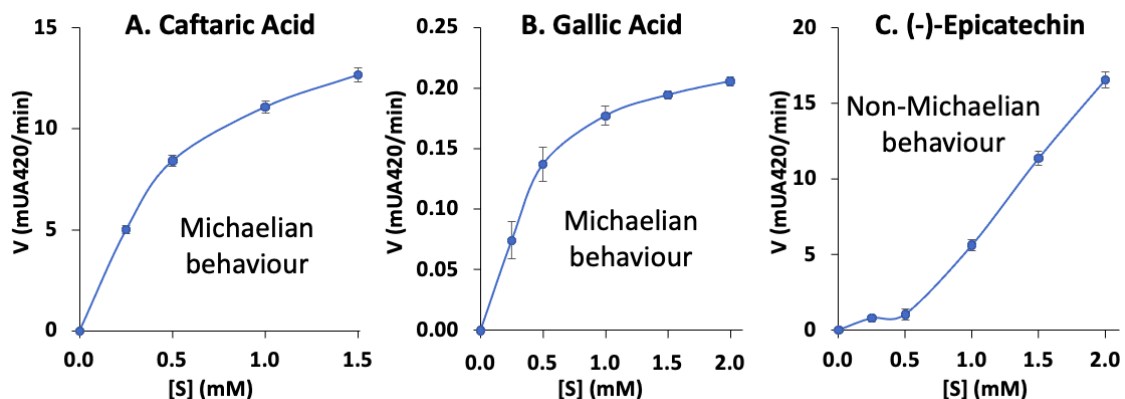


Figura 4. Diagrames Michaelis Menten. Velocitat de la reacció enzimàtica en funció de la concentració de substrat.

En la figura 5 estan representats els diagrames Lineweaver-Burck i el diagrama de Hill dels quals s'han calculat les constants $K_M / K_{0.5}$ i la velocitat màxima. La K_M en el cas del comportament Michaelià, i la $K_{0.5}$ en el cas del comportament al·lostèric, representen l'afinitat del substrat amb l'enzim. Ens indiquen la concentració de substrat necessària per assolir la meitat de la velocitat màxima, per tant, com més baixa és la K_M o $K_{0.5}$, més alta serà l'afinitat del substrat amb l'enzim. Com es pot observar, l'àcid caftàric és el substrat que presenta una K_M més baixa i per tant una major afinitat amb la tirosinasa, coincidint tal com s'ha descrit en la bibliografia existent, l'àcid caftàric és el substrat principal de la tirosinasa (Oliveira et al., 2011; Singleton et al., 1985). No obstant, la (-)-epicatequina és el substrat que presenta tant la velocitat màxima com la K_M més alta, segurament degut al seu comportament al·lostèric.

En estudis amb altres polifenols oxidases com és la lacasa, amb l'àcid p-hidroxibenzoic i l'àcid gal·lic es van veure resultats similars, però en canvi, es va descriure un major pardejament per part de la (-)-epicatequina en comparació amb l'àcid caftàric. Tot i així, també es va descriure un major pardejament per part dels ortodifenols en comparació amb trifenols i monofenols (Giménez et al., 2022).

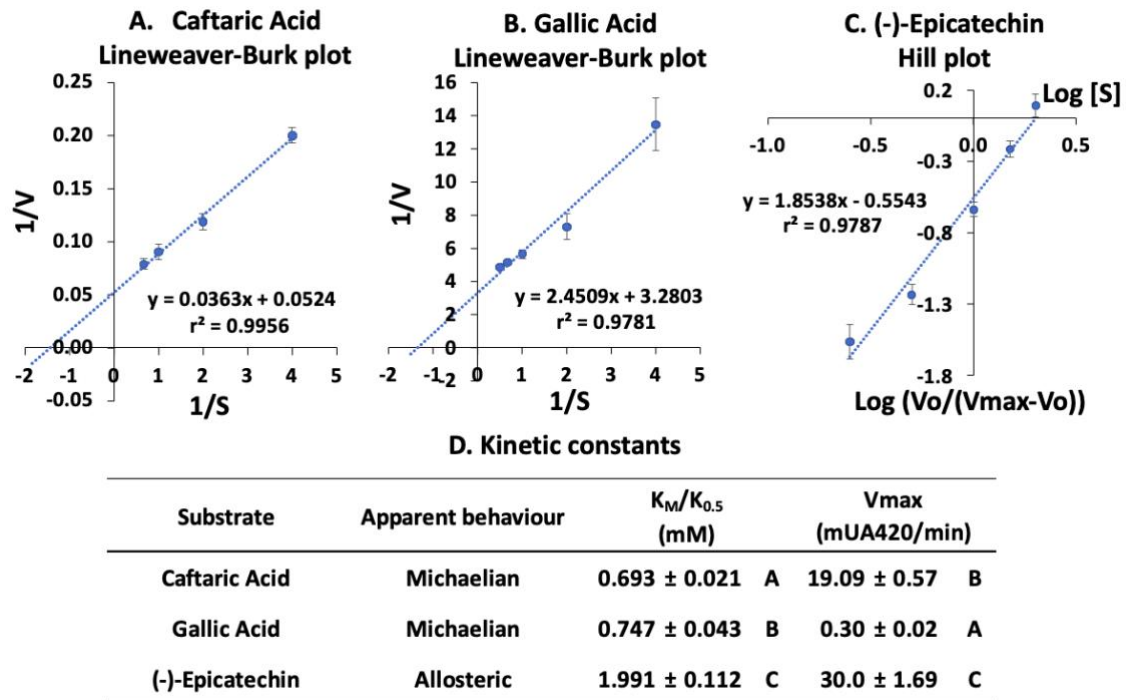


Figura 5. Diagrames de Lineweaver-Burk, diagrama de Hill i constants cinètiques de l'àcid caftàric, l'àcid gàl·lic i la (-)-epicatequina. Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

3.3 Influència del pH sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar l'efecte de la tirosinasa en funció del pH, es van realitzar cinètiques d'oxidació a diferents pH com són 3,87, 3,53 i 3,10. En els tres casos es va utilitzar l'àcid caftàric com a substrat, ja que tal com s'ha descrit anteriorment, és el substrat que presenta major afinitat per la tirosinasa.

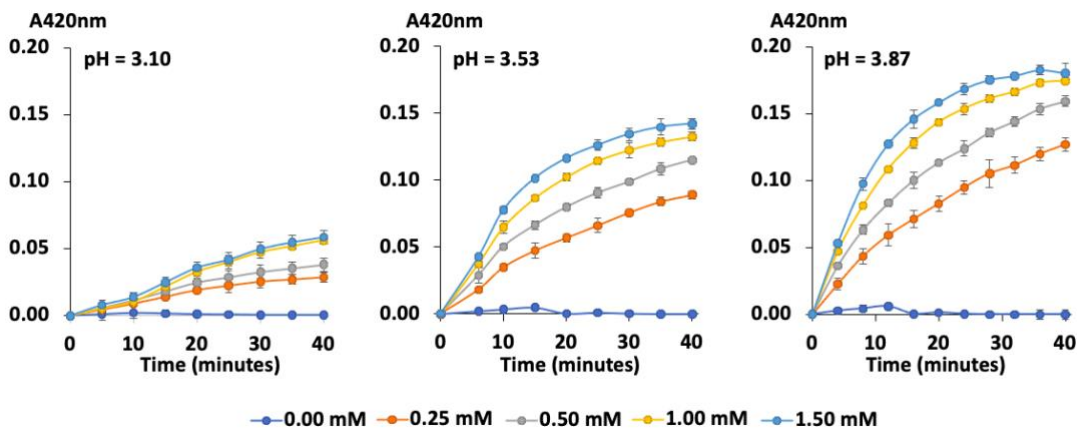


Figura 6. Influència del pH sobre el pardejament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Tal com es pot observar en la Figura 6, el pH té una influència clara sobre el pardejament enzimàtic del most. La condició amb un pH de 3,87, el més elevat, és la que va presentar un major augment de l'A420 i per tant, del color. En disminuir el pH, en la condició pH 3,53, es va veure en la cinètica que l'augment de l'A420 era lleugerament inferior i que en la condició amb un pH de 3,10 la disminució del pardejament va ser encara més notable. Aquests resultats ens indiquen que el pardejament disminueix a mesura que disminueix el pH, per tant, l'activitat de la tirosinasa es veu reduïda en medis més àcids.

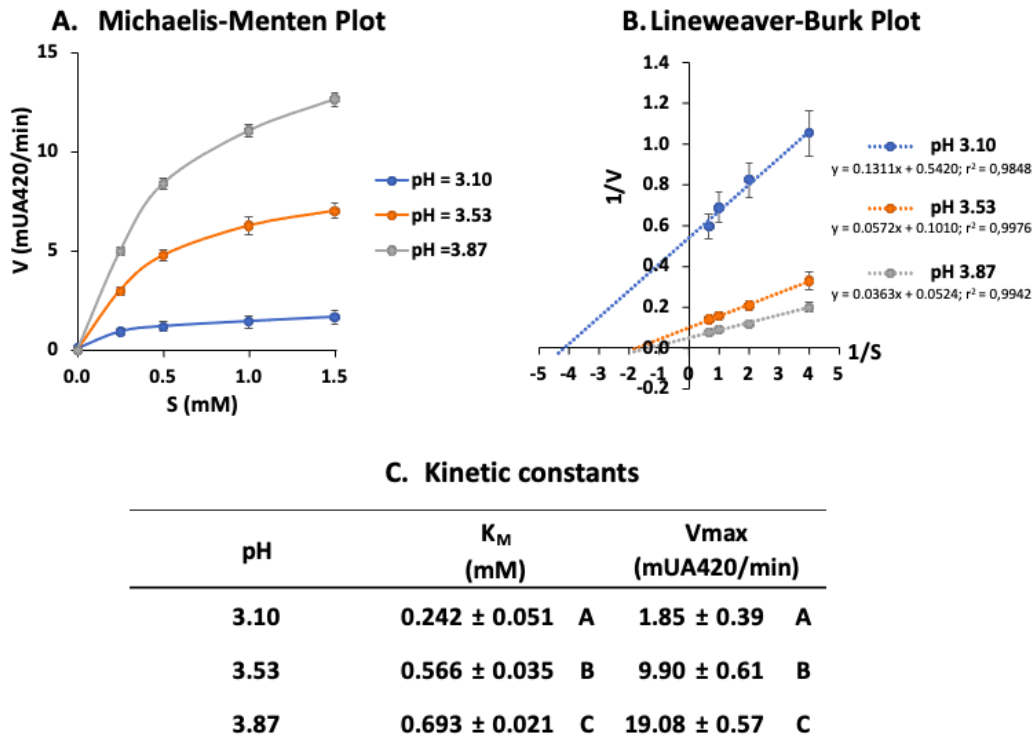


Figura 7. Diagrames Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques dependent del pH. (V: velocitat; S: concentració d'àcid caftàric; 1/V: Inversa de la velocitat; 1/S: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

Tal com es pot observar en la Figura 7.A, el diagrama Michaelis-Menten ens mostra la velocitat de reacció en funció de la concentració de substrat. Aquesta velocitat augmenta a mesura que augmenta la concentració d'àcid caftàric, tal com s'ha vist en resultats anteriors. No obstant aquesta velocitat es veu clarament influenciada pel pH, sent la condició de pH de 3,87 la que presenta una velocitat més elevada, seguida del pH 3,53 i finalment del pH de 3,10, la qual presenta la velocitat més baixa. Com es pot observar la velocitat depèn del pH, a mesura que disminueix el pH la velocitat és menor. Aquest fet ens indica que l'activitat de la tirosinasa es veu atenuada en medis àcids i per tant, també el pardejament del most. En la figura 7.B està representat el diagrama

Lineweaver-Burk amb uns coeficients de regressió lineal d'entre 0,9848 i 0,9976, a partir del qual s'han calculat les constants cinètiques representades en la Figura 7.C. Els resultats experimentals indicats en aquesta figura, ens descriuen una major afinitat (la K_M és més baixa) al pH més baix (3,10), i a mesura que augmenta el pH en les altres condicions, l'afinitat disminueix. No obstant, el valor més alt de la velocitat màxima es dona al pH més alt (3,87), i va disminuït a mesura que disminueix el pH en les altres dues condicions. En resum, tal com augmenta el pH disminueix l'afinitat, malgrat això augmenta la velocitat màxima, donant explicació al major augment del pardejament a la condició de pH 3,87, la més elevada.

En altres estudis amb lacasa també s'ha observat un efecte del pH sobre el pardejament del most, veient un augment de la velocitat del pardejament a mesura que el pH augmenta (Giménez et al., 2022).

3.4 Influència de la temperatura sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar l'efecte de temperatura sobre l'activitat tirosinasa es van realitzar mesures del pardejament del most a 15 °C, 25 °C i 35 °C. En els tres casos es va utilitzar només l'àcid caftàric com a substrat.

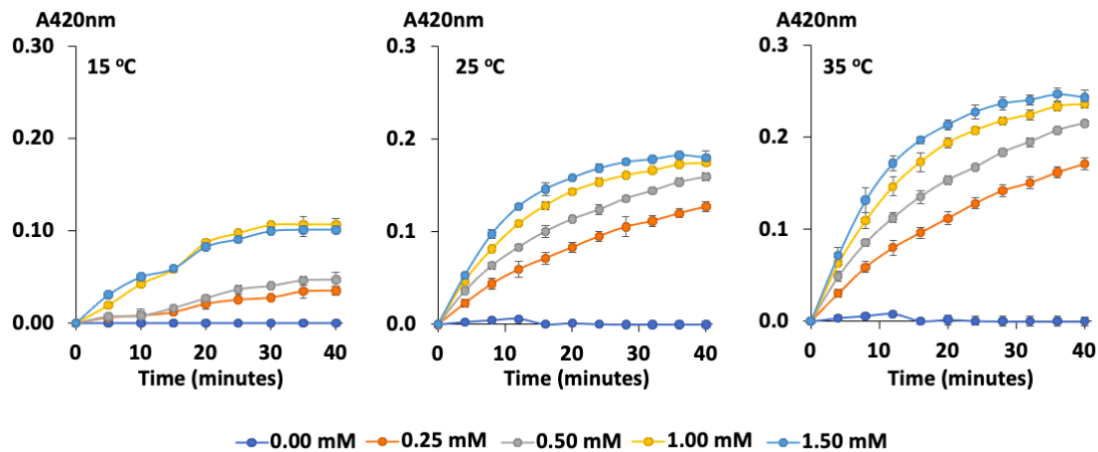


Figura 8. Influència de la temperatura sobre el pardejament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Tal com es pot observar en la Figura 8, la temperatura influeix clarament sobre l'activitat tirosinasa i per tant sobre el pardejament. L'augment de l'A420 es veu afavorit quan augmenta la temperatura, presentant l'augment més baix en la condició de 15 °C, i és

més alt seguidament i en ordre creixent a 25 °C i a 35 °C. L'activitat tirosinasa es veu perjudicada a temperatures baixes, presentant menys pardejament del most.

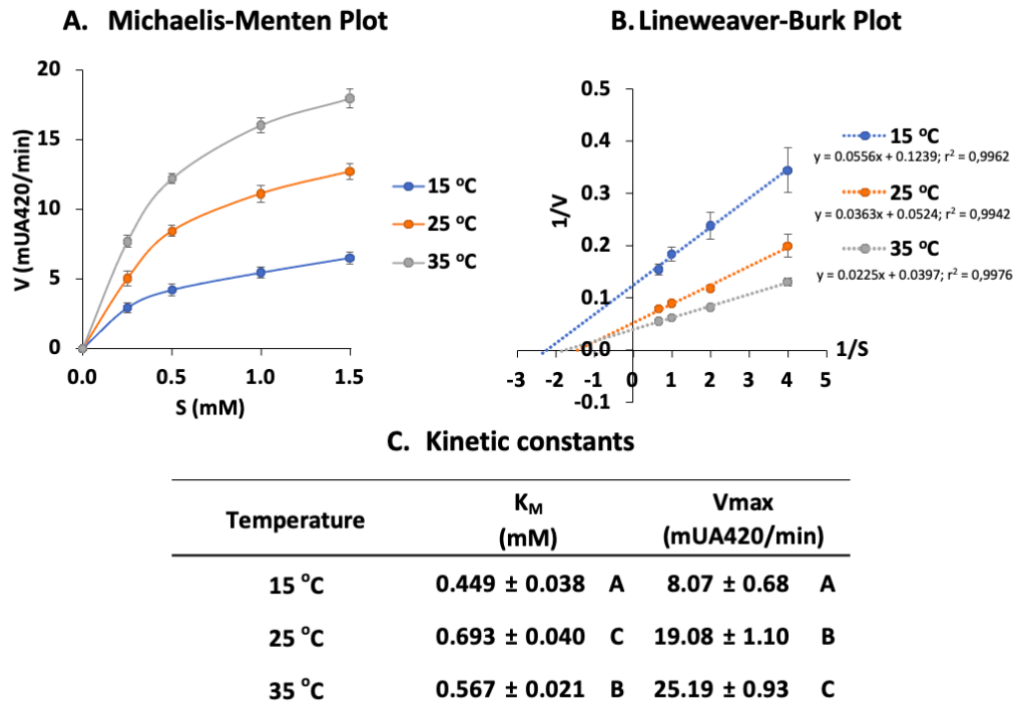


Figura 9. Gràfics Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques dependent de la temperatura. (V: velocitat; S: concentració d'àcid caftàric; 1/V: Inversa de la velocitat; 1/S: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

Tal com es pot observar en el diagrama Michaelis-Menten en la figura 9.A, la velocitat de reacció és menor a la temperatura de 15 °C, la velocitat augmenta quan la temperatura és de 25 °C i presenta la velocitat més alta a 35 °C. A partir del gràfic Lineweaver-Burk representat en la Figura 9.B, s'han determinat les constants cinètiques, amb uns coeficients de regressió lineal d'entre 0,9942 i 0,9976. Aquestes constants representades en la Figura 9.C, ens indiquen la K_M i la velocitat màxima. Pel que fa a l'afinitat, la K_M no segueix una tendència clara. El valor més alt de K_M es dona en el cas de la temperatura a 25 °C, seguidament en ordre decreixent la condició a 35 °C i després la condició a 15 °C, presentant aquesta última la K_M més baixa i per tant, l'afinitat més alta. No és el cas de la velocitat màxima, que augmenta tal com augmenta la temperatura. A 15 °C tenim la velocitat màxima més baixa, seguidament i en ordre creixent la condició de 25 °C i 35 °C. Un cop més, sembla ser que l'augment de la velocitat en augmentar la temperatura, dona explicació al major augment del pardejament.

3.5 Influència de l'etanol sobre l'activitat tirosinasa.

Per estudiar l'efecte de l'etanol sobre l'activitat de la tirosinasa, es van realitzar cinètiques d'oxidació addicionant etanol al most fins obtenir concentracions de 0%, 6% i 12% vol/vol. En els tres casos es va utilitzar només l'àcid caftàric com a substrat.

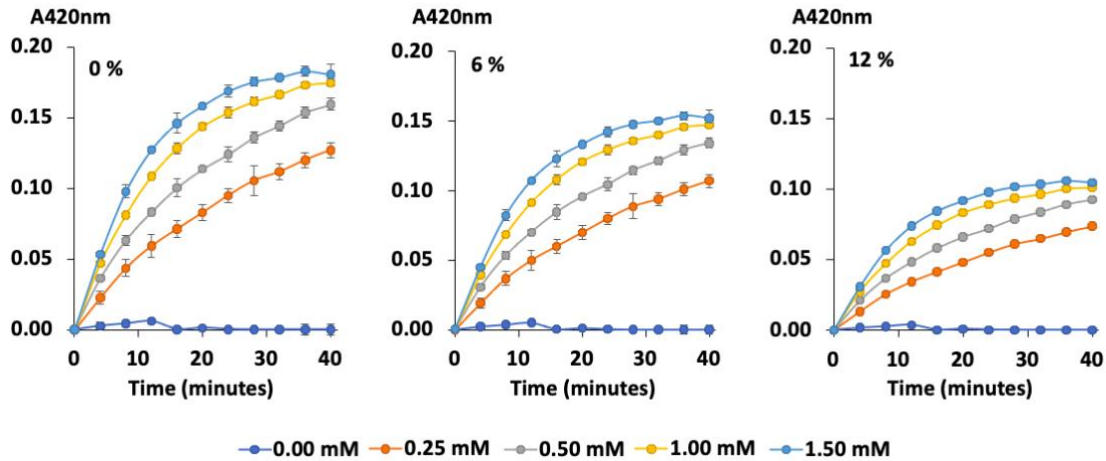


Figura 10. Influència de l'etanol sobre el pardejament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Tal com es pot observar en la Figura 10, la concentració d'etanol té un efecte sobre el pardejament del most. A mesura que augmenta la concentració d'etanol en el medi, l'augment de l'A420 i per tant, el pardejament, disminueixen respecte del control sense etanol. L'activitat de la tirosinasa es veu atenuada quan el most presenta un 6% d'etanol i en major mesura es veu aquest efecte quan presenta un 12% d'etanol.

Com es pot observar en el diagrama Michaelis-Menten presentat en la Figura 11.A, la velocitat de pardejament es veu influenciada per la concentració d'etanol. La velocitat de reacció és més baixa quan augmenta la concentració d'etanol. Quan el most presenta un 6% d'etanol, la velocitat de reacció és menor que en la condició control sense etanol, i l'efecte és més notable amb 12% d'etanol, on la velocitat de reacció decreix en major mesura. En la Figura 11.B està representat el gràfic Lineweaver-Burk, proporcionant uns coeficients de regressió lineal d'entre 0,9942 i 0,9962, del qual hem determinat les constants cinètiques representades en la Figura 11.C. Com es pot observar, la constant K_M disminueix en les condicions de 6% i 12% d'etanol, per tant l'afinitat de la tirosinasa amb l'àcid caftàric augmenta en presència d'etanol. No obstant, la condició control amb 0% d'etanol, és la que presenta la velocitat màxima més alta, seguidament i en ordre decreixent de la condició amb 6% i 12% d'etanol. Per tant, la velocitat màxima disminueix en augmentar la concentració d'etanol.

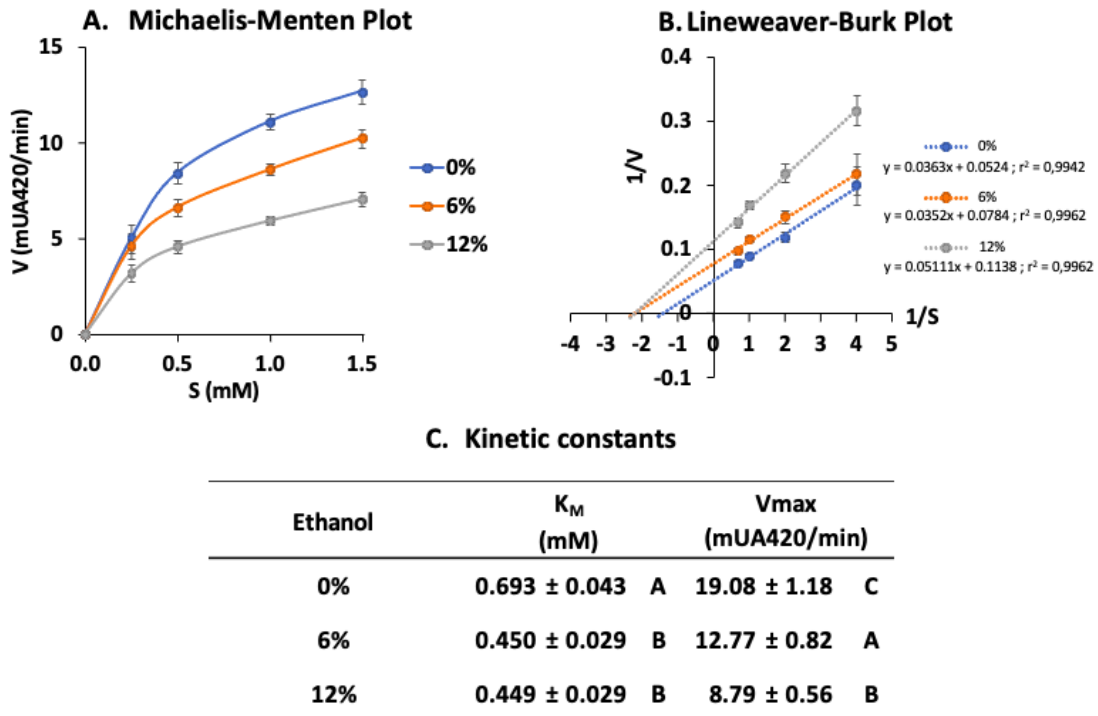


Figura 11. Gràfics Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques del pardejament del most dependent de la concentració d'etanol. (V: velocitat; S: concentració d'àcid caftàric; 1/V: Inversa de la velocitat; 1/S: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

Veient aquests resultats i coincidint amb Li et al. (2008) i Spagna et al. (2000) podríem afirmar que l'oxidació enzimàtica per part de la tirosinasa es dona principalment en el most, ja que en el vi per la presència d'etanol degut a la fermentació alcohòlica, l'activitat polifenol oxidasa es veu reduïda. Comportaments similars s'han vist amb lacasa en medis alcohòlics. Giménez et al. (2022) van observar un decreixement de la velocitat de la reacció enzimàtica a mesura que augmentava la concentració d'etanol amb la (-)-epicatequina com a substrat, exceptuant una concentració de 5% d'etanol, que afavoria la velocitat i el pardejament del most.

3.6 Assajos d'inhibició de la tirosinasa

Per evitar l'oxidació enzimàtica i per tant, el pardejament del most, s'utilitzen diferents additius, sent el SO_2 el més emprat. No obstant, en els últims anys s'han buscat alternatives. Per aquest motiu, es va estudiar l'efecte d'inhibició de diferents dosis de SO_2 , així com també l'efecte del glutatió i *M. pulcherrima* sobre l'activitat tirosinasa.

3.6.1 Efecte del SO₂ sobre l'activitat tirosinasa

Per estudiar l'efecte del SO₂ sobre la tirosinasa es van realitzar cinètiques d'oxidació addicionant diferents dosis d'aquest, tal com es mostra en la Figura 12. Es va utilitzar només àcid caftàric com a substrat.

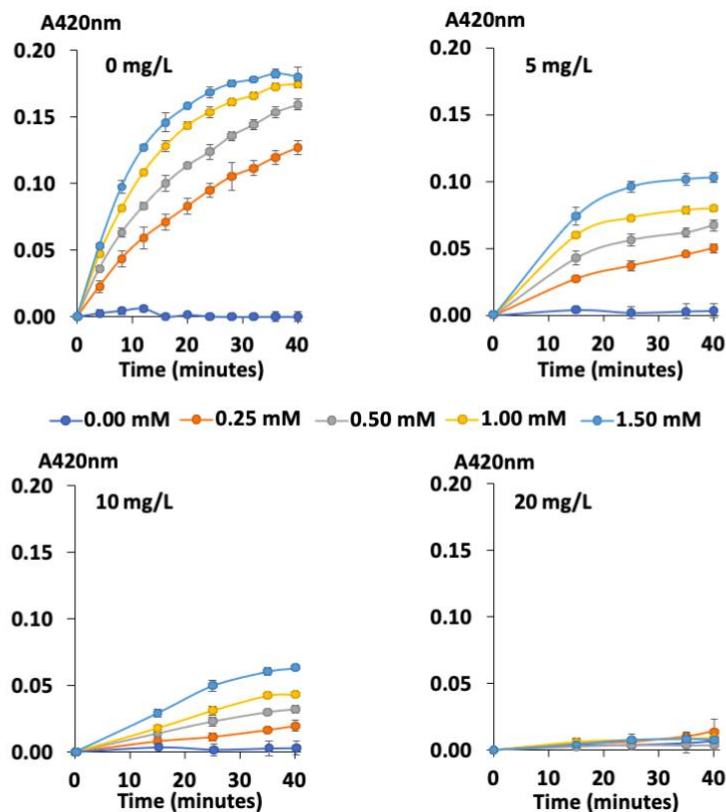


Figura 12. Influència del SO₂ sobre el pardeament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Com es pot observar en la Figura 12, l'addició de SO₂ disminueix el pardeament del most. A mesura que augmenta la dosi de SO₂, l'activitat tirosinasa es veu reduïda. En la condició que presenta una dosi de 5 mg/L es veu una disminució de l'augment de l'A420 respecte al control sense SO₂. De la mateixa manera i en major mesura es veu en la condició de 10 mg/L, i amb 20 mg/L no es veu cap augment de l'A420, indicant una inhibició total de l'enzim i per tant, del pardeament del most.

Pel que fa a la velocitat de reacció en presència de SO₂, tal com ens mostra el diagrama Michaelis-Menten en la Figura 13.A, aquesta disminueix segons augmenta la dosi de SO₂ emprada. El control amb 0 mg/L presenta la velocitat de reacció més elevada, seguidament i en ordre decreixent de 5 mg/L, 10 mg/L i 20 mg/L, veient un cop més l'efecte inhibitori del SO₂. En la Figura 13.B es representat el diagrama Lineweaver-Burk

amb uns coeficients de regressió lineal d'entre 0,9799 i 0,9942. A partir d'aquest, s'han calculat les constants cinètiques representades en la figura 13.C. En aquest cas, tant l'afinitat com la velocitat màxima disminueixen a mesura que augmenta la dosi de SO₂. La condició control amb 0 mg/L de SO₂ és la que presenta una K_M més baixa, i per tant, una major afinitat. Quan s'aplica una dosi de 5 mg/L de SO₂ al most la K_M aparent augmenta, i en major mesura també augmenta quan s'aplica una dosi de 10 mg/L de SO₂, disminuint l'afinitat aparent de la tirosinasa amb l'àcid caftàric a mesura que augmenta la dosi de SO₂. Pel que fa a la velocitat màxima, la més elevada correspon a la condició control sense SO₂, seguidament i en ordre decreixent per les condicions amb 5 mg/L i 10 mg/L. Per tant, la velocitat màxima disminueix segons augmenta la dosi de SO₂ emprada en el most.

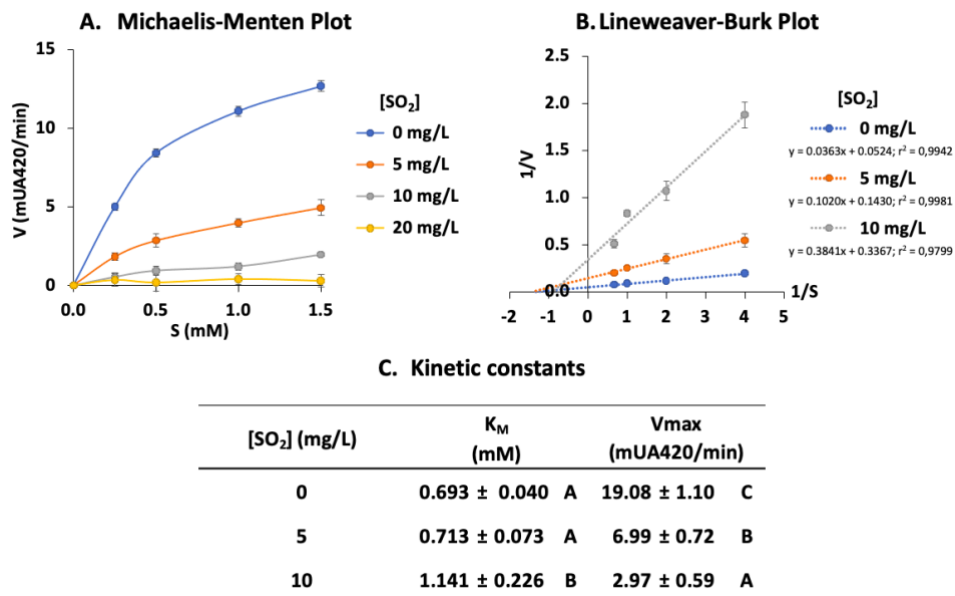


Figura 13. Gràfics Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques del pardejament del most dependent de la concentració de SO₂. (V: velocitat; S: concentració d'àcid caftàric; 1/V: Inversa de la velocitat; 1/S: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

Aquests resultats coincideixen en el que diferents autors han descrit àmpliament sobre l'efectivitat del SO₂ en el pardejament del most (du Toit et al., 2006; Oliveira et al., 2011; Ribéreau-Gayon et al., 2000). Altres autors com Bustamante et al. (2024a) i Giménez et al. (2023) han observat l'efectivitat del SO₂ en inhibir la tirosinasa així com també la lacasa. Sobre aquesta última, Giménez et al. (2022) va observar el mateix comportament amb l'afinitat i la velocitat, disminueixen a mesura que augmenta la dosi

de SO_2 . Concretament va veure que la lacasa va necessitar una dosi de 30 mg/L de SO_2 per inhibir el pardejament, a diferència de la tirosinasa en aquest estudi, on s'han necessitat 20 mg/L. Aquestes dades coincideix amb el que van descriure Ribéreau-Gayon et al. (2000), bàsicament que la lacasa és més resistent al SO_2 que la tirosinasa.

3.6.2 Efecte del glutatió sobre l'activitat tirosinasa

Per tal d'estudiar l'efecte del glutatió sobre l'activitat tirosinasa es va realitzar un seguiment del pardejament del most amb i sense addició de glutatió. En els dos casos es va utilitzar només àcid caftàric com a substrat.

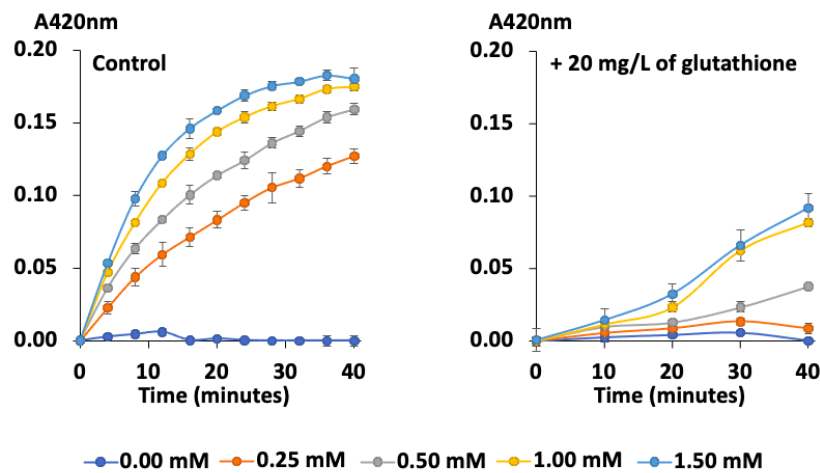


Figura 14. Influència del glutatió sobre el pardejament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Com es pot observar en la Figura 14, l'addició de glutatió té un efecte sobre el pardejament. La condició amb 20 mg/L de glutatió presenta un augment de l'A420 menor respecte la condició control sense addició de glutatió. Tal i com altres autors han descrit, la disminució del pardejament per part del glutatió és degut a la formació de GRP a partir de les quinones formades en la reacció entre la tirosinasa i l'àcid caftàric. Aquestes quinones, en comptes de formar melanines encarregades de l'augment del color del most, en presència de glutatió formen GRP, un compost incolor (Salgues et al., 1986).

En la figura 15.A està descrita la velocitat de reacció a partir del diagrama Michaelis-Menten. Com es pot observar, la velocitat de reacció és significativament menor en presència de glutatió respecte el control. En la Figura 15.B, tenim representat el gràfic Lineweaver-Burk amb uns coeficients de regressió lineal de 0,9600 i 0,9942, del qual s'han definit les constants cinètiques indicades en la Figura 15.C. Tal com es pot

observar, la K_M aparent augmenta amb la presència de glutatió, per tant, l'afinitat aparent de l'enzim amb el substrat disminueix respecte el control. Pel que fa a la velocitat màxima, la presència de glutatió la disminueix, sent aquesta quasi 4 cops major en el control.

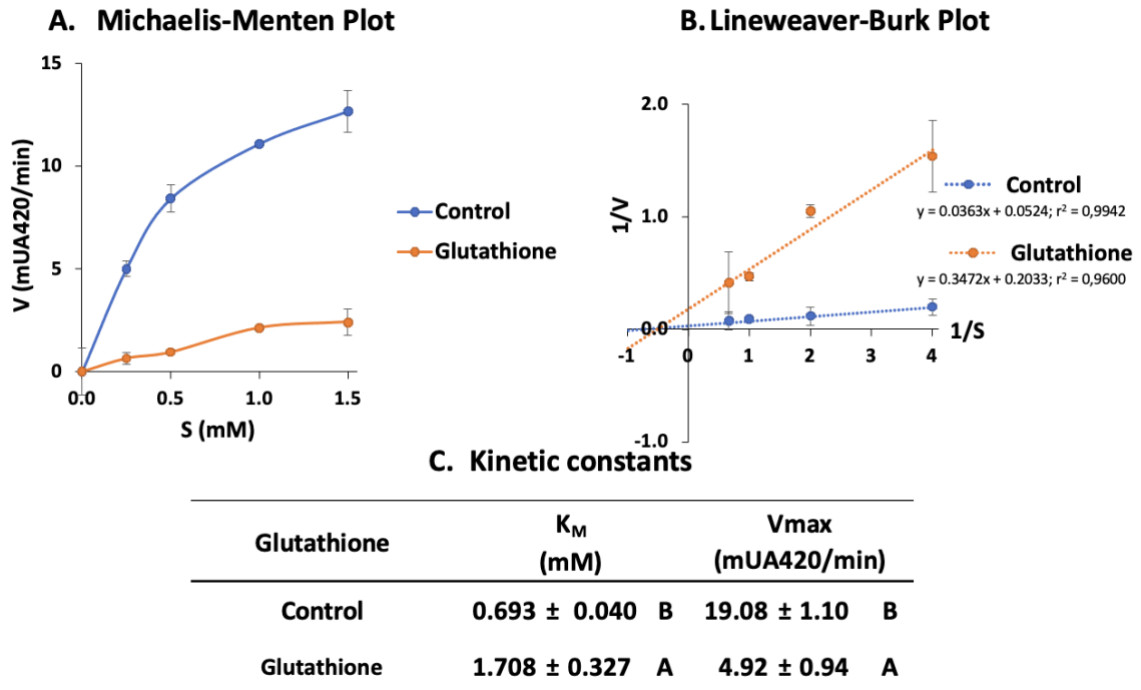


Figura 15. Diagrama Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques del pardejament del most amb presència de 20 mg/L de glutatió. (V: velocitat; S: concentració d'àcid caftàric; 1/V: Inversa de la velocitat; 1/S: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

Els resultats obtinguts ens confirmen l'efectivitat del glutatió per reduir el pardejament del most com diferents autors han descrit anteriorment (Bustamante et al., 2024b; Kritzinger et al., 2013; Oliveira et al., 2011; Salgues et al., 1986). Estudis d'altres autors com Giménez et al. (2022) han vist un efecte similar del glutatió sobre el pardejament del most per acció de la lacasa, tot i que es van necessitar dosis superiors per veure-hi un efecte. De la mateixa manera ho van observar Bustamante et al. (2024b), confirmant l'efectivitat del glutatió sobre el pardejament degut a la tirosinasa present en un most, i en menor mesura l'efectivitat en presència de lacasa.

3.6.3 Efecte de *Metschnikowia pulcherrima* sobre l'activitat tirosinasa.

Per determinar l'efecte de *M. pulcherrima* sobre l'activitat tirosinasa es van realitzar cinètiques de pardejament addicionant 250 mg/L de la soca de *M. pulcherrima* Initia (Lallemand, Québec, Canadà) així com també un control. La *M. pulcherrima* es va hidratar prèviament d'acord amb les instruccions del fabricant. Es va utilitzar només l'àcid caftàric com a substrat. Tal com ens mostra la Figura 16, l'addició de *M. pulcherrima* té un efecte sobre el pardejament del most, disminuint l'augment de l'A420 respecte el control. Aquest resultat ens confirma la utilitat de *M. pulcherrima* com a bioprotector.

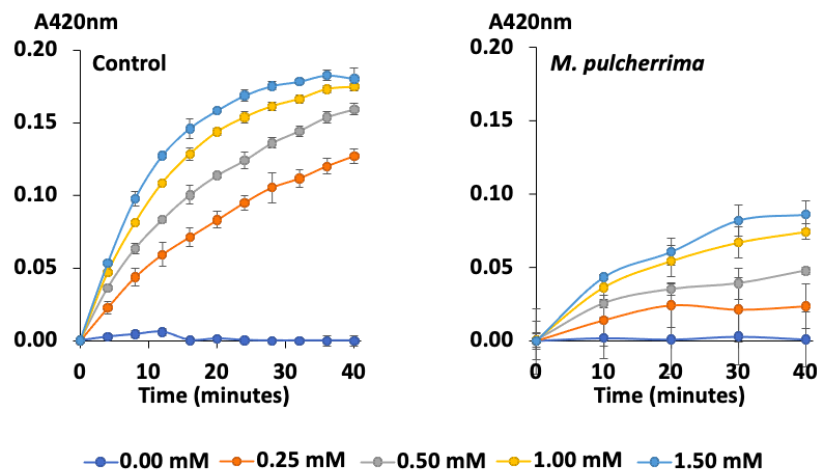


Figura 16. Influència de *M. pulcherrima* sobre el pardejament del most, utilitzant diferents concentracions d'àcid caftàric. Variació de l'absorbància a 420 nm en funció del temps.

Tal com es pot observar en el diagrama Michaelis-Menten en la Figura 17.A, la velocitat de reacció disminueix en presència de *M. pulcherrima* respecte el control. En la figura 17.B, està representat el gràfic Lineweaver-Burk amb uns coeficients de regressió lineal de 0,9942 i 0,9958, dels quals s'extreuen les constants cinètiques de la Figura 17.C. Tal com es pot observar, la K_M aparent de la condició on s'ha addicionat *M. pulcherrima* és major que en el control, per tant, en aquesta condició l'afinitat aparent és més baixa que en el control. Pel que fa a la velocitat màxima també s'ha vist un efecte en la condició on s'ha addicionat *M. pulcherrima*, sent aquesta inferior respecte el control.

Aquests resultats confirmen l'efectivitat de *M. pulcherrima* sobre la reducció del pardejament del most tal com han descrit diversos autors com Puyo et al. (2023) i Windholtz et al. (2023). Tal com han observat Bustamante et al. (2024a) i Giménez et al. (2023) la *M. pulcherrima* presenta una gran capacitat de consumir oxigen i també d'inhibir el pardejament, degut a la falta de disponibilitat d'oxigen per a l'enzim.

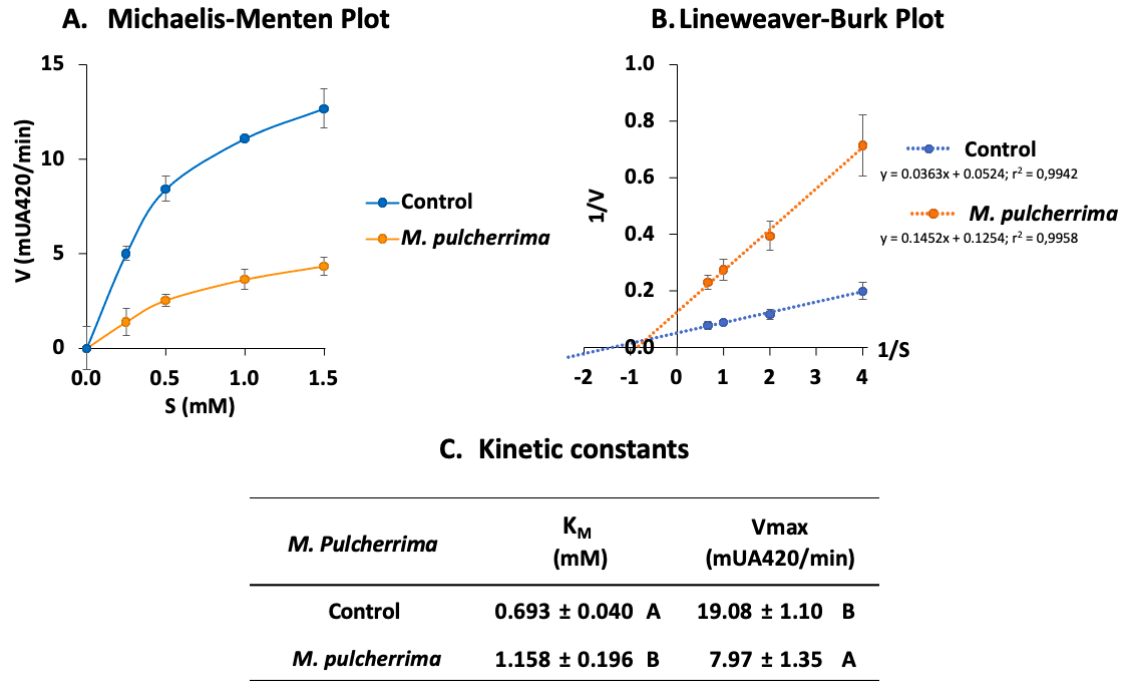


Figura 17. Gràfics Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk i constants cinètiques del pardejament del most amb presència de 250 mg/L de *M. pulcherrima*. (*V*: velocitat; *S*: concentració d'àcid caftàric; $1/V$: Inversa de la velocitat; $1/S$: Inversa de la concentració d'àcid caftàric). Lletres diferents indiquen l'existència de diferències estadísticament significatives.

4. Conclusions

- I. L'àcid caftàric, dels 4 substrats analitzats en aquest estudi, és el que presenta major pardejament del most, velocitat de reacció i afinitat amb la tirosinasa.
- II. La (-)-epicatequina també presenta una alta velocitat de reacció i és oxidada amb facilitat per la tirosinasa, tot i que no presenta un comportament Michaelià com els altres substrats.
- III. S'ha verificat que l'àcid gàl·lic és pitjor substrat de la tirosinasa i que l'àcid p-hidroxibenzoic no provoca pardejament per acció d'aquest enzim.
- IV. S'ha verificat que el pH afecta molt a l'activitat tirosinasa essent el pardejament molt més intens com més alt és el pH.
- V. S'ha comprovat que la temperatura també juga un gran paper en el procés del pardejament enzimàtic, essent aquest més intens com més alta és la temperatura.
- VI. S'ha vist que la presència d'etanol inhibeix l'activitat tirosinasa ja que la seva presència disminueix la velocitat del pardejament.
- VII. Pel que fa la concentració d'etanol, en presència d'aquest s'ha vist una reducció del pardejament del most comparat amb la condició control sense etanol. Aquesta reducció és més alta com més alta sigui la concentració d'etanol.
- VIII. S'ha comprovat l'efectivitat àmpliament descrita del SO₂ com a inhibidor del pardejament del most.
- IX. S'ha vist com el glutatió disminueix el pardejament del most i que per tant pot ser una bona alternativa al SO₂.
- X. S'ha comprovat que la *M. pulcherrima* també protegeix al most del pardejament enzimàtic confirmant l'interès potencial d'aquest llevat no-*Saccharomyces* com a bioprotector.

Els resultats obtinguts en aquest estudi ens obren noves perspectives de futur. El fet de desenvolupar un model de mesura de l'activitat tirosinasa mitjançant el pardejament del most, ens ha permès estudiar el glutatió i el llevat no-*Saccharomyces M. pulcherrima* com inhibidors del pardejament. En aquest sentit, en estudis futurs es poden investigar altres agents inhibidors del pardejament del most com alternatius al SO₂. Pel que fa a la bioprotecció, es poden provar altres microorganismes que siguin capaços de consumir oxigen de la mateixa manera que *M. pulcherrima*, així com també l'aplicació en diferents moments del procés de vinificació. A més a més, es pot estudiar com aquests inhibidors actuen sinèrgicament. En concret, es pot provar l'efecte del glutatió juntament amb microorganismes per tal de reduir la utilització del SO₂, o inclús prescindir-ne.

Els resultats d'aquest treball han servit per redactar una comunicació que ha estat acceptada com a comunicació oral al 45TH World Congress of Vine and Wine (OIV).

5. Bibliografia

- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111, 1–14.
- Bahut, F., Romanet, R., Sieczkowski, N., Schmitt-Kopplin, P., Nikolantonaki, M., & Gougeon, R. D. (2020). Antioxidant activity from inactivated yeast: Expanding knowledge beyond the glutathione-related oxidative stability of wine. *Food Chemistry*, 325, 126941.
- Barril, C., Rutledge, D. N., Scollary, G. R., & Clark, A. C. (2016). Ascorbic acid and white wine production: A review of beneficial versus detrimental impacts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(2), 169–181.
- Bradshaw, M. P., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2001). Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 934–939.
- Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2023). Beneficial Effects of Red Wine Polyphenols on Human Health: Comprehensive Review. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(2), 782–798.
- Bustamante, M., Giménez, P., Just-Borras, A., Solé-Clua, I., Gombau, J., Heras, J. M., Sieczkowski, N., Gil, M., Canals, J. M., & Zamora, F. (2024a). Inoculation with a selected strain of *Metschnikowia pulcherrima* as a bioprotective alternative to sulphites for preventing browning of white grape must. *Oeno One*, 58(1), 1–10.
- Bustamante, M., Giménez, P., Just-Borras, A., Solé-Clua, I., Gombau, J., Heras, J. M., Sieczkowski, N., Gil, M., Pérez-Navarro, J., Gómez-Alonso, S., Canals, J. M., & Zamora, F. (2024b). Use of Glutathione, Pure or as a Specific Inactivated Yeast, as an Alternative to Sulphur Dioxide for Protecting White Grape Must from Browning †. *Foods*, 13(2), 310.
- Cejudo-Bastante, M. J., Castro-Vázquez, L., Hermosín-Gutiérrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2011). Combined effects of prefermentative skin maceration and oxygen addition of must on color-related phenolics, volatile composition, and sensory characteristics of Airén white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12171–12182.
- Chacon-Rodriguez, L., Joseph, C. M. L., Nazaris, B., Coulon, J., Richardson, S., & Dycus, D. A. (2020). Innovative Use of Non-*Saccharomyces* in Bio-Protection: *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* Applied to a Machine Harvester. *Catalyst: Discovery into Practice*, 4(2), 82–90.
- Cheynier, V., Souquet, J., & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic*, 40, 320–324.
- Clarke, S., Bosman, G., du Toit, W., & Aleixandre-Tudo, J. L. (2023). White wine phenolics: current methods of analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(1), 7–25.
- Claus, H. (2010). *Copper-Containing Oxidases: Occurrence in Soil Microorganisms, Properties, and Applications*. 281–313.
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., & du Toit, M. (2006). Oxygen in must and wine, a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 76–94.

- Gabrielli, M., Alexandre-Tudo, J. L., Kilmartin, P. A., Sieczkowski, N., & du Toit, W. J. (2017). Additions of glutathione or specific glutathione-rich dry inactivated yeast preparation (DYP) to sauvignon blanc must: Effect on wine chemical and sensory composition. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 18–28.
- Giménez, P. (2023). Study of mechanisms of the enzymatic oxidation of the grape must and of some possible alternative systems to sulfur dioxide for its prevention. Tesi doctoral Universitat Rovira i Virgili.
- Giménez, P., Anguela, S., Just-Borras, A., Pons-Mercadé, P., Vignault, A., Canals, J. M., Teissedre, P. L., & Zamora, F. (2022). Development of a synthetic model to study browning caused by laccase activity from *Botrytis cinerea*. *LWT*, 154, 112871.
- Giménez, P., Just-Borras, A., Pons, P., Gombau, J., Heras, J. M., Sieczkowski, N., Canals, J. M., & Zamora, F. (2023). Biotechnological tools for reducing the use of sulfur dioxide in white grape must and preventing enzymatic browning: glutathione; inactivated dry yeasts rich in glutathione; and bioprotection with *Metschnikowia pulcherrima*. *European Food Research and Technology*, 249(6), 1491–1501.
- Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine polyphenol content and its influence on wine quality and properties: A review. *Molecules*, 26(3), 718.
- Hernanz, D., Recamales, Á. F., González-Miret, M. L., Gómez-Míguez, M. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 80(1), 327–335.
- Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 35(2), 77–90.
- Kennedy, J. A., Saucier, C., & Glories, Y. (2006). Grape and Wine Phenolics: History and Perspective. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57(3), 239–248.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & Du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 269–277.
- Lea, A. G. H., Bridle, P., Timberlake, C. F., & Singleton, V. L. (1979). The procyanidins of white grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 289–300.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13.
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 3, 658–666
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Sapis, J. C., & Lee, C. Y. (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4), 441–486.
- Martinez, M. V., & Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6(6), 195–200.
- Michaelis, L., and Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.

- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126.
- Patel, P., Herbst-Johnstone, M., Lee, S. A., Gardner, R. C., Weaver, R., Nicolau, L., & Kilmartin, P. A. (2010). Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7280–7288.
- Peñalver, M. J., Fenoll, L. G., Rodríguez-López, J. N., García-Ruiz, P. A., García-Molina, F., Varón, R., García-Cánovas, F., & Tudela, J. (2005). Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33, 35–42.
- Peng, Z., Duncan, B., Pocock, K. F., & Sefton, M. A. (1998). The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(3), 127–135.
- Puyo, M., Simonin, S., Bach, B., Klein, G., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2023). Bio-protection in oenology by *Metschnikowia pulcherrima*: from field results to scientific inquiry. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1252973.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24(4), 361–375.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2000). *Handbook of Enology Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2nd Edition*. John Wiley & Sons.
- Salgues, M., Cheynier, V., Gunata, Z., & Wylde, R. (1986). Oxidation of Grape Juice 2-S-Glutathionyl Caffeoyle Tartaric Acid by *Botrytis cinerea* Laccase and Characterization of a New Substance: 2,5-di-S-Glutathionyl Caffeoyle Tartaric Acid. *Journal of Food Science*, 51(5), 1191–1194.
- Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12.
- Simonin, S., Honoré-Chedozeau, C., Monnin, L., David-Vaizant, V., Bach, B., Alexandre, H., Chatelet, B., & Tourdot-Marechal, R. (2022). Bioprotection on Chardonnay Grape: Limits and Impacts of Settling Parameters. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2022(1), 1489094.
- Simonin, S., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Peyron, D., Alexandre, H., & Tourdot-Maréchal, R. (2020). Bio-Protection as an Alternative to Sulphites: Impact on Chemical and Microbial Characteristics of Red Wines. *Frontiers in Microbiology*, 11, 548771.

- Singleton, V. L. (1987). Honorary Research Lecture Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1), 69–77.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 51–53.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., & Pifferi, P. G. (2000). Fining treatments of white wines by means of polymeric adjuvants for their stabilization against browning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4619–4627.
- Tsao, M. U., & Madley, T. I. (1972). Kinetic Properties of Phosphofructokinase of *Neurospora Crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 258, 99–105.
- Ugliano, M., Kwiatkowski, M., Vidal, S., Capone, D., Siebert, T., Dieval, J. B., Aagaard, O., & Waters, E. J. (2011). Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2564–2572.
- Vally, H., Misso, N. L. A., & Madan, V. (2009). Clinical effects of sulphite additives. In *Clinical and Experimental Allergy* (Vol. 39, Issue 11, pp. 1643–1651).
- Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F., & Teissedre, P. L. (2020). Oenological tannins to prevent *Botrytis cinerea* damage in grapes and musts: Kinetics and electrophoresis characterization of laccase. *Food Chemistry*, 316, 126334.
- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F., & Teissedre, P. L. (2018). Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 268, 210–219.
- Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P. L., & Zamora, F. (2019). Impact of oenological tannins on laccase activity. *Oeno One*, 53(1), 27–38.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21–36.
- Windholtz, S., Nioi, C., Coulon, J., & Masneuf-Pomarede, I. (2023). Bioprotection by non-*Saccharomyces* yeasts in oenology: Evaluation of O₂ consumption and impact on acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 405, 110338.