



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

Aplicación de glucosa oxidasa y  
catalasa para la reducción del grado  
alcohólico en vinos blancos

Alumno/a: Patricia Vicente Collantes

Tutor/a: José Manuel Rodríguez

Julio 2021

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	2
1. Introducción .....	3
2. Antecedentes .....	4
3. Objetivos .....	6
4. Material y métodos .....	6
4.1 Mosto .....	6
4.2 Enzimas .....	6
4.3 Análisis de los parámetros del mosto y vino .....	6
4.3.1 Acidez total y pH .....	6
4.3.2 Grado Brix y grado alcohólico probable .....	7
4.3.3 Intensidad de color y Color .....	7
4.3.5 Grado alcohólico .....	7
4.3.6 Determinación de glucosa .....	7
4.4 Ensayos enzimáticos .....	8
4.4.1 Estudio de la concentración de GOX .....	8
4.4.2 Estudio de la concentración CAT .....	8
4.4.3 Efecto de la agitación .....	8
4.4.4 Efecto del pH del mosto .....	9
4.4.5 Variación del volumen del biorreactor .....	9
4.4.6 Efecto de la aireación .....	9
4.4.7 Fermentación alcohólica .....	9
4.5 Análisis estadístico de los datos .....	10
5.1 Efecto de la concentración de GOX .....	10
5.2 Efecto de la concentración de catalasa .....	12
5.3 Efecto de la agitación .....	14
5.4 Efecto del pH .....	15
5.6 Efecto de la aireación .....	18
5.7 Fermentación alcohólica .....	19
6. Conclusiones y futuras líneas de investigación .....	22
7. Bibliografía .....	23

## RESUMEN

El cambio climático tiene una gran importancia en la fenología de la vid y la composición de la uva. Los últimos años se ha observado como los vinos tienen cada vez mayores concentraciones de azúcar, valores de pH más altos y una baja acidez; generando un desequilibrio que afecta al desarrollo de la vinificación.

En este trabajo preliminar, se ha estudiado el empleo de la enzima glucosa oxidasa como estrategia para reestablecer este equilibrio, reduciendo la concentración de glucosa y elevando, a su vez, la acidez del mosto. Para ello se han estudiado las condiciones de trabajo de la glucosa oxidasa con el fin de estudiar como influyen factores como el pH, la dosis de glucosa-oxidasa y de catalasa empleadas, la agitación, la aireación y el volumen de muestra. También se realizó una fermentación con el mosto tratado enzimáticamente frente a un control.

Los resultados mostraron reducciones en el contenido en glucosa del mosto hasta en un 50%, con bajadas en el grado alcohólico de entre 1,5 y 2,5 % Vol. respecto a la muestra control.

*Palabras clave:* Glucosa oxidasa, catalasa, vino, reducción de grado alcohólico, glucosa, ácido glucónico.

## ABSTRACT

Climate change is of great importance in the phenology of the vine and the composition of the grape. In recent years it has been observed that wines have increased sugar concentrations, high pH values and low acidity; generating an imbalance that affects the development of winemaking.

In this preliminary work, the use of the enzyme glucose oxidase has been studied as a strategy to reestablish this balance, reducing the concentration of glucose and, in turn, raising the acidity of the must. For this purpose, the working conditions of the glucose oxidase have been studied in order to study how factors such as pH, the dose of glucose oxidase and catalase used, agitation, aeration and sample volume influence. A fermentation was also carried out with the must enzymatically treated against a control.

The results showed reductions in the glucose content of the must by up to 50%, with drops in the alcohol content of between 1.5 and 2.5% Vol. with respect to the control sample.

*Keywords:* Glucose oxidase, catalase, wine, alcohol reduction, glucose, gluconic acid.

## 1. Introducción

El cambio climático está ejerciendo una influencia cada vez más importante sobre la fenología de la vid y la composición de la uva. Afecta a las vinificaciones, la microbiología y a la química del vino, así como a los aspectos sensoriales del mismo, (Mira, 2010), influyendo en la calidad del vino final (Martinez et al., 2016; Jones et al., 2005; Mira, 2010).

Comprender la importancia del cambio climático y su impacto sobre los diferentes ecosistemas ha ido ganando importancia los últimos años. El aumento de los niveles de gases de efecto invernadero y las variaciones en las características de la superficie de la tierra producen cambios en el balance de radiación, la circulación atmosférica y el ciclo hidrológico (Jones et al., 2005).

En líneas generales, los efectos más importantes relacionados con el cambio climático en los aspectos vitivinícolas son: una aceleración de la madurez de la uva, mayores concentraciones de azúcar que, como consecuencia, se traduce en altos niveles de alcohol en el vino, y una baja acidez (Martinez et al., 2016; Jones et al., 2005; Mira, 2010).

Las elevadas concentraciones de azúcar alcanzadas en los últimos años, pueden estar asociadas a la búsqueda de optimizar la madurez polifenólica (Martinez et al., 2016; Jones et al., 2005; Mira, 2010). Esta búsqueda por mejorar la concentración de polifenoles provoca una sobremaduración de la uva, disminuyendo la cantidad de agua en la baya por evaporación e incrementando la concentración de azúcar (Mira, 2010).

Por otro lado, si bien la acidez disminuye de forma natural durante el proceso de maduración de la uva, este descenso se ha visto intensificado los últimos años como consecuencia de la subida de la temperatura media, afectando principalmente al ácido málico (Mira, 2010). Sin embargo, este descenso en los niveles de acidez no se debe únicamente al aumento de las temperaturas; las concentraciones de potasio también se han visto incrementadas induciendo un aumento en los valores del pH y provocando una reducción del color en los vinos (Martinez et al., 2016; Mpelasoka et al., 2008). Esta disminución de la acidez en la uva tiene como consecuencia otros perjuicios añadidos, pues niveles de pH más altos generan una menor estabilidad del color en el vino. Esto, junto con mayores concentraciones de potasio, da lugar a peores condiciones de crianza en bodega (Martinez et al., 2016).

El incremento en los niveles de azúcar da lugar a problemas para llevar a cabo la fermentación, supone una mayor formación de subproductos fermentativos como glicerol y ácido acético, lo cual puede verse traducido en un descenso en la calidad del vino. Además, se genera una mayor presión osmótica, pudiendo afectar a la cinética fermentativa. Esta también puede verse perjudicada por un aumento de las cantidades de etanol, dificultando así el final de la fermentación alcohólica, complicando el proceso metabólico de las levaduras y pudiendo ocasionar paradas fermentativas (Martinez et al., 2016; Mira, 2010).

Asimismo, la fermentación maloláctica también puede verse comprometida, puesto que las bacterias lácticas toleran mejor menores concentraciones de alcohol y el

medio se vuelve más hostil para su crecimiento y desarrollo (Martinez et al., 2016; Mira, 2010)

Todo ello está llevando a productores y viticultores a la necesidad de disponer de herramientas que les permitan adaptarse a estos cambios para poder mantener la calidad de su producto (Mozell & Thach, 2014).

Con este objetivo, se ha tratado de paliar este efecto desde el campo, reduciendo previamente la concentración de azúcar en la baya, pero también aplicando técnicas una vez que la uva llega a la bodega. Para ello, se han empleado desde técnicas vitícolas que buscan incrementar el rendimiento de la planta, reducir la relación del área de la hoja/peso de la uva (Ozturk & Anli, 2014), hasta el empleo de técnicas vinícolas como diluir el mosto, realizar filtración con membrana, ósmosis inversa o el empleo de la enzima glucosa oxidasa (GOX) (Ozturk & Anli, 2014; Pickering, 2000)

## 2. Antecedentes

La enzima GOX es una flavoproteína que cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Imagen 1). En esta reacción, el oxígeno molecular se utiliza como aceptor de electrones. En primer lugar, la  $\beta$ -D-glucosa se oxida en presencia de oxígeno a  $\delta$ -glucono-1,5-lactona, el cual, a su vez, se hidroliza de manera espontánea a ácido D-glucónico (Bankar et al., 2009; Röcker et al., 2016). Generalmente la reacción enzimática de la GOX va acompañada de la enzima catalasa (CAT) para eliminar el  $H_2O_2$ .

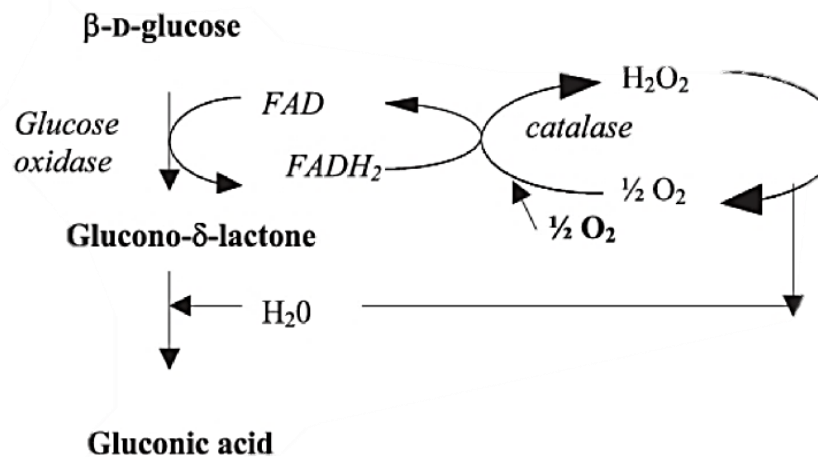


Imagen 1. Oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa (Botezatu et al., 2021).

La GOX se ha obtenido a partir de una diversidad de hongos, entre los que destacan los del género *Aspergillus* y *Penicillium*, de los cuales *Aspergillus niger* es el más empleado para su producción (Bankar et al., 2009).

La eficiencia de la actividad de la enzima está condicionada por factores como el pH, la temperatura o la aireación (Biyela et al., 2009). El pH óptimo de la enzima se sitúa entre los valores 5.0-7.0 (Bankar et al., 2009; Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998; Röcker et al., 2016), muy por debajo del pH del mosto.

Respecto a la temperatura de actuación, se sabe que las enzimas son sensibles a los cambios de temperatura, así como que su actividad aumenta de forma exponencial a medida que la temperatura asciende; en el caso de la GOX su actividad descendió con el aumento de la temperatura, debido a una disminución de la solubilidad del oxígeno (Biyela, 2008; Pickering et al., 1998).

Los primeros estudios del uso de la GOX en enología se realizaron con el objeto de elaborar vinos de baja graduación alcohólica. Pickering et al., 1999 realizaron un ensayo con la GOX en mostos de uva Riesling y Müller-Thurgau. Durante este proceso enzimático, primero se desacidificaba el mosto con carbonato de calcio hasta alcanzar un pH que se situase entre 5 y 6 para favorecer la actividad de la enzima; después se aireaba y agitaba el mosto logrando que se redujese el nivel de etanol hasta en un 40% respecto al control. Sin embargo, este aumento del pH genera notables alteraciones en las propiedades sensoriales del vino (Pickering et al., 1999b; Röcker et al., 2016).

Recientemente, se han publicado algunos estudios que abordan el uso de la enzima GOX para producir reducciones moderadas del grado alcohólico omitiendo la fase de desacidificación del mosto. En variedades tintas se han obtenido reducciones del 0,68% (v/v) del grado alcohólico del vino con uvas Pinotage (Biyela et al., 2009), sin embargo, reducciones más importantes del grado alcohólico (3,0-4,0%, v/v) han causado problemas de oxidación del color del mosto de uva Carmene (Valencia et al., 2017). En variedades blancas, Röcker et al., (2016) han logrado reducciones del grado alcohólico entre el 1,5-1,9% (v/v) en vinos Riesling y Pinot blanc de zonas vitivinícolas de climas fríos sin observarse modificaciones importantes en la calidad del vino.

Sin embargo, no existe estudios que aborden el uso de la enzima GOX en variedades de uva blanca de zonas vitivinícolas de climas cálidos como la variedad Verdejo. Además, a pesar de que durante este proceso enzimático se forma ácido glucónico que permite incrementar la acidez total de los mostos, no se ha profundizado en el uso de la GOX para la acidificación biológica de estos mostos (Botezatu et al., 2021).

### 3. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es estudiar las condiciones de aplicación de las enzimas GOX y CAT en mostos de uva Verdejo para reducir su contenido en azúcares e incrementar su acidez.

### 4. Material y métodos

#### 4.1 Mosto

El mosto empleado en los diferentes ensayos procede de la variedad Verdejo de la D.O Rueda. La composición básica del mosto se encuentra recogida en la Tabla 1. Este mosto siempre se esteriliza por vapor fluyente previamente a trabajar con él para eliminar la flora propia del mosto y así evitar el inicio de una fermentación alcohólica espontánea.

**Tabla 1.** Caracterización del mosto inicial.

	<b>Mosto</b>
<b>Grado (° BRIX)</b>	21,9 ± 0,1
<b>GAP (vol.%)</b>	12,75 ± 0,05
<b>pH</b>	3,49 ± 0,014
<b>AT (g/L TH2)</b>	4,3 ± 0,042
<b>IC (ABS)</b>	0,94 ± 0.01

Los datos representan la media de triplicados ± la desviación estándar (SD)  
AT= Acidez total; GAP= Grado alcohólico probable; TH2= Ácido tartárico

#### 4.2 Enzimas

Se empleó el preparado comercial Mono 10.000 BG (10.000 U/g) como fuente de GOX y Catazyme 25 L (25.000 U/g) como fuente de CAT (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark).

#### 4.3 Análisis de los parámetros del mosto y vino

Todas las mediciones han sido realizadas por duplicado, salvo las mediciones para la caracterización inicial del mosto, que fueron realizadas por triplicado. Los valores finales se expresan como la media aritmética de dichas mediciones y su desviación estándar.

##### 4.3.1 Acidez total y pH

Estas mediciones se llevan a cabo valiéndonos de un pH-metro.

La medida del pH se basa en la diferencia de potencial que existe entre el electrodo de referencia y el electrodo de medida, esta medida viene determinada por la ecuación de Nernst (OIV, 2009).

La acidez total es la suma de todas las acideces valorables cuando se lleva al vino a pH a 7 al adicionar una solución de hidróxido de sodio. La acidez se determinó empleando el método potenciométrico con la ayuda de un pH-metro (OIV, 2015).

#### 4.3.2 Grado Brix y grado alcohólico probable

Para determinar los azúcares del mosto se emplea un método que determina su concentración mediante el índice de refracción.

El grado alcohólico probable se determinó a partir del grado Brix, cuya relación viene determinada por la fórmula:  $G.A.P = (0.6757 * °BRIX_{20\text{ }^{\circ}\text{C}}) - 2.0839$  (García, Xirau, & Azorín, 2000).

#### 4.3.3 Intensidad de color y Color

El método CIE-LAB define el color a partir de unas coordenadas denominadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  que determinan un espacio tridimensional.

Para obtener dichas coordenadas es necesario medir las absorbancias a 450, 520, 570 y 630 nm mediante espectrofotometría. Los cálculos se realizaron a través del programa MSCV® de la Universidad de La Rioja. Este programa compara las coordenadas  $L^*$  (Luminosidad),  $C^*$  (Croma),  $h^*$  (Tonalidad),  $a^*$  (proporción rojo/verde), y  $b^*$  (proporción azul/amarillo) dentro del espacio CIE-LAB (Gilabert, 1998).

#### 4.3.4 Índice de polifenoles totales

Mediante espectroscopía UV se determina la absorción que presenta la muestra a una longitud de onda de 280 nm, puesto que el anillo bencénico de los polifenoles tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda (Zamora, 2003).

#### 4.3.5 Grado alcohólico

La determinación del grado alcohólico se llevó a cabo por ebulloimetría. Este se fundamenta en la diferencia entre los puntos de ebullición del agua y el alcohol, empleando para ello un ebulómetro. (García et al., 2000)

#### 4.3.6 Determinación de glucosa

Para la determinación de la glucosa hemos empleado un Kit de D-Fructosa / D-Glucosa (Megazyme, Sídney Australia). Este kit se fundamenta en que la D-Glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) con la formación simultánea de adenosina-5'-difosfato (ADP).

La glucosa-6-fosfato (G-6-P) es oxidada por la NADP a gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH. La cantidad de NADPH formada en esta reacción es estequiométrica con la cantidad de D-glucosa. Para cuantificar el aumento de NADPH se mide su absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro.



#### 4.3.7 Determinación de azúcares reductores

Para la determinación de los azúcares reductores, hemos empleado, del mismo modo que para la determinación de glucosa, el Kit de D-Fructosa / D-Glucosa (Megazyme, Sídney Australia). Este kit se fundamenta en que la D-Glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) con la formación simultánea de adenosina-5'-difosfato (ADP), de igual modo la fructosa da lugar a glucosa-6-fosfato (G-6-P) con la ayuda de una fosfoglucosa isomerasa, que cataliza la isomerización

#### 4.3.8 Determinación de la densidad

Se pesaron 10 ml de vino y, conociendo su masa y su volumen, se aplicó la fórmula de la densidad de un cuerpo  $\rho = \frac{m}{v}$  para determinar la densidad final del vino.

### 4.4 Ensayos enzimáticos

Durante el tratamiento enzimático de los diferentes ensayos, salvo en aquellos que se indique lo contrario, las muestras de mosto con las enzimas estuvieron en agitación constante con un agitador orbital SO1 (Stuart scientific, Stone, Staffordshire, Inglaterra) a 150 rpm, a una temperatura de 25 °C durante 24 horas. La dosis de GOX y de CAT fue de 10 UK/L con una relación GOX:CAT 1:1. El volumen de mosto empleado fue de 25 mL en matraces de 100 mL de capacidad. Se incluyó una muestra control a la que no se adicionaron enzimas.

Asimismo, todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Durante las 24 horas de duración del tratamiento enzimático se fueron tomando diferentes muestras de los mostos para después poder analizar su contenido en glucosa.

#### 4.4.1 Estudio de la concentración de GOX

El objetivo del primer ensayo fue estudiar el efecto de la concentración de GOX en la oxidación de la glucosa. Para ello, se estudiaron las concentraciones 0, 5, 10, 30 y 50 KU/L. Durante el ensayo se mantuvo la relación GOX:CAT (1:1).

#### 4.4.2 Estudio de la concentración CAT

Se abordó el efecto de la concentración de CAT en el proceso de oxidación de la glucosa para la GOX. Para llevar a cabo dicho ensayo, se ensayaron las concentraciones de 0, 10 y 20 KU/L de CAT y una concentración de GOX de 10 KU/L (relaciones de GOX:CAT de 1:0, 1:1 y 1:2).

#### 4.4.3 Efecto de la agitación

Se estudió cómo afectaba la agitación de las muestras en la oxidación de la glucosa. Para ello, empleando una dosis de GOX y de CAT de 10 KU/L (1:1) se mantuvieron unas muestras en un agitador orbital (150 rpm) durante 24 horas (Bankar et al., 2009), frente a otras que permanecieron estáticas en el interior de la estufa.

#### 4.4.4 Efecto del pH del mosto

Se modificó el pH inicial del mosto con NaOH (5N) y HCl (1N) para ensayar la oxidación de la glucosa por la GOX bajo diferentes niveles de pH (3,0, 3,4, 3,55 y 4,0).

#### 4.4.5 Variación del volumen del biorreactor

En este ensayo se modificó el volumen de mosto empleado, manteniendo la relación volumen del mosto y volumen del biorreactor. Se ensayaron volúmenes de 25, 125 y 250 mL de mosto en matraces Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 mL.

Durante las 24 horas de duración del tratamiento enzimático se determinó el pH del mosto y la concentración de glucosa.

#### 4.4.6 Efecto de la aireación

Para llevar a cabo este ensayo se aplicó a un volumen de 300 mL de mosto un flujo de aire de 0,5 L/h variando su tiempo de aplicación. En primer lugar, se aplicó el flujo de aire durante 1 hora y, en segundo lugar, se aplicó dicho flujo durante las 24 horas que duró el tratamiento enzimático del mosto.

Para la homogenización del flujo de aire aplicado, las muestras se mantuvieron en agitación constante con la ayuda de un agitador orbital (100 rpm). Se incluyó una muestra control a la que no se sometió a ningún flujo de aireación, pero si se mantuvo en agitación continua.

El flujo de aire se aplicó mediante el uso de un compresor AS186 (Ariston Thermo, Fabriano, Italia) a una presión de 3 bar. En el tubo de aireación se colocó un filtro de 0,20 µm para esterilizar el aire inyectado.

#### 4.4.7 Fermentación alcohólica

Para comprobar el potencial real de la enzima y como se traduce el descenso de glucosa en descenso de grado alcohólico, se realizaron las fermentaciones alcohólicas de los mostos tratados en el ensayo anterior (ver 4.4.6). Se llevaron a cabo 3 fermentaciones alcohólicas diferentes: un mosto control (no tratado enzimáticamente) frente al mosto tratado con las enzimas GOX y CAT y agitación y al mosto tratado con las enzimas y sometido a flujo de aireación 0,5 L/min durante 24 horas.

La levadura empleada para llevar a cabo la fermentación fue *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (LALVIN EC1118™, Lallemand, Montreal Canadá) a una dosis de 40 g/hL. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C con un volumen de 200 mL en matraces Erlenmeyer de 500 mL cerrados con válvulas Müller.

Para simular unas condiciones de fermentación reales se adicionó metabisulfito potásico (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) para alcanzar una dosis de 50 mg/L de sulfuroso total.

El seguimiento de la fermentación alcohólica se realizó controlando la liberación de CO<sub>2</sub> mediante la pérdida de peso. La fermentación se consideró finalizada cuando la pérdida de peso alcanzó un valor constante y se constató evaluando la cantidad de azúcares reductores residuales.

## 4.5 Análisis estadístico de los datos

Para llevar a cabo el tratamiento estadístico de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion 18-X64. Las diferencias estadísticas significativas entre muestras se determinaron por la prueba de LSD ( $p < 0.05$ ).

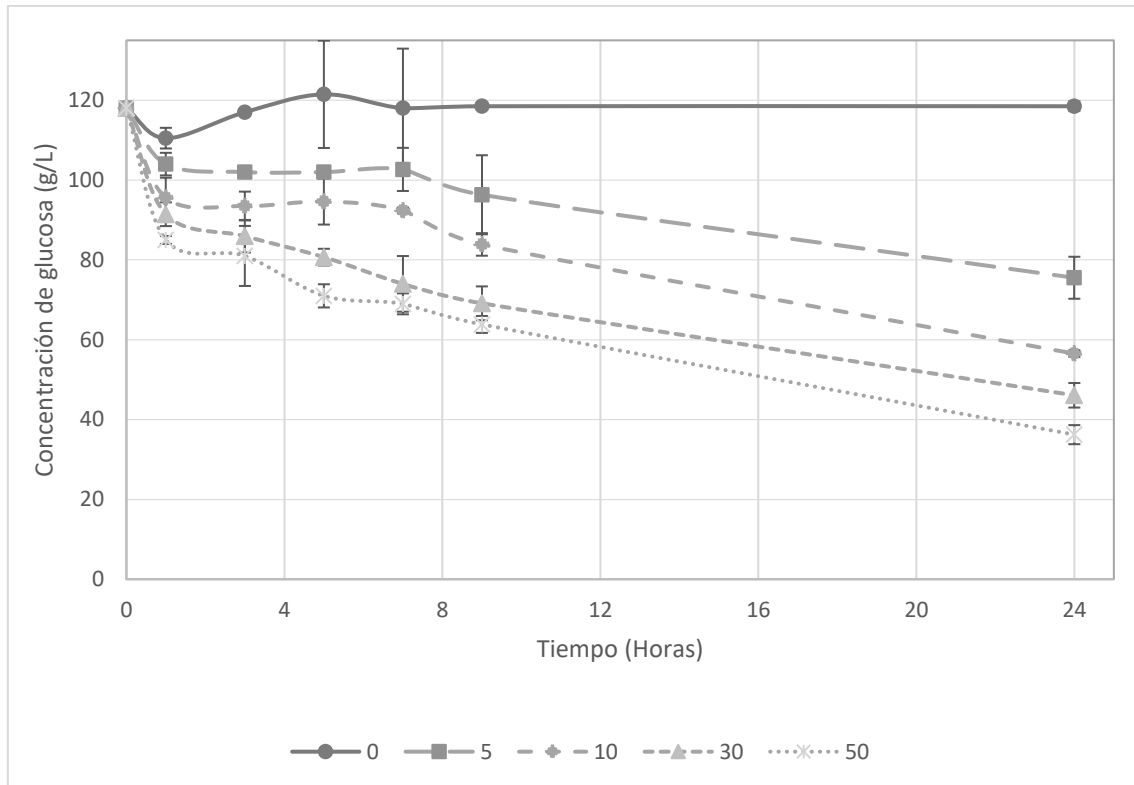
## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Efecto de la concentración de GOX

Como hemos comentado en el punto 4.4.1, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de GOX para observar las diferencias de oxidación de la glucosa. Asimismo, nos valió para determinar la concentración de GOX a emplear en los siguientes ensayos.

En relación con las diversas concentraciones estudiadas, los resultados obtenidos indicaron que una mayor dosis de enzima suponía una mayor oxidación de glucosa. En la figura 1 podemos ver claramente este fenómeno, donde la dosis más alta (50KU/L) presenta la mayor oxidación de glucosa; esta oxidación supone una disminución de hasta el 75 % en la concentración de glucosa en el mosto después de 24 h de tratamiento, respecto al control. Asimismo, observamos como el control se mantiene estable en el tiempo, mientras que el resto de las muestras descienden de forma lineal y paralela entre ellas.

Estos resultados coinciden con los reportados por diversos autores (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998), los cuales observaron un incremento en la reducción de glucosa a medida que se incrementaba la dosis de GOX empleada.



**Figura 1.** Evolución de la concentración glucosa (g/L) en función de la dosis de enzima (GOX) durante las 24 horas de tratamiento. Media  $\pm$  Desviación estándar (n=2). La concentración de enzima esta expresa en KU/L.

El estudio de la varianza de los datos nos mostró diferencias estadísticamente significativas para la concentración de glucosa a las 24 h entre las muestras de mosto tratadas con distinta concentración de GOX, como podemos ver a continuación en la tabla 2.

**Tabla 2.** Concentración final de glucosa (g/L) en función de la dosis de GOX.

Concentración GOX matraz (KU/L)	Concentración de glucosa final (g/L)
Control	118,5 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>
5	75,5 $\pm$ 5,3 <sup>b</sup>
10	56,5 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
30	46,1 $\pm$ 3,1 <sup>d</sup>
50	36,2 $\pm$ 2,4 <sup>e</sup>

Los resultados representan la media  $\pm$  desviación estándar (SD).

Valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes (p<0,05).

La concentración de GOX y CAT del control es de 0 KU/L.

En base a los resultados obtenidos se decidió que la concentración que más se ajustaba a los objetivos del trabajo era 10 KU/L. Las diferencias de glucosa transformada entre la dosis de GOX más alta (50 KU/L) frente a la dosis de 10 KU/L no suponen una diferencia lo suficientemente importante que justifique el gasto económico de emplear una mayor cantidad de enzima. Asimismo, el objetivo de este trabajo es no superar descensos de 2% en grado alcohólico, lo que supone aproximadamente una reducción de 17 g/L de glucosa por grado alcohólico.

Según el reglamento (CE) N° 606/2009 de la comisión de 10 de julio de 2009 que fija determinadas disposiciones en lo relativo a las categorías de productos vitícolas, las prácticas enológicas y las restricciones aplicables, se autoriza la desalcoholización; esta no puede ser superior al 2 % vol. Sin embargo, aunque no autoriza el empleo de enzimas para la reducción de grado alcohólico, nos valemos de este valor como referencia para nuestro estudio.

## 5.2 Efecto de la concentración de catalasa

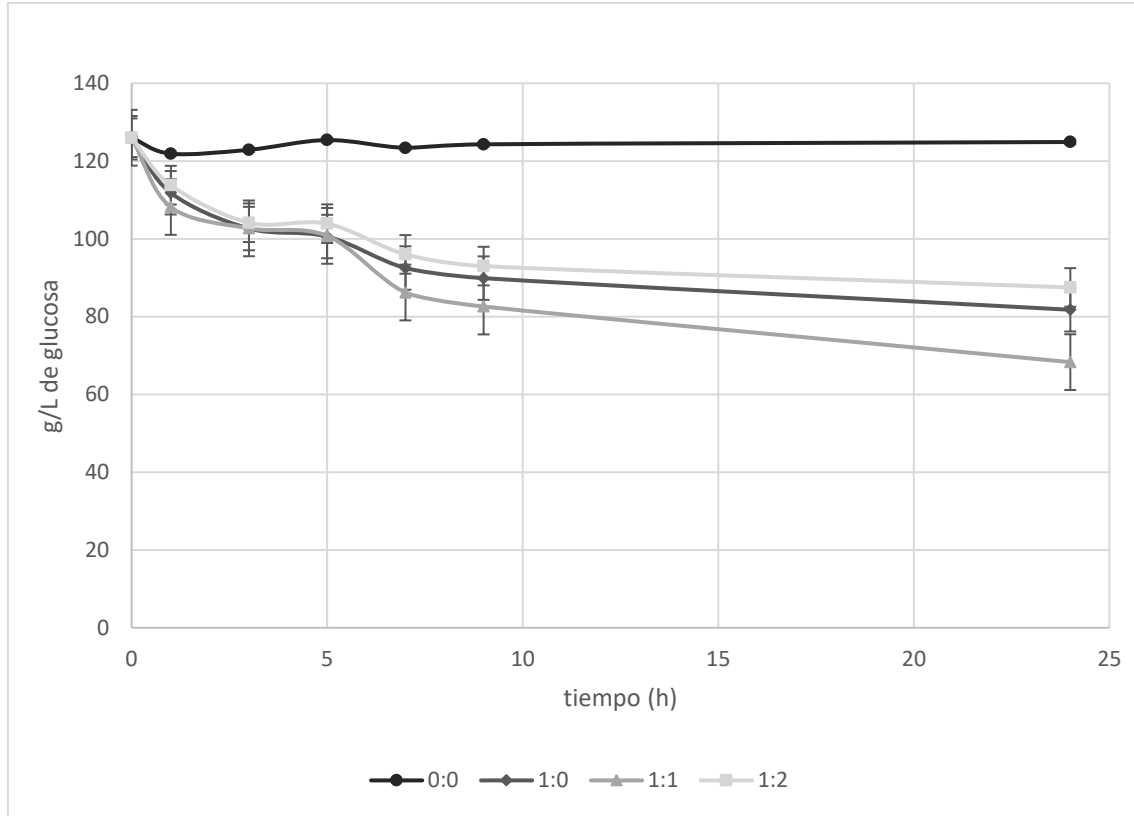
Como hemos comentado en el apartado 4.4.2, se abordó el efecto de la concentración de CAT en el proceso de oxidación de la glucosa. Para realizar dicho estudio, se ensayaron las concentraciones de 0, 10 y 20 KU/L de CAT y una concentración de GOX de 10 KU/L (relaciones de GOX:CAT de 1:0, 1:1 y 1:2) incluyendo una muestra control a la cual no se adicionó las enzimas.

La catalasa tiene la función de hidrolizar el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  evitando la acumulación de agua oxigenada en el medio (Röcker et al., 2016). Asimismo, el oxígeno liberado en esta reacción podría ser empleado por la GOX para llevar a cabo la oxidación de la glucosa (Valencia et al., 2017). La presencia de agua oxigenada conlleva problemas en el color de los vinos, pues esta oxida los pigmentos rojos del mosto (Valencia et al., 2017), así como produce la oxidación de los flavonoles, dando lugar a mostos de variedades blancas de color parduzco y dorado (Pickering et al., 1999b).

Además, la acumulación de el  $H_2O_2$  conlleva una desactivación enzimática de la GOX (Bankar et al., 2009; Röcker et al., 2016a; Wong et al., 2008) e incluso puede causar problemas durante la fermentación alcohólica (Röcker et al., 2016; Villettaz, 1986)

A priori, los resultados reflejados en la figura 2 parecen mostrar que la presencia de catalasa favorece la oxidación de la glucosa. Sin embargo, el análisis de varianza (tabla3) muestra que no existen diferencias significativas para la concentración de glucosa a las 24 h de tratamiento entre los distintos tratamientos enzimáticos.

Röcker et al. (2016), observó que un aumento en la dosis de CAT no reflejó una mayor concentración final de ácido glucónico como resultado de la oxidación de la glucosa. Sin embargo, una mayor concentración de catalasa si supuso una disminución en la concentración final de  $H_2O_2$ .



**Figura 2.** Evolución de la concentración de glucosa (g/L) en función de la relación GOX:CAT durante las 24 horas de tratamiento Media  $\pm$  Desviación estándar (n=2).

**Tabla 3.** Concentración final de glucosa (g/L) en función de la dosis de CAT.

Concentración CAT matraz (KU/L)	Concentración de glucosa final (g/L)
<b>Control</b>	124,9 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
<b>0</b>	81,8 $\pm$ 0,4 <sup>bc</sup>
<b>10</b>	68,3 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>
<b>20</b>	87,5 $\pm$ 2,1 <sup>bc</sup>

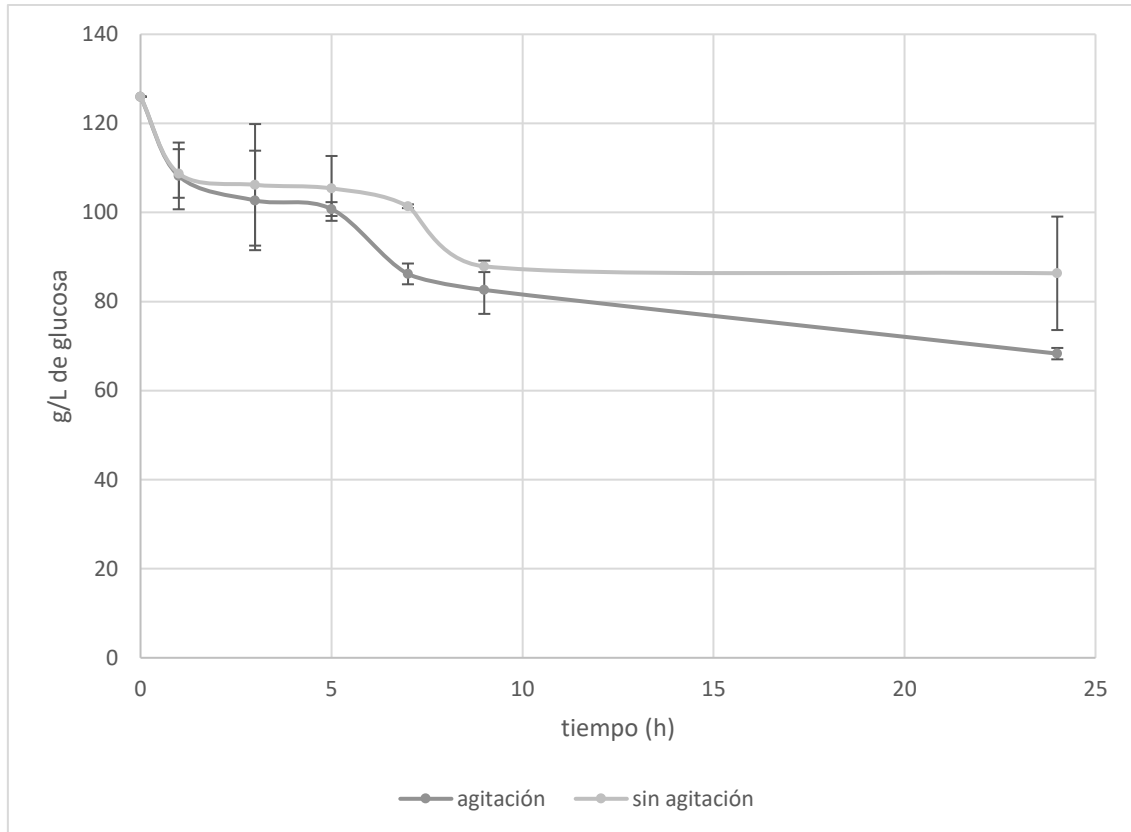
Los resultados representan la media de cuatro medidas  $\pm$  desviación estándar (SD).

Valores en la misma columna con la misma letra indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

La concentración de GOX y CAT del control es de 0 KU/L.

### 5.3 Efecto de la agitación

Como hemos comentado, el oxígeno es fundamental para que la GOX pueda oxidar la glucosa a  $\beta$ -D-glucono- $\delta$ -lactona. Por ello, en este apartado se quiso estudiar el efecto de la agitación (ver 4.4.3) en la oxidación de glucosa.



**Figura 3.** Evolución de la concentración de glucosa (g/L) en función de si las muestras fueron agitadas durante las 24 horas de tratamiento. Media  $\pm$  Desviación estándar (n=2).

En el gráfico se puede observar cómo las muestras sometidas a agitación orbital de 150 rpm tuvieron un mayor descenso en los g/L de glucosa finales. A las 24 h esta diferencia respecto al control si presenta una diferencia estadísticamente significativa (Tabla 4). Bankar et al. (2009) observó un incremento de eficacia de la enzima GOX cuando empleó un sistema de agitación en el mosto, lo que incrementó la concentración de oxígeno disuelto en el mismo. Esto se explica porque el correcto funcionamiento de la GOX requiere oxígeno para llevar a cabo la transformación de la glucosa en ácido glucónico (Biyela et al., 2009).

**Tabla 4.** Concentración final de glucosa (g/L) para los ensayos de agitación

Concentración CAT matraz (KU/L)	Concentración de glucosa final (g/L)
<b>Control</b>	121,0 ± 1,4 <sup>a</sup>
<b>Con agitación</b>	68,3 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>Sin agitación</b>	86,3 ± 1,3 <sup>c</sup>

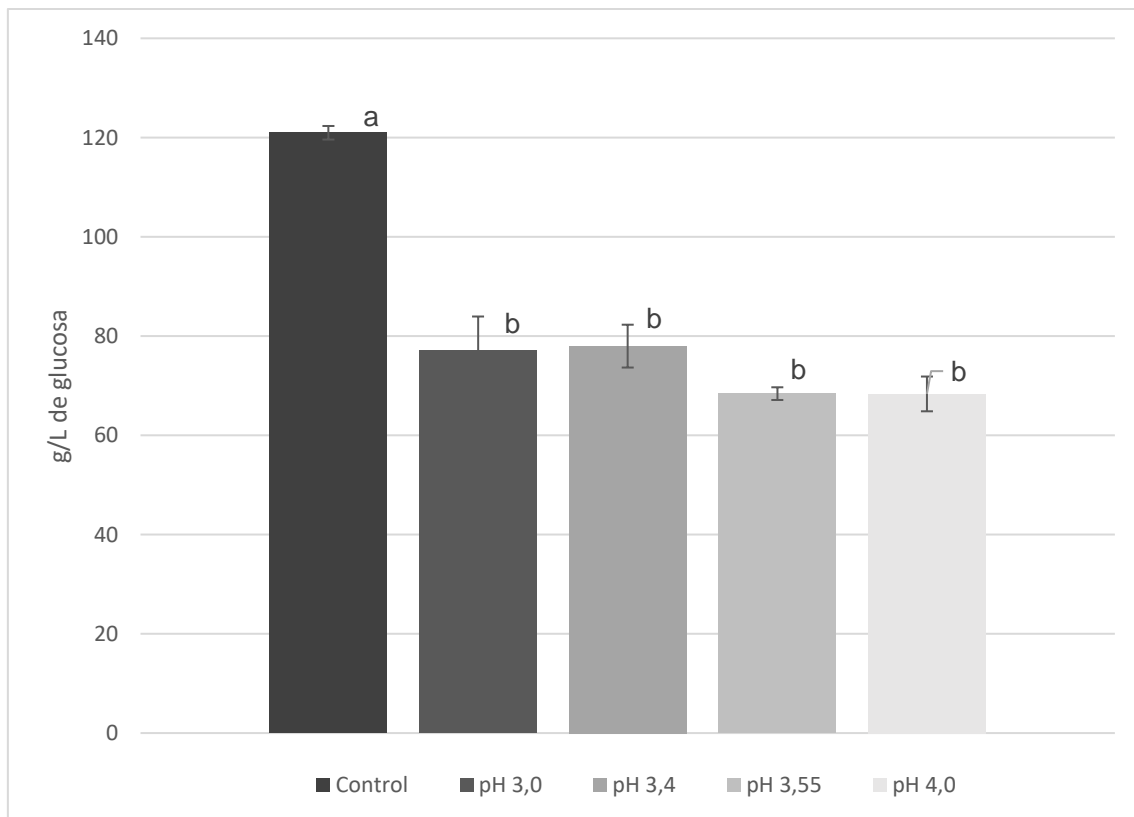
Los resultados representan la media de cuatro medidas ± desviación estándar (SD).

Valores en la misma columna con la misma letra indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

La concentración de GOX y CAT del control es de 0 KU/L.

#### 5.4 Efecto del pH

El pH es uno de los principales factores que limitan la actividad catalítica de la enzima (Pickering et al., 1998). El mosto tiene un pH que se aleja del rango óptimo (5,0-7,0) de trabajo de la GOX (Bankar et al., 2009; Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998; Röcker et al., 2016); por ello se quiso abordar el efecto del pH (ver 4.4.4) en el proceso de oxidación de la glucosa partiendo de niveles de pH similares a los que se pueden encontrar en un mosto.



**Figura 5.** Concentración final de glucosa (g/L) en función de los diferentes valores iniciales de pH del mosto a las 24 horas de tratamiento. Media ± Desviación estándar (n=2).



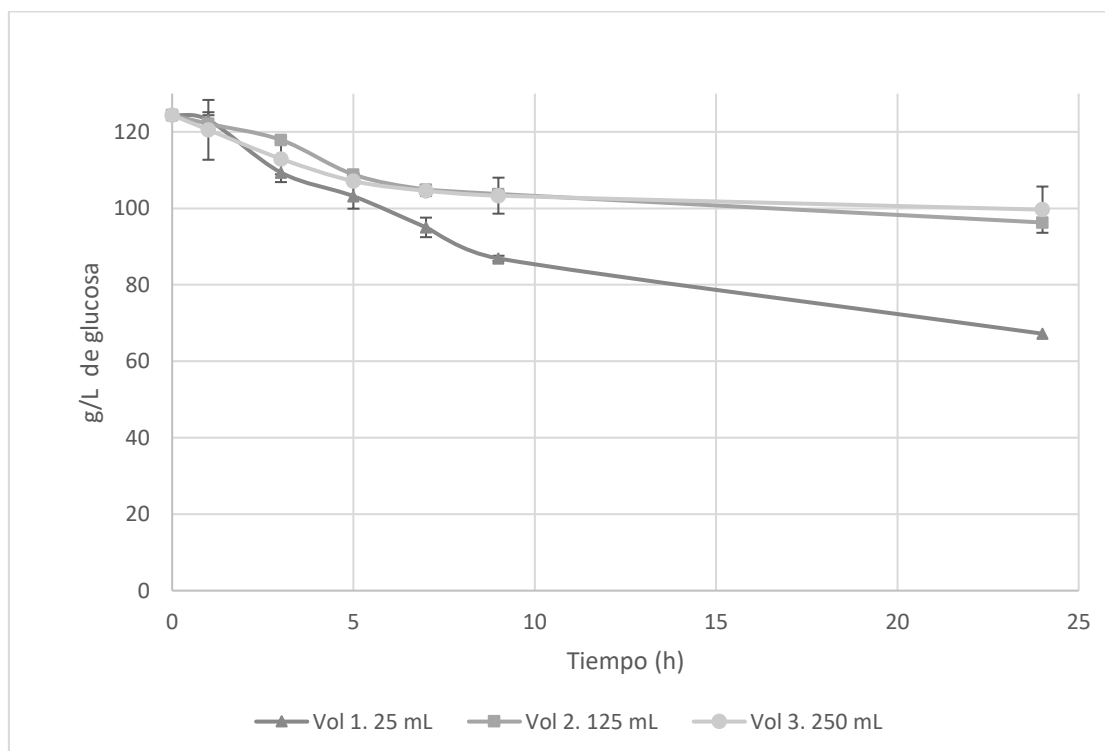
Como puede observarse en la figura 5, no hay grandes diferencias en la concentración final de glucosa, si bien es cierto que los pH más básicos sufrieron un mayor descenso en los niveles finales de glucosa; sin embargo, el análisis de varianza de dichos datos no mostró diferencias significativas entre los diferentes puntos.

Una explicación probable puede ser que la dosis de enzima empleada sea lo suficientemente alta para compensar las diferencias de pH ensayadas (Biyela et al., 2009). Además, el intervalo de pH que hemos estudiado es muy estrecho (pH 3,0-4,0) respecto al intervalo de pH donde la enzima GOX presenta actividad (2,5-8,0), lo que podría hacer que el comportamiento de la enzima bajo nuestras condiciones de ensayo sea similar. Se ha descrito que un incremento del pH de 3,0 a 4,0 causa un ligero aumento de su actividad (~12%), subiendo notablemente (~75%) cuando el cambio de pH es del 4,0 al 6,0 (Godfrey et al., 1996).

Para conseguir un funcionamiento óptimo de la enzima algunos autores han propuesto una etapa previamente para modificar el pH del mosto (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1999a) o buscar otras alternativas como la inmovilización de la enzima para mejorar el pH del microentorno de la enzima y así superar el obstáculo que supone el bajo pH del mosto (Ruiz et al., 2018).

### 5.5 Efecto del volumen del mosto

En este ensayo como se puede ver en el punto 4.4.5, se modificó el volumen de mosto empleado, manteniendo la relación volumen del mosto y volumen del biorreactor. Se ensayaron volúmenes de 25, 125 y 250 mL de mosto en matraces Erlenmeyer de 100, 500 y 1000 mL, respectivamente.

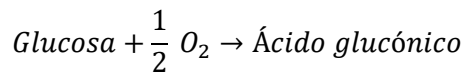


**Figura 5.** Evolución de la concentración glucosa (g/L) en función de los diferentes volúmenes de mostos durante las 24 horas de tratamiento. Media  $\pm$  Desviación estándar (n=2).

En la figura 5 se puede observar como en los matraces de mayor volumen se reduce notablemente la transformación de la glucosa después de 24 horas de tratamiento. El tratamiento Vol 1. 25 mL representa un porcentaje de oxidación de glucosa cercano al 50%, mientras que el Vol.2 125 mL y Vol 3. 250 mL suponen una menor oxidación de alrededor del 20%. Además, cabe destacar que entre estos últimos volúmenes no se observan diferencias estadísticas al realizar el análisis de varianza ( $p < 0.05$ ).

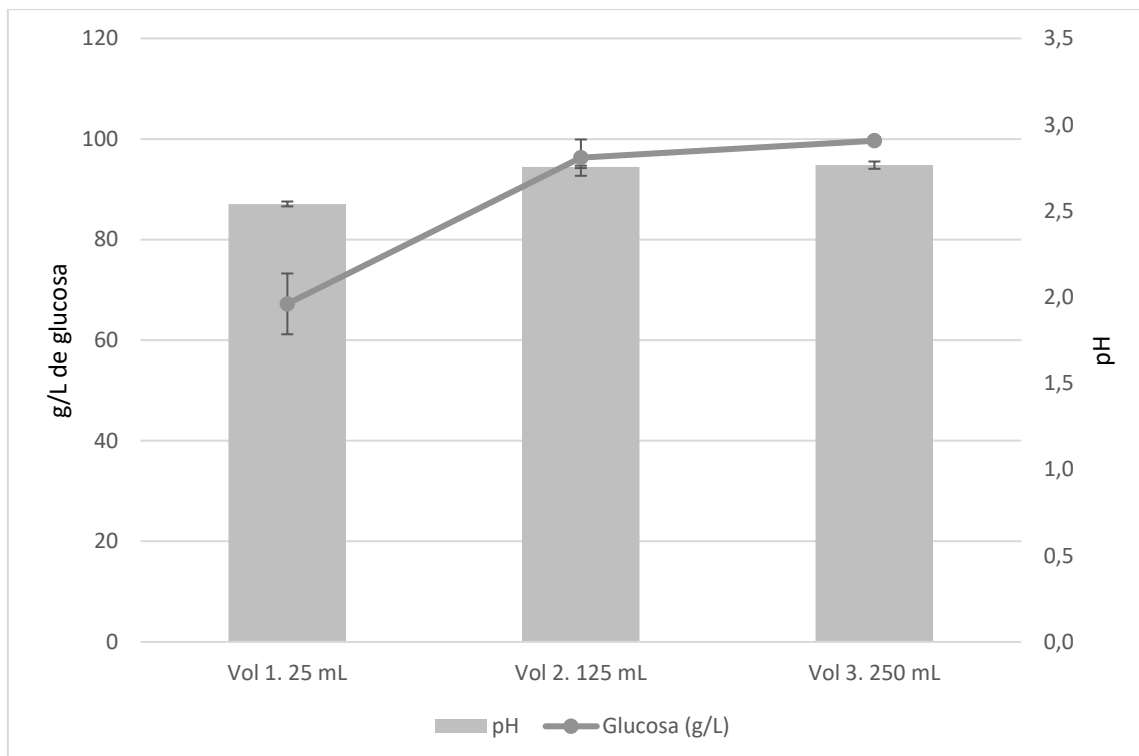
Una posible explicación frente a este ensayo puede ser que la agitación que estamos realizando no es suficiente para proporcionar el suficiente  $O_2$  a la enzima GOX, ya que cuanto mayor es el volumen de mosto mayor es la cantidad de glucosa que se va a oxidar y por lo tanto mayor es la cantidad de  $O_2$  que necesita la GOX.

Teniendo en cuenta que la oxidación de la glucosa viene determinada por la siguiente reacción simplificada:



Podemos calcular que, para oxidar 1 g de glucosa a ácido glucónico es necesaria una cantidad de 0,088 g de oxígeno. Por lo tanto, una mayor cantidad de glucosa requerirá una mayor cantidad de oxígeno para llevar a cabo la oxidación.

Durante este ensayo también quisimos estudiar el descenso de pH durante las 24 horas de tratamiento enzimático.



**Figura 6.** Concentración de glucosa (g/L) y pH a las 24 de tratamiento en función de los diferentes volúmenes de mostos. Media  $\pm$  Desviación estándar ( $n=2$ ).

En la figura 6 podemos observar cómo se relacionan el descenso de glucosa y el descenso en el nivel de pH. La GOX cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (Bankar et al., 2009; Röcker et al., 2016), disminuyendo la concentración de azúcar y aumentando la acidez del mosto. Esto se ve reflejado en el gráfico donde el mayor descenso de glucosa tiene asociado un mayor descenso en el valor del pH. En el caso de nuestro mosto, partíamos de un pH inicial de 3,5, llegando a bajar hasta 2,6 en la muestra Vol 1. 25 mL.

Otros ensayos también mostraron bajadas de pH significativas; Pickering et al., (1998) observaron cambios de pH en mostos de la variedad Riesling tras el tratamiento enzimático, donde pasaron de un pH inicial de 3,01 a un pH final de 2,56 aplicando una dosis de 2 g/L de GOX. Otro estudio más reciente reflejó como el tratamiento con una dosis de 30 KU de Gluzyme Mono 10.000 BG durante 6 horas suponía un ligero descenso de -0,11 en el valor final del pH (Biyela et al., 2009).

En nuestro caso la bajada de pH es muy acusada debido también a un importante descenso en la concentración de la glucosa, lo que hace necesario ajustar adecuadamente la cantidad máxima de glucosa que se pueda transformar y que no genere una importante reducción en el pH del mosto. Este elevado descenso de pH conduce a mostos muy ácidos, generando un impacto sensorial significativo (Röcker et al., 2016).

Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el cambio climático está modificando la composición de los mostos; los efectos más importantes en los aspectos vitivinícolas son: mayores concentraciones de azúcar, valores de pH altos y una baja acidez (Martinez et al., 2016; Jones et al., 2005; Mira, 2010). Es por esta razón por la que el uso de la enzima glucosa oxidasa puede ser una estrategia para corregir este equilibrio, reduciendo la concentración de glucosa al tiempo que aumenta la acidez del mosto (Biyela et al., 2009; Biyela, 2008; Ozturk et al., 2014; Röcker et al., 2016; Valencia et al., 2017).

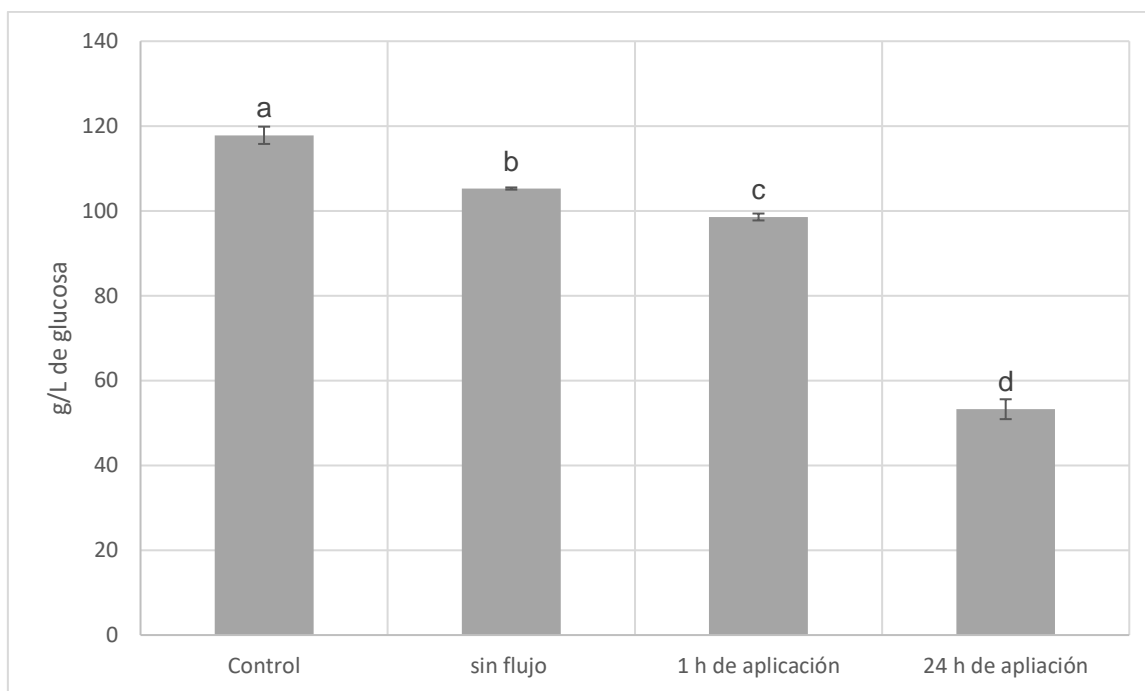
## 5.6 Efecto de la aireación

Como se explicó en el apartado 4.4.6 de material y métodos, se abordó el efecto de aplicar un flujo de 0,5 h/L de aire al mosto variando el tiempo de aplicación de dicho flujo. Al primer lote de mosto se aplicó el flujo de aire durante 1 hora y, al segundo lote se aplicó dicho flujo durante las 24 horas que duró el tratamiento enzimático del mosto; además se incluyó una muestra control a la que no se sometió a ningún flujo de aireación (figura 7).

En este ensayo observamos como la aplicación de aire reduce la concentración final de glucosa, siendo una reducción muy notable a mayor tiempo de aplicación.

Las muestras sometidas a aireación durante las 24 horas de tratamiento enzimático presentaron una oxidación de glucosa superior al 50%, frente a una reducción cercana al 20 % de la muestra aireada durante la primera hora del tratamiento enzimático. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente por otros autores como Biyela et al. (2009).

Sin embargo, uno de los principales problemas de una excesiva aireación del mosto es el impacto final en el análisis sensorial. Esta tiene como consecuencia un descenso en los aromas primarios de frutas (Pickering et al., 1999a; Röcker et al., 2016a) y en el color del mosto (Pickering et al., 1999b; Valencia et al., 2017). Es por ello, que es crítico tener un adecuado control de la aireación del mosto para alcanzar la concentración de oxígeno disuelto necesario para obtener la reducción en glucosa deseada y, de este modo, minimizar los problemas sensoriales asociadas a la aireación.



**Figura 7.** Concentración final de la glucosa (g/L) en función del tiempo de aplicación del flujo de aire (0.5 h/L). Media  $\pm$  Desviación estándar (n=2).

## 5.7 Fermentación alcohólica

Para finalizar el trabajo, se quiso comprobar cómo se traducía el descenso de glucosa en el grado alcohólico final del vino. Para ello se realizaron diferentes fermentaciones partiendo de los mostos tratados en el ensayo anterior (ver 4.4.7).

Durante el desarrollo de las fermentaciones alcohólicas tuvimos una parada fermentativa en el matraz que había sido sometido al flujo de aireación de 0,5 L/h (M2). Este mosto presentaba el pH más bajo y la mayor acidez dando lugar a un medio hostil para el desarrollo de las levaduras. Se procedió a una segunda siembra de levaduras, pudiendo dar por finalizada la fermentación alcohólica a una densidad de 0,99 g/mL, que luego se confirmó con un análisis de los azúcares reductores.

Una vez finalizó la fermentación se procedió a analizar diferentes parámetros fisicoquímicos (tabla 5) y estudiar las diferencias respecto al control tras el tratamiento enzimático y tras la fermentación alcohólica.

**Tabla 5.** Parámetros fisicoquímicos de los mostos y vinos tratados enzimáticamente frente al control (sin tratamiento enzimático)

	Mosto sin fermentar			Vino terminado		
	Mosto tratado enzimáticamente			Mosto tratado enzimáticamente		
	Control	M1	M2	Control	M1	M2
<b>pH</b>	3,49 ± 0,014 <sup>c</sup>	2,86 ± 0,01 <sup>b</sup>	2,61 ± 0,012 <sup>a</sup>	3,40 ± 0,0 <sup>r</sup>	2,88 ± 0,05 <sup>s</sup>	2,82 ± 0,02 <sup>s</sup>
<b>Acidez total (g/L TH2)</b>	4,3 ± 0,042 <sup>a</sup>	15,5 ± 0,47 <sup>b</sup>	33,8 ± 3,57 <sup>c</sup>	5,6 ± 0,03 <sup>r</sup>	17,0 ± 0,70 <sup>s</sup>	34,2 ± 1,78 <sup>t</sup>
<b>BRIX</b>	21,9 ± 0,1	ND	ND	ND	ND	ND
<b>% GAP</b>	12,75 ± 0,05	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Etanol (%Vol.)</b>	ND	ND	ND	12,75 ± 0,07 <sup>r</sup>	11,23 ± 0,05 <sup>s</sup>	10,30 ± 0,42 <sup>t</sup>
<b>Intensidad de color</b>	0,94 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,48 ± 0,01 <sup>t</sup>	2,56 ± 0,00 <sup>r</sup>	2,33 ± 0,05 <sup>r</sup>	4,34 ± 0,44 <sup>s</sup>
<b>IPT</b>	9 ± 0,11 <sup>a</sup>	13 ± 0,47 <sup>b</sup>	11 ± 0,11 <sup>c</sup>	18 ± 1,66 <sup>r</sup>	16 ± 5,33 <sup>s</sup>	15 ± 0,45 <sup>s</sup>
<b>L*</b>	93,65 ± 0,49 <sup>c</sup>	58,45 ± 0,79 <sup>a</sup>	90,80 ± 0,55 <sup>b</sup>	6,15 ± 0,07 <sup>r</sup>	11,35 ± 1,20 <sup>s</sup>	26,48 ± 0,38 <sup>t</sup>
<b>C*</b>	11,145 ± 0,23 <sup>b</sup>	25,57 ± 1,09 <sup>c</sup>	9,20 ± 0,49 <sup>a</sup>	5,59 ± 0,014 <sup>r</sup>	9,31 ± 0,21 <sup>s</sup>	13,725 ± 0,32 <sup>t</sup>
<b>h*</b>	98,89 ± 0,14 <sup>c</sup>	78,34 ± 1,28 <sup>a</sup>	89,30 ± 0,95 <sup>b</sup>	54,63 ± 0,03 <sup>r</sup>	67,40 ± 2,17 <sup>s</sup>	79,87 ± 0,59 <sup>t</sup>
<b>a*</b>	-1,725 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,60 <sup>c</sup>	0,04 ± 0,38 <sup>b</sup>	3,235 ± 0,01 <sup>s</sup>	3,58 ± 0,25 <sup>t</sup>	2,42 ± 0,15 <sup>r</sup>
<b>b*</b>	11,015 ± 0,23 <sup>b</sup>	25,04 ± 1,08 <sup>c</sup>	9,20 ± 0,07 <sup>a</sup>	4,56 ± 0,14 <sup>r</sup>	8,59 ± 0,33 <sup>s</sup>	13,53 ± 0,32 <sup>t</sup>
<b>densidad (g/mL)</b>	ND	ND	ND	0,9980 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,9890 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,9930 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Glucosa (g/L)</b>	119,3 ± 2,0 <sup>c</sup>	105,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	53,3 ± 2,3 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	ND	ND	ND	0,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,0 ± 0,2 <sup>b</sup>

Los resultados representan la media ± desviación estándar (SD).

Los resultados representan el efecto del tratamiento enzimático en mostos de los parámetros fisicoquímicos y el efecto de la fermentación alcohólica.

ND: No datos; M1: Mostro tratado enzimáticamente y en agitación; M2: Mostro tratado enzimáticamente y con un flujo de aire de 0.5 L/h.

El control no fue tratado con las enzimas GOX y CAT.

Valores en la misma fila con la misma letra indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los mostos (a, b y c) o los vinos (r, s y t) (p<0,05).

El principal objetivo del empleo de la GOX es la reducción del grado alcohólico al tiempo que se aumenta la acidez del mosto. En la tabla 5 se puede observar el importante efecto que tiene el empleo de la enzima en ambos parámetros.

El pH del mosto baja de forma pronunciada unido junto a un importante incremento en los valores de la acidez, como hemos comentado en el apartado 5.4.

El grado alcohólico de los vinos presenta una reducción significativa. El mosto control después de la fermentación alcanza un grado alcohólico de 12,8 % Vol. mientras que el grado alcohólico de las muestras M1 y M2 descendieron a 11,2 y 10,3 % Vol., respectivamente. El descenso de la concentración de glucosa en las muestras de mosto M1 y M2 se ve traducido en un menor grado alcohólico.

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras, ruta glicolítica, van a transformar la glucosa en etanol gracias a un conjunto de diferentes reacciones (Suárez et al., 2004). La reducción de azúcares fermentables tendrá asociado consigo la reducción del grado alcohólico final del vino (Bankar et al., 2009; Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998; Valencia et al., 2017; Wong et al., 2008; Ozturk et al., 2014).

Como hemos comentado, el otro objetivo que se busca con el empleo de la GOX es subir la acidez y bajar el pH del mosto. En la tabla 5 vemos como el tratamiento enzimático con la GOX tiene un fuerte impacto en el valor final del pH y de la acidez total. La muestra M1 experimenta una disminución de 0,63 unidades en el pH y un incremento de 11,2 g/L en la acidez total, mientras que en la muestra M2 se observa una reducción de 0,88 unidades de pH y un aumento de 29,5, g/L en la acidez total. Como se ha comentado anteriormente es importante tener en cuenta estos valores de cara al empleo de la GOX y ajustar la reducción del grado alcohólico para que la acidificación del mosto no sea excesiva.

En cuanto al IPT y el color, en los mostos M1 y M2 se observó un ligero incremento en el IPT, respecto al mosto control, mientras que en la intensidad de color y en los índices cromáticos no se observa una tendencia clara. Por otro lado, estos vinos (M1 y M2) presentaron un menor valor en el IPT que el vino control, si bien se observó un incremento en la intensidad de color en el vino M2. Además, este vino (M2) presentó un alto valor positivo para el parámetro cromático  $b^*$  relacionado con un color amarillo más intenso. Esto puede deberse a una excesiva oxigenación del mosto, si bien no se ha podido confirmar en los datos observados en el mosto, ya que esta muestra sufrió una para de la fermentación quedando temporalmente desprotegido de la oxidación del  $O_2$ .

## 6. Conclusiones y futuras líneas de investigación

Tras el estudio de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Una mayor dosis de GOX permite una mayor disminución en la concentración de glucosa en el mosto Verdejo.
- Un aumento en la dosis de catalasa no mejora la eficacia en la reducción de la concentración de glucosa.
- La aplicación de un flujo de aire durante el tratamiento enzimático mejora la actividad de la GOX.
- Un aumento en el volumen del biorreactor supone una mayor cantidad de glucosa en el medio y, en consecuencia, una mayor necesidad de oxígeno para mejorar la efectividad de la GOX durante el tratamiento enzimático.
- Una reducción de glucosa próxima al 50% supone un descenso de casi un punto en el valor final del pH y un incremento en la intensidad del color amarillo del vino.
- La agitación del mosto mejora la eficacia en la reducción de la concentración de glucosa.
- El rango del pH del mosto de 3,0 a 4,0 el comportamiento de GOX es similar.

En futuras investigaciones se debería ensayar la eficacia de la GOX en mostos que presenten un alto contenido en azúcares, baja acidez y elevado pH, y ver su incidencia en la calidad del mosto y el vino. Además, es preciso controlar la concentración de oxígeno disuelto en el mosto para provocar la reducción de glucosa deseada con el objetivo de evitar su excesiva aireación que pueda dar lugar a problemas de oxidación.

## 7. Bibliografía

- A. Martínez, Tudó, A. J. ., & J.L, A. (2016). Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos. *Enovicultura*, 42(septiembre|octubre 2016), 4–26.
- Bankar, S. B., Bule, M. V, Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase — An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489–501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>
- Biyela, B N E, Toit, W. J., Divol, B., Malherbe, D. F., & Rensburg, P. Van. (2009). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono ® 10 . 000 BG-treated grape juice. *South African Journal of Enology and Viticultura*, 30(June 2009), 124–132.
- Biyela, Busisiwe Nokukhanya E. (2008). *Evaluating the effect of different winemaking techniques on ethanol production*.
- Botezatu, A., Elizondo, C., Bajec, M., & Miller, R. (2021). Enzymatic Management of pH in White Wines. *Molecules*, 26, 2730. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26092730>
- García, J., Xirau, M., & Azorín, R. (2000). Técnicas usuales de análisis en enología. *Panreac*, 1–64.
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., & Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73(3), 319–343. <https://doi.org/10.1007/s10584-005-4704-2>
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Mozell, M. R., & Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry : Challenges & solutions. *Wine Economics and Policy*, 3, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>
- Mpelasoka, B. S., Schachtman, D. P., & Treeby, M. T. (2008). A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(March), 154–168. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00265.x>
- OIV. (2009). *Determination of pH Type I method OIV-MA-BS-13*. 1–7.
- OIV. (2015). *COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS - OIV Total acidity. Type I Method OIV-MA-AS313-01* (pp. 1–3). pp. 1–3.
- Ozturk, B., & Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web of Conferences*, 3, 02012. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20140302012>
- Pickering, G J, Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, 31(10), 685–692. Retrieved from [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00046-0)
- Pickering, G J, Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999a). The production of reduced-



- alcohol wine using Glucose Oxidase-treated Juice. Part III. Sensory. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 307–316.
- Pickering, G J, Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999b). The production of reduced-alcohol wine using Glucose Oxidase treated juice. Part I. Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 291–298.
- Pickering, Gary J. (2000). Low and Reduced-alcohol Wine : A Review Low- and Reduced-alcohol Wine : A Review. *Journal of Wine Research*, 2(January), 129–144. <https://doi.org/10.1080/0957126002000157>
- Röcker, J., Schmitt, M., Pasch, L., Ebert, K., & Grossmann, M. (2016). The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chemistry*, 210, 660–670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.093>
- Ruiz, E., Busto, M. D., Ramos-Gómez, S., Palacios, D., Pilar-Izquierdo, M. C., & Ortega, N. (2018). Encapsulation of glucose oxidase in alginate hollow beads to reduce the fermentable sugars in simulated musts. *Food Bioscience*, 24, 67–72. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2018.06.004>
- Suárez Lepe, J. ., & Íñigo Leal, B. (2004). *Microbiología enológica. Fundamento de Vinificación. 3ª Edición.*
- Valencia, P., Espinoza, K., Ramirez, C., Franco, W., & Urtubia, A. (2017). Technical Feasibility of Glucose Oxidase as a Prefermentation Treatment for Lowering the Alcoholic Degree of Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(3), 386–389. <https://doi.org/10.5344/ajev.2017.16005>
- Villettaz, J. (1986). A new method for the produciton of low alcohol wines and better balanced wines. *Australian Industrial Publishers*, (19), 125–128.
- Wong, C. M., Wong, K. H., & Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase : natural occurrence , function , properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 927–938. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>