



---

**Universidad de Valladolid**

Máster Universitario en Calidad, Desarrollo e  
Innovación de Alimentos

Trabajo Fin de Máster

# Reducción de glucosa y acidificación simultáneas de un mosto de uva Verdejo mediante el sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa

AUTOR: Sergio Tejedor Guerra

TUTOR: José Manuel Rodríguez Nogales

Julio de 2022

## RESUMEN:

En las últimas décadas, se están empezando a ver los efectos producidos por el cambio climático, generando un impacto negativo en diferentes especies, algunas de una gran importancia económica como es el caso de la vid. Un aumento de la temperatura provoca cambios en la fenología de la vid y, por ende, en la composición de la uva.

Cada vez es más frecuente encontrar mostos con una alta concentración de azúcares y una baja acidez como consecuencia del calentamiento global. Los vinos producidos se caracterizan por presentar un alto contenido de alcohol y una alteración organoléptica producida por la subida del pH y el consecuente descenso de la acidez.

En este estudio se aplicaron las enzimas glucosa oxidasa y catalasa a mosto de uva Verdejo con alto contenido de azúcares y alto pH con el fin de conseguir una bajada en la concentración de azúcares del mosto a través de la conversión de glucosa en ácido glucónico, que tras la fermentación esta bajada de azúcares se verá reflejada como una disminución del grado alcohólico, y un aumento de la acidez en el vino intentando así paliar los efectos del cambio climático producidos sobre la vid. Se obtuvieron reducciones notables en el grado alcohólico del vino, entre 1,3-2,7 unidades, sin obtenerse valores de pH excesivamente bajos.

Palabras clave: Glucosa oxidasa, catalasa, vid, uva, Verdejo, grado alcohólico, ácido glucónico.

## SUMMARY

In the last few decades, the effects of climate change are beginning to be seen, generating a negative impact on different species, some of which are of great economic importance, such as the vine. An increase in temperature causes changes in the phenology of the vine and, therefore, in the composition of the grape.

It is increasingly common to find musts with a high concentration of sugars and low acidity as a result of global warming. The wines produced are characterized by a high alcohol content and an organoleptic alteration caused by the rise in pH and the consequent decrease in acidity.

In this study, the glucose oxidase and catalase enzymes are applied to Verdejo grape must with high sugar content and pH in order to achieve a drop in the concentration of sugars in the must through the conversion of glucose into gluconic acid, which after fermentation it will be reflected as a decrease in the alcoholic degree and an increase in the acidity of the wine, thus trying to mitigate the effects of climate change on the vine. Notable reductions were obtained in the wine alcoholic degree, between 1.3-2.7 units, without obtaining excessively low pH values.

Keywords: Glucose oxidase, catalase, vine, grape, Verdejo, alcoholic degree, gluconic acid.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	5
2. OBJETIVOS .....	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
3.1. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL MOSTO Y FERMENTACIÓN .....	11
3.2. ANÁLISIS DE MOSTOS Y VINOS .....	13
3.2.1. ACIDEZ TOTAL.....	13
3.2.2. pH.....	13
3.2.3. ACIDEZ VOLÁTIL.....	14
3.2.4. DENSIDAD .....	14
3.2.5. GRADOS BRUX Y GAP.....	14
3.2.6. GRADO ALCOHÓLICO.....	14
3.2.7. COLOR. MÉTODO GLORIES .....	15
3.2.8. COMPUESTOS FENÓLICOS .....	15
3.2.8.1. IPT .....	15
3.2.8.2. DETERMINACIÓN DE FLAVONOLES .....	16
3.2.8.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS .....	16
3.2.9. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y FRUCTOSA.....	16
3.2.10. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO .....	16
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
4.1. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MOSTOS .....	17
4.1.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS MOSTOS .....	21
4.2. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE VINOS .....	22
4.2.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE VINOS .....	25
5. CONCLUSIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	27

# 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas a los que tiene que hacer frente el ser humano es el calentamiento global generado por las incesantes emisiones de gases de efecto invernadero que son expulsados a la atmosfera a diario.

Estas emisiones provocan un desequilibrio entre la radiación solar entrante y la radiación infrarroja reemitida por la tierra ya que los gases de efecto invernadero permiten la entrada de los rayos solares, pero no su salida generando así un aumento de la temperatura global (Anderson et al., 2016).

Es un hecho que la temperatura de la tierra está aumentando anualmente, como también es una realidad que no se están tomando las medidas necesarias para hacer frente a este problema.

Cabe mencionar que el calentamiento global es un proceso totalmente natural, la gravedad del problema radica en que el ser humano está acelerando ese proceso mediante las incesantes emisiones de gases de efecto invernadero.

En la siguiente imagen podemos observar el aumento de la temperatura media global desde 1960:

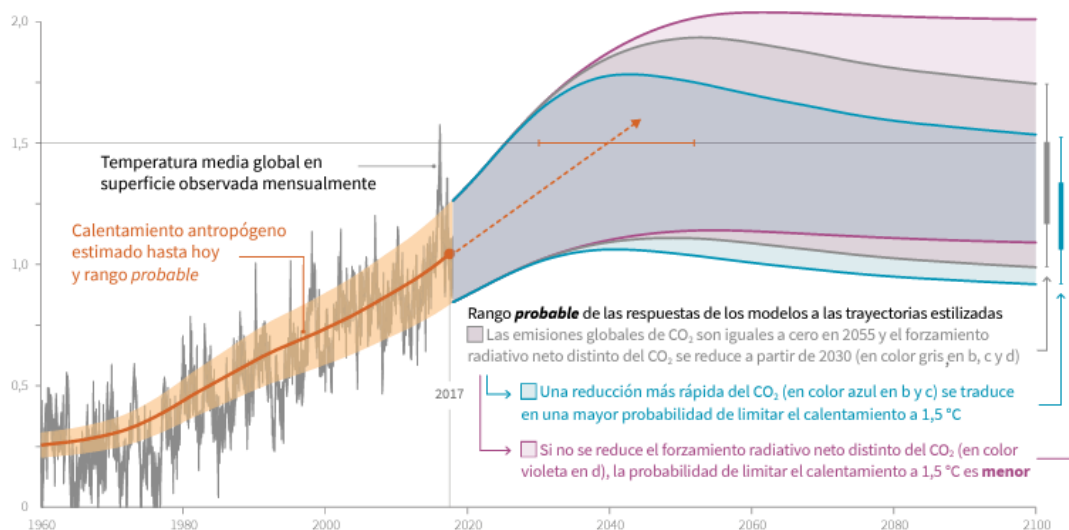


Ilustración 1: Informe del IPCC (IPCC, 2022). En esta imagen podemos comprobar el cambio en la temperatura media global en superficie y el calentamiento global antropogénico estimado.

Las estimaciones muestran que la temperatura de la tierra aumentará entre 1,0°C y 3,7°C a lo largo del siglo XXI dependiendo del ritmo de las emisiones de gases de efecto invernadero (Anderson et al., 2016).

Un aumento de tan solo 1°C trae consigo una serie de catastróficas consecuencias al planeta. Una de las especies que se verá afectada por este aumento de la temperatura global será *Vitis vinífera*.

Los efectos del cambio climático son cada vez más preocupantes en la fenología de la vid ya que el cambio en las variables climáticas (aumento de temperatura, disminución de precipitaciones, etc....) afectan directa e indirectamente a la calidad de la uva, modificando su microbiota y, por ende, generando vinos con características físico-químicas y sensoriales diferentes (Sánchez et al., 2019).

Aunque la vid es una especie euriterma, es decir, tolera un amplio abanico de temperaturas, el aumento de temperatura hará que su cultivo se traslade hacia otras latitudes, generando grandes pérdidas socio-económicas en países con un fuerte sector vitivinícola (Mira et al., 2010).

Solo en 2019 la industria vinícola generó más de 370 billones de dólares. Por lo que conocer qué efectos genera el cambio climático en la fenología de la vid y cómo disminuir o eliminar esos efectos adquiere una gran importancia tanto a nivel económico como social.

De forma general los principales efectos que el cambio climático ejerce sobre la vid de forma directa son los siguientes:

- Aceleración de la madurez de la uva provocando una vendimia adelantada. Actualmente ya se ven vendimias adelantadas en Francia, España, Alemania y California (Mira et al., 2010).
- Mayor concentración de azúcares en la uva generando tras la vendimia vinos con un alto grado alcohólico y, en consecuencia, con una disminución de su contenido en ácidos y un aumento del pH (Martínez et al., 2016).
- Disminución de síntesis de antocianos e incluso la inhibición de la formación de estos compuestos lo que se traduce en una reduciendo del color de la uva (Martínez et al., 2016).
- Deshidratación de la uva (a causa de las sequias) que sumado al estrés físico que sufre la propia uva por las altas temperaturas hacen que la uva sea mucho más sensible a un crecimiento de microorganismos, así como a un aumento de los procesos oxidativos disminuyendo la calidad de la uva (Martínez et al., 2016).

Uno de los problemas que más preocupa a la comunidad científica y a la industria vinícola es el aumento de las concentraciones de azúcares y la bajada de acidez de las uvas motivado por el cambio climático.

Una elevada cantidad de azúcar va a generar un aumento de la presión osmótica de la levadura desembocando en paradas fermentativas (Martínez et al., 2016). Además, debido a que se generan vinos con un mayor contenido en etanol, siendo esta una sustancia tóxica para las levaduras, se dificulta el final del proceso de fermentación. El problema se agrava ya que también afecta a la fermentación maloláctica puesto que las bacterias lácticas son incapaces de tolerar las altas concentraciones de alcohol que se generan impidiendo que se realice esta fermentación (Mira et al., 2010).

Adicionalmente al aumento en la concentración de azúcares se ha de tener en cuenta la bajada de acidez de la uva ya que este factor condiciona la calidad organoléptica del vino, así como la actividad de las levaduras y bacterias.

Si la acidez disminuye los vinos se vuelven planos y sin frescor, en cambio si la acidez aumenta el vino resulta agresivo siendo en ambos casos un problema para el consumidor final (Vargas et al., 2007).

Debido a la problemática actual en torno a la incapacidad de encontrar un equilibrio entre las tres maduraciones de la uva (fenólica, aromática e industrial), dando lugar a vendimias desequilibradas y mostos con una alta concentración de azúcares y una baja acidez. Existen diferentes técnicas que buscan disminuir o mitigar los efectos producidos por el cambio climático, estas técnicas se encuentran divididas en tres grandes grupos (Sam et al., 2021):

- Técnicas pre-fermentativas: Este grupo comprende el conjunto de técnicas que tienen como objetivo reducir el contenido en azúcar de los racimos de uva mediante el uso de diversas prácticas vitícolas (Sánchez et al., 2019, Sam et al., 2021) o en mosto de uva mediante el uso de las enzimas glucosa oxidasa-catalasa (GOX-CAT) (Röcker et al., 2016).
- Técnicas fermentativas: Hace referencia al conjunto de técnicas aplicadas durante la fermentación del mosto que tienen por objetivo reducir la producción de alcohol, en este grupo destacan las siguientes técnicas:
  - Uso de levaduras no *C. cerevisiae* y/o uso de levaduras genéticamente modificadas.
  - Reducción de biomasa, una reducción de la biomasa conlleva una disminución de la población de levaduras lo que se traduce en una baja fermentación de los azúcares presentes (Sam et al., 2021).
  - Inhibir o limitar el proceso fermentativo, de modo que no se hayan consumido todos los azúcares fermentativos, este método conlleva a la

aparición de características organolépticas indeseadas en los vinos producidos (Sam et al., 2021)

- Técnicas post-fermentativas: Conjunto de técnicas aplicadas sobre el vino una vez fermentado el mosto que buscan reducir la concentración de etanol por diferentes medios generalmente mediante filtración por membranas, destacan:
  - Empleo de ósmosis inversa para disminuir la concentración final de etanol en vino (Ozturk et al., 2014).
  - Nanofiltración: Consiste en el uso de una membrana semipermeable para separar compuestos según el tamaño de los poros situados en la membrana, preserva las características organolépticas del vino (Salgado et al., 2017).
  - Destilación osmótica, esta técnica posee la ventaja de que no se produce un daño térmico a los componentes del vino y que apenas se alteran las características organolépticas del vino (Salgado et al., 2017).

Tanto la industria enológica como la comunidad científica ve en el uso del complejo enzimático GOX-CAT una de las alternativas para evitar las consecuencias del calentamiento global en la vid.

La GOX es una glicoproteína dimérica dependiente de favín-adenín-dinucleótido (FAD), que cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa, por la vía de la D-glucano- $\delta$ -lactona, hacia ácido glucónico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que posteriormente por acción de la catalasa genera  $H_2O$  y  $O_2$ , usando el  $O_2$  como aceptor final de electrones (Zoghbi et al., 2008; Röcker et al., 2016).

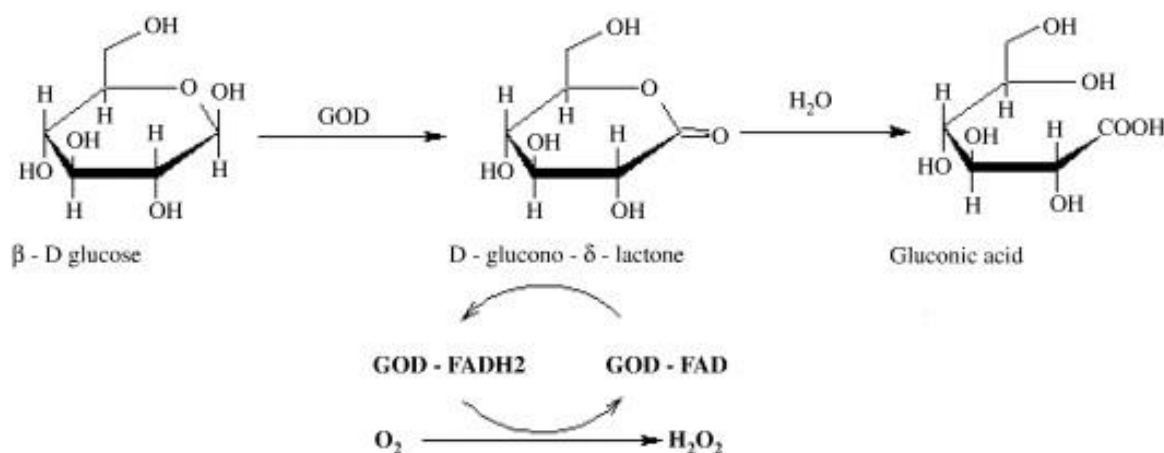


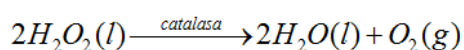
Ilustración 2: Proceso oxidativo de la glucosa por la acción de la glucosa oxidasa (Bankar et al., 2009)



Como podemos observar en la ilustración 2, el proceso de la enzima GOX se puede dividir en dos reacciones, una reacción reductiva en la que se genera ácido glucónico y una reacción oxidativa en la que la enzima GOX reducida (GOX-FADH<sub>2</sub>) es reoxidada gracias al oxígeno generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Bankar et al., 2009; Botezatu et al., 2021).

Las primeras extracciones de la glucosa oxidasa fueron realizadas por Müller en 1928, a partir de las cepas *Aspergillus niger* y *Penicillium glaucum* (Röcker et al., 2016).

Como hemos visto anteriormente para el correcto funcionamiento de la GOX adicionalmente a esta enzima se añade la enzima CAT la cual es una enzima perteneciente a la categoría de las oxidorreductasas que tiene como cofactor al grupo hemo y al manganeso que cataliza la descomposición (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en oxígeno y agua (Nelson et al., 2017).



*Ilustración 3: Acción de la enzima CAT sobre el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nelson & Cox, 2017)*

En la aplicación sobre vinos el rendimiento del sistema GOX-CAT estará condicionado por diversos factores como son:

- **pH:** El pH óptimo se encuentra entre 5,5-6,0 (Röcker et al., 2016) siendo un pH muy superior al pH de los vinos que serán tratados, los cuales se encuentran en torno a un pH de 3,0-3,3.
- **Temperatura:** Una alta temperatura provocará una disminución de la solubilidad de O<sub>2</sub> disuelto lo que se traduce en una parada de la reacción enzimática (Röcker et al., 2016; Botezatu et al., 2021). La temperatura óptima para que la enzima GOX pueda catalizar la reacción difiere según autores. Los estudios de Caridis et al. (1991) sugieren que la temperatura óptima para la enzima GOX es de 32,3°C mientras que para la CAT es de 18,1°C, sin embargo, otros autores como Hatzinikolaou and Macris (1995) encuentran la temperatura óptima de actuación de la enzima GOX en 27,5°C.
- **Aireación:** La aireación es un factor condicionante para la actividad enzimática ya que la enzima es oxígeno dependiente, se inactiva con concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, razón por la que se adiciona la enzima catalasa (Bankar et al., 2009).

Como podemos ver se necesitan unas condiciones concretas de temperatura, pH y aireación para que la enzima GOX pueda alcanzar un rendimiento óptimo

Los primeros estudios del uso del complejo enzimático GOX-CAT se remontan a 1998 donde Pickering et al. (1998) realizaron varios ensayos sobre mostos de uva blanca Riesling y Müller-Thurgau para elaborar vinos de baja graduación alcohólica. Emplearon carbonato cálcico para incrementar el pH de los mostos a un valor de 6,0 con el objetivo de aumentar el rendimiento enzimático, obteniendo una gran disminución de etanol de cerca del 42%, aunque se alteraron las características organolépticas de los vinos.

No es hasta 2009 cuando Biyela et al. (2009) vuelven a evaluar el uso de la GOX-CAT, pero con el objetivo de obtener vinos con una reducción moderada de su grado alcohólico y así mitigar los efectos del cambio climático. Con mosto de uva tinta Pinotage a pH 3,5, se obtuvieron ligeras reducciones del grado alcohólico del vino elaborado en torno a 0,5% (v/v). Posteriormente, Röcker et al., (2016) en mosto blanco Pinoc blanc a pH 3,4 y 3,5, obtuvieron reducciones algo superiores de alrededor del 2,0% (v/v), obteniéndose vinos con perfiles aromáticos alterados, junto con una gran bajada del pH (2,7-2,8). Valencia et al. (2017) alcanzaron una reducción de etanol del 3% en vinos procedentes de mostos de uva tinta Carmenere a pH 3,5, no obstante, esta técnica tuvo efectos negativos sobre el color de los vinos causados por una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el mosto al emplearse una insuficiente concentración de CAT. Recientemente, los ensayos realizados en uva blanca Verdejo a pH 3,5 consiguieron una adecuada reducción del grado alcohólico de los vinos (~2,5%, v/v) pero con una acidificación excesiva del vino (pH < 3,0) (Vicente, 2021). Botezatu et al. (2021) emplearon la enzima GOX con un objetivo distinto a los estudios anteriores, ya que pretendían incrementar la acidez de los mostos de uva Riesling con un alto pH (3,9-4,0), obteniéndose vinos con pH de 3,2-3,5.

Como podemos ver hasta ahora, en todos los estudios se consigue disminuir el grado alcohólico del vino, aunque también se produce una alteración de las características organolépticas del vino debido, principalmente, a una reducción exagerada del pH (pH ≤ 3,0). Estos resultados ponen de relieve que se ha de focalizar la aplicación de la GOX-CAT a mostos con un alto pH, donde la acidificación provocada por la oxidación de la glucosa no sea tan acusada.

En este sentido, en este trabajo se presentan los resultados alcanzados con el uso de la GOX-CAT en mostos de uva Verdejo ricos en azúcares y con un alto pH (3,8-4,0). A diferencia de los estudios citados anteriormente, la aplicación de GOX-CAT no se ha realizado en todo el volumen de mosto, si no en una sola fracción que, posteriormente, se mezcló con mosto sin tratar enzimáticamente, para evitar una excesiva aireación del volumen total de mosto que condujese a una alteración del color del mosto.

## 2. OBJETIVOS

Disminuir simultáneamente el grado alcohólico y el pH del vino elaborado con mosto de la variedad Verdejo con un alto contenido en azúcares y pH mediante un tratamiento con las enzimas GOX y CAT.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DEL MOSTO Y FERMENTACIÓN

Todo el mosto de uva utilizado para realizar el siguiente estudio pertenece a la variedad Verdejo de la D.O Rueda. El mosto fue obtenido de la bodega cooperativa 4 Rayas situada en Serrada, Valladolid. La fecha de la vendimia fue el 04/10/2021 y se embotelló el 07/10/2021, una vez embotelladas las botellas de mosto se mantuvieron congeladas a una temperatura estable de  $-20^{\circ}\text{C}$

A continuación, en la ilustración 4 podemos observar el diagrama de flujo utilizado para obtener los diferentes mostos que posteriormente fueron fermentados.

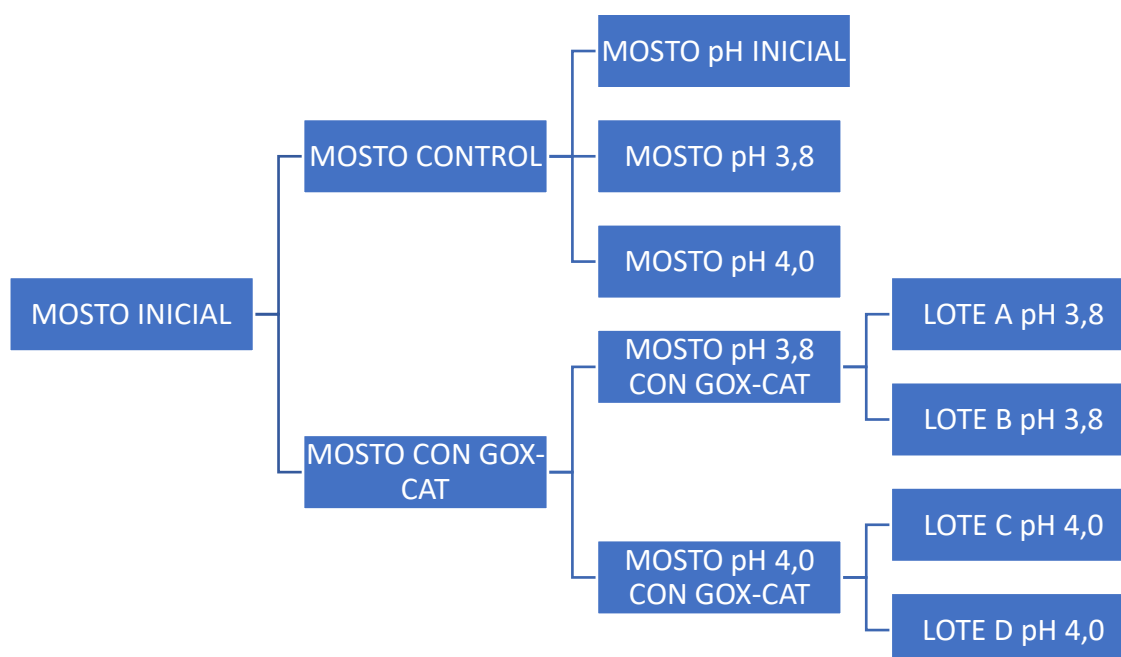


Ilustración 4: Esquema de trabajo.

A partir del mosto inicial se obtuvieron tres mostos controles, en los cuales difiere el pH, el primero de ellos presentaba el pH original del mosto (3,77), es decir sin modificar mientras que los otros dos controles fueron tratados con NaOH 0,1M con el fin de obtener un pH de 3,8 y 4,0, respectivamente.

Para el tratamiento enzimático de los mostos, se añadieron 300 mL de mosto a pH 3,8 y 4,0 a dos matraces Erlenmeyer de 1 L, respectivamente. Posteriormente se añadieron las enzimas GOX (Mono 10.000 BG, Novozyme, Dinamarca) a la dosis de 10 KU/L y CAT (Catazyme 25 L, Novozyme) a la misma dosis (Vicente, 2021). Los mostos tratados enzimáticamente se incubaron durante 48 horas a 20°C en una estufa (IRE-160, RAYPA, Barcelona) y se agitaron con ayuda de un agitador magnético (MR-Hei-estándar, Heidolph, Schwabach) a 750 rpm. Los mostos sin tratar enzimáticamente se conservaron a 8°C hasta su uso.

Pasadas las 48 horas se realizaron las mezclas de los mostos no tratados enzimáticamente con los mostos tratados enzimáticamente hasta conseguir, en el caso de los mostos con pH 3,8, reducciones del grado alcohólico moderadas (entre 1-2% de grado alcohólico probable (GAP)) mientras que para los mostos de pH 4,0 reducciones entre el 2-3% de GAP y de esta forma obtener vinos con un pH no demasiado ácido. De este modo, obtenemos un lote A y B a pH 3,8 con reducciones del GAP moderadas y del mismo modo obtenemos un lote C y D a pH 4,0 con reducciones más elevadas de GAP.

Para conseguir reducir 1 grado alcohólico en el vino se ha considerado una reducción en el contenido de glucosa del mosto de 18 g/L (Röcker et al., 2016).

*Tabla 1: Proporciones utilizadas para conseguir reducciones de GAP.*

	LOTE A pH 3,8	LOTE B pH 3,8	LOTE C pH 4,0	LOTE D pH 4,0
<b>MOSTO SIN TRATAR</b>	89,93%	67,86%	71,19%	42,39%
<b>MOSTO TRATADO</b>	16,07%	32,14%	28,81%	57,61%
<b>GLUCOSA ESPERADA (g/L)</b>	172	155	136	119
<b>GAP (% Vol)</b>	12,9	12,7	12,1	11,7

En la tabla 1 podemos ver descritas las proporciones (expresadas en %) de cada uno de los mostos, utilizadas para conseguir las reducciones de GAP.

Los experimentos se realizaron por duplicado obteniendo un total de 14 mostos listos para su fermentación. La fermentación se realizó inoculando 30 g/Hl de levaduras N96 *S. cerevisiae* (Anchor Yeast Biotechnologies, Johannesburgo, Sudáfrica) en 14 matraces Erlenmeyer de 500 mL que contienen cada uno 300 mL de mosto. Se dejaron incubar a una temperatura estable de 20°C en estufa. Se realizó un seguimiento diario de la fermentación a través de la pérdida de peso que experimentaba el mosto inoculado en los matraces. Una vez que la pérdida de peso fue estable se dio por finalizada la fermentación. Una vez terminada la fermentación los vinos se trasegaron y sulfitaron a una concentración de 30 mg/L de sulfuroso libre, por último, antes de realizar los análisis de los vinos, estos se dejaron reposar durante un día.

## 3.2. ANÁLISIS DE MOSTOS Y VINOS

Es importante destacar que los análisis tanto para vinos como para mostos son comunes a excepción de la acidez volátil y el grado alcohólico que solo se aplica a vinos. Todos los análisis se realizan por duplicado a excepción del grado alcohólico de los vinos (se realizaron una vez) y de los análisis para determinar fructosa, glucosa y ácido glucónico que se realizaron por triplicado.

### 3.2.1. ACIDEZ TOTAL

La organización internacional del vino (OIV) define la acidez total como la suma de todas las acideces valorables cuando se modifica el pH del mosto/vino hasta alcanzar un pH de 7. Sin tener en cuenta el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (OIV, 2015). Se empleó el método potenciométrico con ayuda de un pH-metro (pH Basic 20\*, Crison, Barcelona) para calcular la acidez total de los mostos/vinos. El resultado se expresó en forma de g/L de ácido tartárico.

### 3.2.2. pH

Se mide la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en un fluido. Uno de los electrodos tiene un potencial en función del pH del líquido, mientras que el otro tiene un potencial fijo y conocido siendo este electrodo el electrodo de referencia (OIV, 2015). Para obtener una medida de pH se utilizó un pH-metro.

### 3.2.3. ACIDEZ VOLÁTIL

La acidez volátil es un concepto aplicado en enología que se define como el conjunto de ácidos grasos pertenecientes a la serie acética que se encuentra presente en el vino ya sea en estado libre o bien combinados en forma de sales (OIV, 2015). El método empleado para medir la acidez volátil de los vinos fue García Tena. Se utilizó un volatímetro (GAB, Barcelona). El resultado se expresó como g/L de ácido acético.

### 3.2.4. DENSIDAD

La medida de la densidad solo fue aplicada en vinos. El método utilizado consiste en aplicar la fórmula de densidad para un cuerpo:

$$\rho = \frac{M}{V}$$

Se pesó un matraz aforado con un volumen conocido de vino (en este caso 5 mL) y se aplicó la fórmula anteriormente citada.

### 3.2.5. GRADOS BRUX Y GAP

El grado Brix es una medida de la cantidad de sólidos disueltos que hay en un líquido. Un grado Brix es un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución (Cazorla et al., 2005). Los grados Brix se calculan mediante el índice de refracción a través de un refractómetro de mano (ATC-1, ATAGO, Barcelona) a una temperatura estable de 20°C.

En caso de necesitar conocer el GAP del mosto se puede utilizar la siguiente fórmula (Cazorla et al., 2005):

$$GAP, \% vol = (0,6757 * ^\circ Brix) - 2,0839$$

### 3.2.6. GRADO ALCOHÓLICO

El grado alcohólico es el número de litros de etanol y sus homólogos contenidos en 100 litros de vino, ambos volúmenes medidos a una temperatura estable de 20°C. Para la determinación del grado alcohólico se utilizó un ebullómetro (GAB, Barcelona), el cual se fundamenta en la variación del punto de ebullición entre agua y un líquido hidroalcohólico (Cazorla et al., 2005; OIV 2015).

### 3.2.7. COLOR. MÉTODO GLORIES

Antes de medir las absorbancias de las muestras de mosto y vino, estas se centrifugaron usando una centrifuga (Bunsen, Koch) durante 10 minutos a 4000 rpm. Para realizar las medidas de absorbancia de las muestras se usó un espectrofotómetro (Genesys 150, Thermo-scientific, Barcelona)

El método Glories consiste en medir las absorbancias de las muestras de vino/mosto a diferentes longitudes de onda, las cuales son: 420, 520 y 620 nm (Zamora, 2022). Una vez que se han medido las absorbancias a las distintas longitudes de onda se calculan los parámetros cromáticos a partir siguiente tabla:

*Tabla 2: Ecuaciones para determinar los diferentes parámetros cromáticos del método Glories (Zamora, 2022)*

<b>Parámetros cromáticos</b>	<b>Ecuaciones</b>
Intensidad Colorante	$IC = A_{420} + A_{520} + A_{620}$
Tonalidad	$T = A_{420} / A_{520}$
% Amarillo	$\%A_{420} = (A_{420} / IC) \times 100$
% Rojo	$\%A_{520} = (A_{520} / IC) \times 100$
% Azul	$\%A_{620} = (A_{620} / IC) \times 100$

### 3.2.8. COMPUESTOS FENÓLICOS

Antes de medir el índice de polifenoles totales (IPT), flavonoles y ácidos hidroxicinámicos las muestras se diluyeron por un factor de 10 con agua destilada.

#### 3.2.8.1. IPT

El método para calcular el IPT consiste en realizar una medida de la absorbancia de la muestra a 280 nm ya que el anillo bencénico que presentan los polifenoles tiene su pico máximo de absorbancia a esa longitud de onda (Zamora, 2003). Una vez realizada la medida, se multiplica por el factor de dilución dando como resultado el índice de polifenoles totales.

### 3.2.8.2. DETERMINACIÓN DE FLAVONOLES

Para determinar los flavonoles se mide la absorbancia a 365 nm. El resultado de la absorbancia a 365 nm se multiplica por el factor de dilución. El resultado se expresa en unidades de absorción (Andrés-Lacueva et al., 1997).

### 3.2.8.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

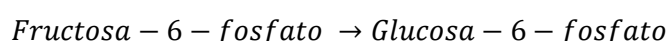
Para determinar los ácidos hidroxicinámicos se mide la absorbancia a 320 nm. El resultado de la absorbancia a 320 nm se multiplica por el factor de dilución (Andrés-Lacueva et al., 1997).

## 3.2.9. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA Y FRUCTOSA

Para la determinación de glucosa y fructosa de las muestras se utilizó un kit de D-fructosa / D-glucosa (Megazyme, Sídney). El kit se fundamenta en el aumento de la cantidad de NADPH a causa de las siguientes reacciones enzimáticas que permite realizar el propio kit:



En el caso del análisis de fructosa el fundamento es un aumento NADPH a causa de las siguientes reacciones:

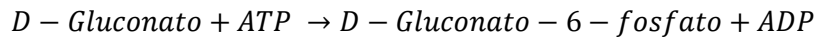


El aumento de NADPH es estequiométrico con la cantidad de D-glucosa por lo que se mide el aumento de NADPH a 340 nm.

## 3.2.10. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO

Para la determinación de ácido glucónico de las muestras se utiliza un kit de ácido glucónico / D-gluconolactona (Megazyme, Sídney). Se fundamenta en el aumento de la cantidad de NADPH a causa de las siguientes reacciones enzimáticas que permite realizar el propio kit:





El aumento de NADPH es estequiométrico con la cantidad de ácido D-glucónico por lo que se mide el aumento de NADPH a 340 nm.

### 3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar los análisis estadísticos se utilizó el software Statgraphics Centurion 19-X64. Los resultados finales se expresan en forma de medida de tendencia central, en este caso se expresan utilizando la media aritmética, acompañada de la desviación típica como medida de dispersión. En todas las variables dependientes se ha realizado un análisis de varianza unifactorial con un nivel de significación del 5% para comprobar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias. Como post-anova se ha elegido la prueba LSD con el fin de encontrar qué medias son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Finalmente, se realizó un análisis por componentes principales (ACP).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS MOSTOS

A continuación, en la tabla 3 podemos ver los resultados obtenidos de las pruebas realizadas a los mostos. Respecto a los grados Brix podemos observar un descenso de grados Brix en los mostos tratados enzimáticamente respecto a los mostos controles una vez aplicado el tratamiento con GOX-CAT. Un grado Brix corresponde con un gramo de sacarosa en 100 gramos de solución (Cazorla et al., 2005), por lo que un descenso en los grados Brix implica un descenso de azúcares en el mosto. Biyela et al. (2009) consiguió un descenso de grados Brix de 0,5 unidades en mostos de uva Pinotage tras aplicar una dosis enzimática de 30kU. A diferencia de los estudios de Biyela et al. (2009) en nuestro estudio se consiguen mayores descensos (en torno a 2,0 y 3,0 unidades) usando una dosis enzimática menor (20kU) debido principalmente a las distintas condiciones de ensayo, ya que en los estudios de Biyela et al. (2009), el tiempo de incubación fue de 9 horas mientras que en nuestro estudio el tiempo de incubación fue de 48 horas.

Tabla 3: Composición físico-química de los mostos tratados y no tratados enzimáticamente<sup>1</sup>

	MCI	MC 3,8	MC 4,0	MEZ pH 3,8	MEZ pH 4,0
Grados Brix	22,8 ± 0,35 <sup>c</sup>	22,9 ± 0,05 <sup>c</sup>	22,9 ± 0,47 <sup>c</sup>	17,2 ± 0,16 <sup>a</sup>	20,9 ± 0,08 <sup>b</sup>
Glucosa (g/L)	156 ± 8 <sup>b</sup>	168 ± 22 <sup>b</sup>	182 ± 19 <sup>b</sup>	100 ± 5 <sup>a</sup>	107 ± 6 <sup>c</sup>
pH	3,77 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,84 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,94 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,10 ± 0,02 <sup>b</sup>	2,85 ± 0,07 <sup>c</sup>
Acidez Total (g/L Tartárico)	3,18 ± 0,48 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,10 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,44 <sup>a</sup>	10,81 ± 0,07 <sup>b</sup>	10,48 ± 0,16 <sup>b</sup>
Intensidad Colorante	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,53 <sup>c</sup>	0,87 ± 0,14 <sup>bc</sup>	0,88 ± 0,16 <sup>bc</sup>	0,43 ± 0,04 <sup>a</sup>
Tonalidad	2,80 ± 0,43 <sup>f</sup>	1,98 ± 0,08 <sup>cd</sup>	2,24 ± 0,19 <sup>de</sup>	1,57 ± 0,08 <sup>ab</sup>	2,11 ± 0,01 <sup>de</sup>
% Rojo	22,8 ± 2,10 <sup>a</sup>	27,1 ± 1,38 <sup>bc</sup>	26,7 ± 1,08 <sup>bc</sup>	29,6 ± 0,69 <sup>c</sup>	26,8 ± 0,11 <sup>bc</sup>
% Azul	13,9 ± 2,18 <sup>ab</sup>	19,1 ± 2,40 <sup>cd</sup>	13,5 ± 1,60 <sup>ab</sup>	23,9 ± 0,75 <sup>ef</sup>	16,4 ± 0,02 <sup>bc</sup>
% Amarillo	63,2 ± 4,23 <sup>f</sup>	53,7 ± 1,40 <sup>cd</sup>	59,7 ± 2,70 <sup>ef</sup>	46,4 ± 1,45 <sup>ab</sup>	56,7 ± 0,13 <sup>de</sup>
IPT	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	5 ± 0 <sup>a</sup>
Flavonoles	1,10 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,40 ± 0,09 <sup>d</sup>	1,30 ± 0,04 <sup>cd</sup>	1,02 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>a</sup>
Ácido Hidroxicinámico	4,89 ± 0,09 <sup>d</sup>	4,19 ± 0,76 <sup>c</sup>	4,12 ± 0,81 <sup>c</sup>	2,48 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,01 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup> MCI: mosto control inicial. MC 3,8: mosto control inicial a pH 3,8. MC 4,0: mosto control inicial a pH 4,0. Mez pH 3,8: mosto con un pH ajustado a 3,8 y tratado enzimáticamente. Mez pH 4,0: mosto con un pH ajustado a 4,0 y tratado enzimáticamente. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos mostos para un p<0,05.

Además, obtenemos un mayor descenso del contenido de grados Brix a pH 3,8 que a pH 4,0. Otros autores (Botezatu et al., 2021; Röcker et al., 2016) no han encontrado diferencias significativas en la eficacia enzimática en este intervalo de valores de pH. Atribuimos estas diferencias a una variabilidad en los experimentos, a pesar de que los mostos tratados enzimáticamente presentaron la misma dosis enzimática, tiempo de incubación y régimen de agitación.

En cuanto a las concentraciones de glucosa observamos que respecto a la media de concentración de glucosa de los mostos control (168 g/L) existe una bajada en las concentraciones de glucosa de los mostos con tratamiento enzimático. Comparando estos resultados con diferentes estudios (Biyela et al., 2009; Botezatu et al., 2021; Röcker et al., 2016; Valencia et al., 2016) encontramos que efectivamente en todos los ensayos existe una bajada en las concentraciones de glucosa una vez que se ha aplicado el tratamiento enzimático si bien es cierto que en cada estudio el porcentaje de bajada de glucosa depende de múltiples factores como son la concentración enzimática empleada, el periodo de incubación, la aireación empleada, el tipo de uva utilizado, etc.

Con relación al pH podemos ver como los mostos con el tratamiento GOX-CAT presentan valores menores de pH, es decir son más ácidos que los mostos controles. Podemos observar bajadas en torno a 1,0 unidad. Comparando estas bajadas con diferentes estudios encontramos que Pickering et al. (2009) obtuvo descensos de pH de 0,45 partiendo de un pH inicial de 3,01 en mostos de uva Riesling. En cambio, Biyela et al. (2016) obtuvo descensos de 0,12 partiendo de un pH de 3,56 en mostos de uva Pinotage, pero no es hasta los estudios de Botezatu et al. (2021) donde encontramos bajadas de hasta 0,80 a partir de valores iniciales de 4,0; estas bajas están asociadas a un mayor periodo de incubación y una mayor concentración enzimática añadida. En nuestro caso el periodo de incubación superó por 24 horas al utilizado por Botezatu et al. (2021) permitiendo una mayor acidificación y un mayor descenso de pH. El aumento de acidez está fuertemente asociado al aumento del ácido glucónico generado por la oxidación enzimática de la glucosa por la enzima GOX, como hemos comentado anteriormente (Bankar et al., 2009; Botezatu et al., 2021; Röcker et al., 2016).

La siguiente variable que se analiza es la acidez total, en este caso vemos como los mostos tratados con el complejo GOX-CAT presentan valores de acidez total mayores que los mostos controles. Como hemos visto anteriormente con el caso del pH el aumento de acidez está asociado con un aumento de ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa (Botezatu et al., 2021). En nuestro caso el incremento de la acidez total se sitúa en torno a 7,0-8,0 g/L dependiendo del mosto. Se observaron

menores incrementos en el estudio de Biyela et al. (2009) que obtuvo un aumento de 1 g/L de acidez total, en cambio los estudios de Botezatu et al. (2021) muestran un aumento de entre 4 y 8 g/L de acidez total dependiendo de la concentración enzimática (una mayor concentración implica mayor formación de ácido glucónico y, por ende, menor pH y mayor acidez total).

Por lo que concierne al color de los mostos no se observa una clara tendencia del efecto del tratamiento con GOX-CAT. Únicamente se observó una ligera disminución en la intensidad colorante del mosto tratado enzimáticamente a pH 4,0, respecto a su mosto control a pH 4,0. Esta disminución se podría atribuir a una oxidación de los compuestos fenólicos oxidables durante el tratamiento enzimático los cuales pueden precipitar dando lugar a una bajada de la intensidad colorante de los mostos (Hidalgo et al., 2010). Respecto a la tonalidad también vemos una ligera disminución en el mosto tratado enzimáticamente a pH 4,0 respecto a su mosto control, si bien esta diferencia no se observó en los mostos a pH 3,8. Por último, en relación con el resto de los parámetros del color no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los mostos tratados con enzima y sus respectivos controles, a excepción de un mayor % de azul y un menor % de amarillo en el mosto mostro tratado con enzima a pH 3,8.

A diferencia de nuestro estudio donde se ha observado una disminución de la absorbancia a 420 nm en los mostos tratados enzimáticamente a pH 4,0 ( $0,24 \pm 0,10$ ) respecto a su control ( $0,52 \pm 0,02$ ), Botezatu et al. (2021) encontró un aumento de la absorbancia a 420 nm en los mostos de uva blanca Riesling tratados con GOX respecto a su control, relacionado con un pardeamiento del mosto. En los estudios de Pickering et al. (1998) con mosto Riesling también se observó un ligero aumento de la absorbancia a 420 nm, junto con un ligero aumento del % de rojo y la tonalidad en los mostos tratados enzimáticamente.

Por último, vemos como los mostos tratados enzimáticamente presentan una disminución en el IPT, y en el contenido de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos, en relación con sus respectivos mostos control, a excepción del IPT para los mostos a pH 3,8. Estos resultados están en consonancia con los observados por Pickering et al. (1998), que sugieren que esta disminución se debe a una precipitación de estos compuestos.

Los resultados observados ponen en evidencia que la mezcla de mostos tratados con GOX-CAT con mostos sin tratar son una alternativa a la aplicación de estas enzimas al volumen completo de mosto. De este modo se evita una excesiva aireación del total del

volumen del mosto, reduciendo el riesgo de oxidación de los compuestos fenólicos y un impacto negativo en el color del vino.

#### 4.1.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE LOS MOSTOS

A continuación, podemos observar las relaciones entre las distintas variables (12) mediante un análisis multivariante, en este caso se ha elegido un ACP con el fin de encontrar combinaciones lineales de las variables originales que expliquen la mayor parte de la variación total. Se extrajeron 3 componentes principales (CP) un porcentaje de varianza acumulada del 98,3%, es decir que explican el 98,3% de la variabilidad de los datos.

En la figura 1 se representan los parámetros analizados y las muestras de mostos en el espacio definido por las dos primeras CP que explican el 94,8% de la variabilidad de los datos. La primera componente principal (CP1) explica el 64,3% de la varianza total mientras que la segunda componente (CP2) explica el 30,5% de la varianza total, por último, aunque no se ve representada la tercera componente (CP3) explica el 3,5% de la varianza total. En esta figura se observa como CP1 está correlacionada positivamente

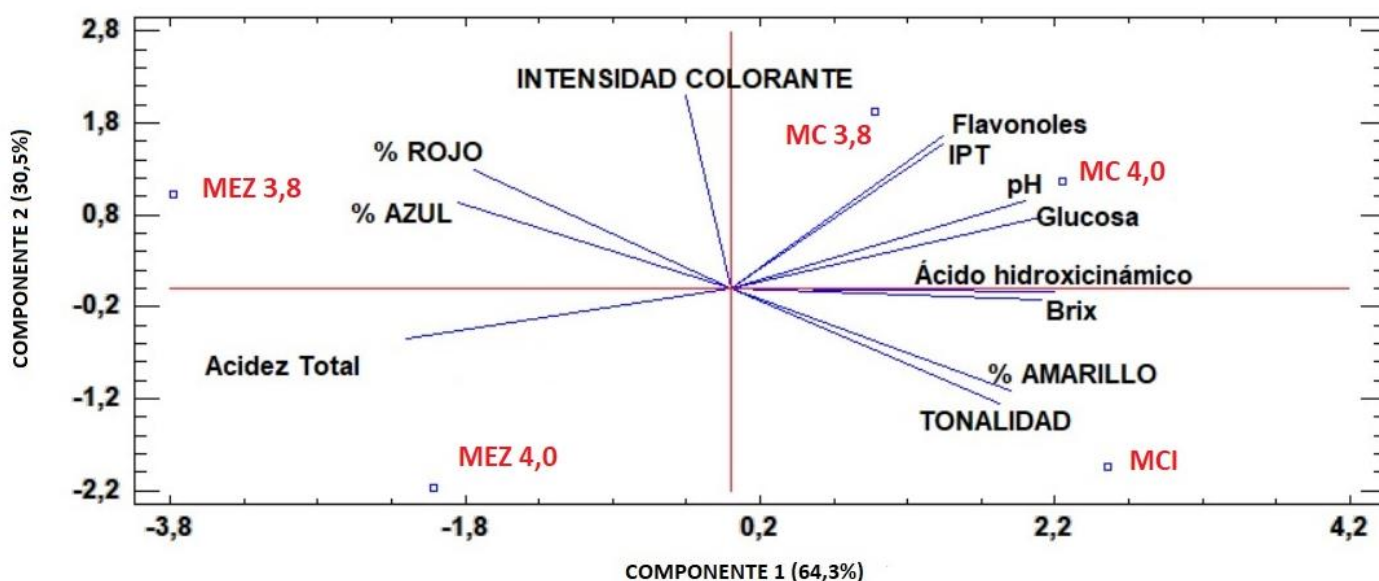


Figura 1: Representación gráfica del análisis de componentes principales en mostos

con las variables: flavonoles, IPT, glucosa, pH, grados Brix, ácidos hidroxicinámicos, %amarillo y tonalidad. Por último, se correlaciona negativamente con %rojo, %azul y acidez total. Por otro lado, la CP2 se correlaciona positivamente con la intensidad colorante.

La posición de los mostos en el gráfico nos indica que los mostos tratados enzimáticamente y llevados a pH 3,8 y 4,0 se encuentran en el segundo cuadrante (MEZ 3,8) y tercer cuadrante (MEZ 4,0) y presentan valores más altos para las variables acidez total, % rojo y % azul como es lógico ya que estos mostos se han visto afectados por el tratamiento enzimático. En cambio, presentan valores inferiores para las variables que se correlacionan positivamente con la CP1.

En el caso de los mostos controles observamos que se posicionan entre el primer cuadrante (MC 3,8 y MC 4,0) y cuarto cuadrante (MCI). Los mostos controles presentan valores más altos para las variables que correlacionan positivamente con la primera componente y por ende valores más bajos para las variables que correlacionan negativamente con la primera componente ya que no han sufrido el tratamiento enzimático.

## 4.2. COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE VINOS

A continuación, en la tabla 4 podemos ver los resultados de la composición básica de los vinos obtenidos tras la fermentación. Se observa una reducción del grado alcohólico en los lotes A, B, C y D, también vemos como este descenso es progresivo es decir cumpliendo con los objetivos de conseguir dos lotes A y B con una reducción de la graduación más suave (1-1,5%) que en los lotes C y D donde se buscaba una reducción más severa en torno al 2-3%. Estos resultados confirman que el tratamiento enzimático ha funcionado consiguiendo una reducción del grado alcohólico al igual que en los estudios de Biyela et al. (2009), Botezatu et al. (2021) y Valencia et al. (2017). A diferencia del estudio presente, estos autores obtuvieron distintas reducciones de grado alcohólico. En el caso de Biyela et al. (2009) obtuvo una reducción de 0,7 unidades con una dosis enzimática de 30 kU y una incubación de 48 horas. En cambio, Valencia et al., (2017) obtuvo una reducción de entre el 2-3 unidades asemejando estos resultados con los obtenidos en este estudio, por último, Botezatu et al. (2021) consiguió reducción de entre el 0,5-1,0 unidades dependiendo de la dosis enzimática empleada.

Al comparar los valores de los GAP de los mostos para los lotes A, B, C y D (tabla 1) con el grado alcohólico de los lotes de vino (tabla 2), podemos observar una adecuada correlación entre ambos parámetros y una ligera disminución del grado alcohólico de los vinos respecto al GAP de en torno al 10%. Estos resultados se pueden explicar por el metabolismo fermentativo de las levaduras al convertir los azúcares del mosto no solo en etanol, sino también en otros metabolitos secundarios (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

En el caso de las variables glucosa, fructosa y ácido glucónico podemos ver que no se detectó la presencia de glucosa y fructosa una vez concluidos los análisis por lo que concluimos que estas han sido consumidas en su totalidad durante el proceso fermentativo. El ácido glucónico es de gran interés en los estudios ya que tras el tratamiento enzimático se produce un aumento de ácido glucónico. Podemos ver como existe un aumento de ácido glucónico en los lotes A, B, C y D respecto a los vinos controles. Se consigue un aumento medio de aproximadamente 28 g/L, este aumento es semejante a los conseguido por Biyela et al. (2009), Botezatu et al. (2021), Röcker et al. (2016) y Valencia et al. (2017) que fue de una media de 25 g/L. Botezatu et al. (2021) observó una mayor concentración de ácido glucónico en las primeras 24 horas de tratamiento al incrementar la concentración de GOX empleada.

Con relación al pH de los diferentes vinos podemos ver como los lotes A, B, C y D con el tratamiento GOX-CAT presentan valores menores de pH, es decir son más ácidos que los vinos controles. Este efecto se debe principalmente al aumento del ácido glucónico producido por la acción de la enzima GOX (Biyela et al. 2009; Botezatu et al. 2021, Röcker et al. 2016; Valencia et al. 2017).

Respecto a la acidez total teóricamente se tendría que producir un aumento de esta a causa de un aumento previo de ácido glucónico provocado por el tratamiento enzimático con la enzima GOX. Observando los datos obtenidos en el estudio y los datos obtenidos por Biyela et al. (2009), Botezatu et al. (2021) y Röcker et al. (2016) podemos confirmar que en efecto el aumento de ácido glucónico provoca un aumento en la acidez total. En nuestro estudio, los vinos con los valores más altos de ácido glucónico (lote B y D) son los vinos que presentan una mayor subida de la acidez total respecto a los vinos controles. En nuestro caso obtenemos subidas de en torno a 5 g/L respecto a los vinos controles similar a la obtenida en los estudios citados anteriormente.

No se encontraron grandes diferencias para la acidez volátil entre los vinos controles y los lotes A, B, C y D lo que evidencia que el proceso fermentativo fue correcto, mostrando que el tratamiento enzimático con GOX-CAT no afecta a la acidez volátil.

En el caso de la densidad, podemos ver como los vinos control presentan valores menores de densidad que los lotes A, B, C y D ya que estos últimos presentan un menor contenido en etanol que los mostos controles evidenciado de otra manera la bajada que se produjo en el grado alcohólico de los lotes.

Tabla 4: Composición físico-química de los vinos tratado y no tratados enzimáticamente<sup>1</sup>

	VCI	VC 3,8	VC 4,0	LOTE A pH 3,8	LOTE B pH 3,8	LOTE C pH 4,0	LOTE D pH 4,0
Grado Alcohólico	13,7 ± 0,91 <sup>b</sup>	13,5 ± 0,60 <sup>b</sup>	13,8 ± 0,50 <sup>b</sup>	12,2 ± 0,35 <sup>a</sup>	12,0 ± 0,20 <sup>a</sup>	11,7 ± 0,14 <sup>a</sup>	11,1 ± 0,14 <sup>a</sup>
Glucosa (g/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fructosa (g/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ácido Glucónico (g/L)	0,20 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>a</sup>	18,9 ± 0,50 <sup>b</sup>	20,3 ± 1,30 <sup>b</sup>	19,6 ± 2,80 <sup>b</sup>	27,5 ± 2,20 <sup>c</sup>
pH	3,60 ± 0,02 <sup>c</sup>	3,65 ± 0,08 <sup>c</sup>	3,60 ± 0,06 <sup>c</sup>	3,30 ± 0,10 <sup>b</sup>	3,25 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,30 ± 0,07 <sup>b</sup>	3,10 ± 0,05 <sup>a</sup>
Acidez Total (g/L Tartárico)	4,80 ± 0,10 <sup>a</sup>	4,65 ± 0,40 <sup>a</sup>	4,70 ± 0,25 <sup>a</sup>	9,90 ± 0,50 <sup>b</sup>	10,80 ± 0,16 <sup>c</sup>	8,90 ± 0,25 <sup>b</sup>	10,80 ± 0,20 <sup>c</sup>
Densidad (g/L)	0,97 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,99 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,99 ± 0,05 <sup>b</sup>
Acidez Volátil (g/L Acético)	0,40 ± 0,04 <sup>bc</sup>	0,35 ± 0,02 <sup>ab</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>bc</sup>	0,40 ± 0,04 <sup>c</sup>	0,40 ± 0,03 <sup>bc</sup>	0,36 ± 0,01 <sup>ab</sup>
Intensidad Colorante	0,18 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,20 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,19 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,20 ± 0,09 <sup>ab</sup>	0,26 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,19 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,03 <sup>bc</sup>
Tonalidad	3,80 ± 0,70 <sup>bc</sup>	3,90 ± 0,15 <sup>c</sup>	3,95 ± 0,27 <sup>c</sup>	3,40 ± 0,19 <sup>abc</sup>	2,90 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,60 ± 1,10 <sup>abc</sup>	3,10 ± 0,25 <sup>ab</sup>
% Rojo	19,5 ± 2,30 <sup>ab</sup>	18,7 ± 0,65 <sup>a</sup>	18,8 ± 0,65 <sup>a</sup>	20,7 ± 0,50 <sup>abc</sup>	22,7 ± 0,55 <sup>c</sup>	20,7 ± 3,20 <sup>abc</sup>	21,7 ± 1,05 <sup>bc</sup>
% Azul	7,40 ± 2,01	7,60 ± 0,38	6,90 ± 1,25	9,10 ± 1,90	10,9 ± 0,75	7,70 ± 6,40	10,2 ± 1,30
% Amarillo	73,1 ± 4,30	73,7 ± 0,27	74,2 ± 1,90	70,1 ± 2,45	66,2 ± 1,40	71,5 ± 9,70	68,1 ± 2,30
IPT	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>	7 ± 0 <sup>c</sup>	5 ± 0 <sup>a</sup>	6 ± 0 <sup>b</sup>
Flavonoles	0,90 ± 0,02 <sup>d</sup>	0,97 ± 0,04 <sup>e</sup>	0,92 ± 0,07 <sup>de</sup>	0,41 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,10 <sup>ab</sup>	0,52 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>c</sup>
Ácido Hidroxicinámico	4,25 ± 0,15 <sup>b</sup>	4,50 ± 0,50 <sup>b</sup>	4,55 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,29 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,18 <sup>a</sup>	1,40 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,55 ± 0,05 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> VCI: vino control inicial. VC 3,8: vino control inicial a pH 3,8. VC 4,0: vino control inicial a pH 4,0. ND: No detectado. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos mostos para un p<0,05.



En general, se puede afirmar que no se observaron modificaciones importantes en el color de los vinos por el tratamiento enzimático con GOX-CAT. Por un lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras para el % de amarillo y el % de azul, únicamente el vino del lote B tuvo un mayor % de rojo, asociado a su menor tonalidad. Por otro lado, los vinos de los lotes B y D presentaron una ligera menor intensidad colorante. Las investigaciones realizadas sobre el análisis sensorial del color de los vinos tratados con GOX han arrojado resultados contradictorios. Por un lado, Botezatu et al. (2021) indicaron que los vinos procedentes de mostos de uva blanca Riesling tratadas con GOX presentaban un color amarillo-dorado, mientras que las muestras de mosto control no tratadas enzimáticamente se caracterizaron con atributos de tono más anaranjado-rojo. Sin embargo, en el estudio de Pickering et al. (1999) se observó un color amarillo-dorado en los vinos procedentes de mostos con GOX, siendo el color de los vinos control más pálido, si bien, los jueces manifestaron su preferencia por el color de los vinos procedentes del tratamiento con GOX.

Finalmente, no se observó un efecto claro del tratamiento enzimático sobre el IPT, ya que el vino del lote C presentó un menor valor que los vinos control, siendo similar para los lotes A y D, y superior para el lote A. En cambio, sí que encontramos un descenso más notable en la concentración de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos de los lotes A, B, C y D respecto a los vinos control, en consonancia con los resultados obtenidos en los mostos. Pickering et al. (1998) y Botezatu et al. (2021) encontraron en los vinos con tratamiento enzimático, respecto al vino control, una ligera disminución en el IPT mientras que en el caso de flavonoles y ácidos hidroxicinámicos la disminución fue más acusada, probablemente causada por una precipitación de estos compuestos en el vino.

#### 4.2.1. ANÁLISIS MULTIVARIANTE VINOS

Se ha elegido un ACP con el fin de encontrar combinaciones lineales de las variables originales que expliquen la mayor parte de la variación total. Se extrajeron 3 CP con un porcentaje de varianza acumulada del 96,3%, es decir que se recoge el 96,3% de la variabilidad de los datos. La CP1 recoge el 74,7% de la varianza total, la CP2 recoge el 16,9% de la varianza total y por último la CP3 recoge el 4,7% de la variabilidad.

En la figura 2 podemos ver la localización de los vinos respecto a los parámetros analizados en el espacio definido por la CP1 y la CP2. Vemos como la CP1 está

correlacionada positivamente con las variables: Intensidad colorante, %azul, acidez volátil, densidad, %rojo, acidez total y ácido glucónico. En cambio, se correlaciona negativamente con las variables: grado alcohólico, ácido hidroxicinámico, flavonoles, pH y tonalidad. Con respecto a la CP2 podemos ver como esta se correlaciona principalmente y positivamente con la variable IPT.

En cuanto a la posición de los vinos en el gráfico, encontramos como existe una

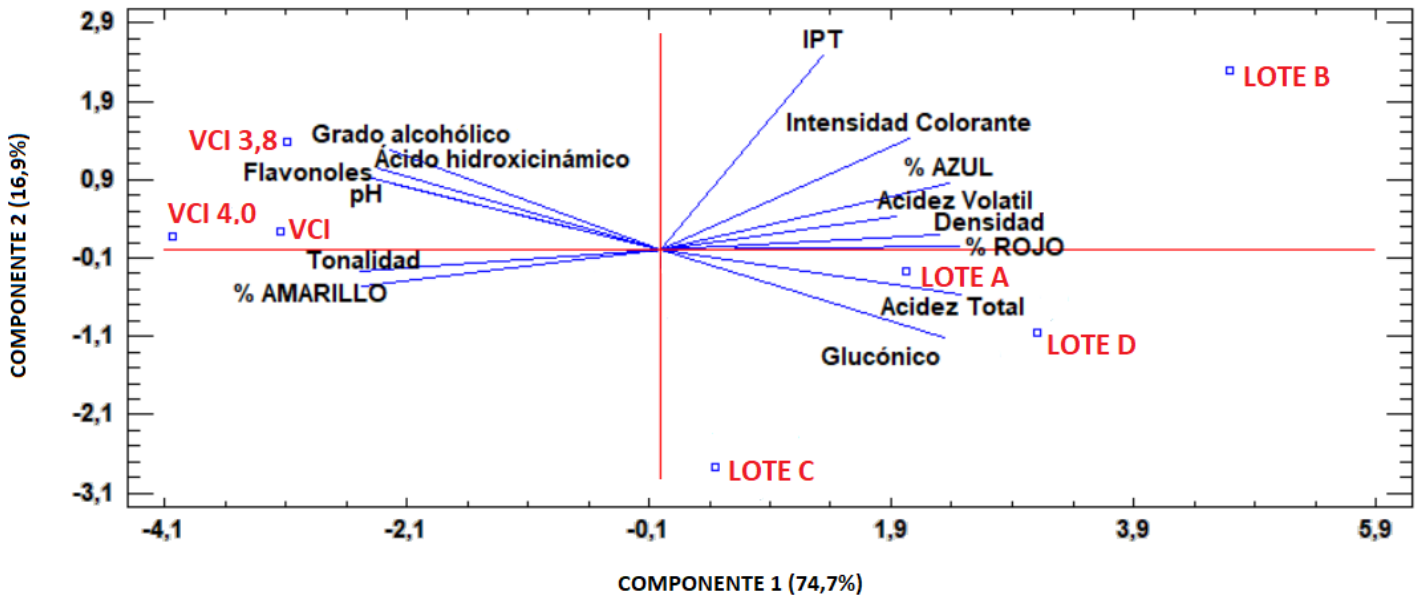


Figura 2: Representación gráfica del análisis de componentes principales en vinos

agrupación de los vinos controles (pH inicial, pH 3.8 y pH 4) a valores negativos de la CP1, respecto a los mostos mezcla formados por los lotes A, B, C y D que se agrupan a valores positivos de la CP1.

Gracias al APC podemos ver como los vinos controles presentan valores mayores de las variables que correlacionan negativamente con la CP1 esto es lógico ya que los vinos controles no han sufrido tratamiento enzimático y por ende presentan valores más altos para las variables que correlacionan negativamente con la CP1. En cambio, en los vinos tratados enzimáticamente, presentan valores más altos para las variables que correlacionan positivamente con la CP1.

Podemos comprobar la efectividad del tratamiento enzimático ya que los lotes A, B, C y D presentan valores más altos de acidez total, ácido glucónico y densidad. En cambio, presentan valores más bajos para las variables que correlacionan negativamente con la CP1 como es el caso del grado alcohólico.

## 5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este estudio son las siguientes:

- Se ha conseguido una simultánea reducción del grado Brix y un incremento de la acidez del mosto al aplicar las enzimas GOX-CAT al mosto.
- El tratamiento con GOX-CAT en mostos con un pH entre 3,8-4,0 permitió reducciones notables en el grado alcohólico del vino, entre 1,3-2,7 unidades, sin obtenerse valores de pH excesivamente bajos.
- No se observaron modificaciones importantes ni en los parámetros de color ni en el IPT de los vinos tratados con GOX-CAT.

Estos resultados son prometedores, sin embargo, son necesarios estudios adicionales para evaluar el impacto de esta alternativa en la composición volátil y en las características organolépticas del vino.

## BIBLIOGRAFÍA

Anderson, T. R., Hawkins, E., & Jones, P. D. (2016). CO<sub>2</sub>, the greenhouse effect and global warming: from the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour*, 40(3), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2016.07.002>

Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S., & del Carmen de la Torre-Boronat, M. (1998). Influence of Variety and Aging on Foaming Properties of Cava (Sparkling Wine). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1694-1694.

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. V. (2009). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10. 000 BG-treated grape juice. *South African Journal of Enology and Viticultura*, 30, 124–132. [https://doi:10.21548/30-2-1432](https://doi.org/10.21548/30-2-1432).

Botezatu, A., Elizondo, C., Bajec, M., & Miller, R. (2021). Enzymatic management of pH in white wines. *Molecules*, 26(9), 2730. <https://doi.org/10.3390/molecules26092730>

Caridis, K. A., Christakopoulos, P., & Macris, B. (1991). Simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Alternaria alternata*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 794-797. <https://doi.org/10.1007/bf00169352>

Cazorla, J. G., Vayreda, M. X., & Romero, R. A. (2005). Técnicas usuales de análisis en enología. Ed. Panreac Química. Madrid.

Hatzinikolaou, D., & Macris, B. (1995). Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(6), 530–534. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)91708-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)91708-7)

Hidalgo, J. (2010). Tratado de Enología. Volumen I y II. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

IPCC. (2022). Global Warming of 1.5°C: IPCC Special report on impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels in context of strengthening response to development, and efforts to eradicate poverty. Ed. Cambridge University Press. Cambridge.

Martinez, A., Aleixandre Tudó, J. L., & Aleixandre Benavent, J. L. (2016). Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos. *Enovicultura*, 42, 4-26.

Mira, 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>

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry*. Ed. WH Freeman. Barcelona.

OIV. (2015). Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts.

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. (1999). 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., Heatherbell, D., & Barnes, M. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, 31(10), 685–692. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(99)00046-0)

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., & Maugean, A. (2003). *Tratado de Enología: Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

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>

Salgado, C. M., Fernández-Fernández, E., Palacio, L., Carmona, F. J., Hernández, A., & Prádanos, P. (2017). Application of pervaporation and nanofiltration membrane processes for the elaboration of full flavored low alcohol white wines. *Food and Bioproducts Processing*, 101, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.10.001>

Sam, F. E., Ma, T. Z., Salifu, R., Wang, J., Jiang, Y. M., Zhang, B., & Han, S. Y. (2021). Techniques for dealcoholization of wines: Their impact on wine phenolic composition, volatile composition, and sensory characteristics. *Foods*, 10(10), 2498. <https://doi.org/10.3390/foods10102498>

Sánchez, Y., Martínez-Graña, A., Santos-Francés, F., & Yenes, M. (2019). Index for the calculation of future wine areas according to climate change application to the protected designation of origin “Sierra de Salamanca” (Spain). *Ecological Indicators*, 107, 105646. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105646>

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>

Vargas, E. F. (2007). pH y equilibrio iónico en mostos y vinos: Su importancia y factores que influyen. *Enólogos*, 46, 70-76.

Vicente, P. (2021). Aplicación de glucosa oxidasa y catalasa para la reducción del grado alcohólico en vinos blancos. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Valladolid.

Zamora, F. (2022). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Ed. Mundi Prensa Libros. Madrid.

Zoghbi, N., Ojeda, L., Noguera, N., Yépez, A., Camargo, H., & Triana-Alonso, F. (2008). Extracción y purificación de glucosa oxidasa para fines diagnósticos producida en

medios a base de fertilizantes y azúcar industrial. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 28(1), 31-37.