



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Enología

Estudio del uso del sistema enzimático glucosa oxidasa-catalasa en estado inmovilizado para la reducción del grado alcohólico en vinos blancos

Alumna: Alba Martínez Corrales

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Junio de 2023

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	2
1. Introducción	3
1.1. Incidencia del cambio climático en la calidad de la uva y el vino	3
1.2. Técnicas para reducir el grado alcohólico del vino	4
1.3. Aplicación de la enzima glucosa oxidasa para reducir el contenido de glucosa en mostos	5
1.4. Inmovilización de enzimas como alternativa al uso de enzimas en estado libre	7
2. Objetivos	9
3. Materiales y métodos	9
3.1. Co-inmovilización del sistema enzimático GOX-CAT	9
3.2. Tratamiento enzimático de los mostos	10
3.3. Control analítico	11
3.3.1. pH	11
3.3.2. Intensidad de color	12
3.3.3. Concentración de glucosa	12
3.4. Tratamiento estadístico de los datos	12
4. Resultados y discusión	12
4.1. Consumo de glucosa	15
4.2. Disminución del pH	19
4.3. Variación de la intensidad de color	22
5. Conclusiones	26
6. Bibliografía	27

RESUMEN

Las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT) son una herramienta biotecnológica que se puede aplicar en el mosto con el fin de disminuir la concentración de glucosa en el mismo, y como consecuencia, aumentar la acidez y reducir el grado alcohólico del vino. Para ello, se ha estudiado el efecto de la dosis de enzimas, ya se encuentren inmovilizadas en biocápsulas de alginato cálcico y sílice o en estado libre, del pH inicial del mosto y de la temperatura sobre el consumo de glucosa, la disminución del pH y la variación de la intensidad de color del mosto. Los resultados obtenidos han mostrado que GOX y CAT co-inmovilizadas pueden llegar a consumir 37,1 g/L de glucosa, disminuir 0,60 el pH y variar 0,423 UA la intensidad de color del mosto. Por esta razón, el uso de este sistema enzimático es eficaz para mejorar determinados parámetros del mosto agravados por el cambio climático.

Palabras clave: Glucosa oxidasa, catalasa, vino, reducción del grado alcohólico, inmovilización.

ABSTRACT

The glucose oxidase (GOX) and catalase (CAT) enzymes are a biotechnological tool that can be applied in the must to decrease its concentration of glucose, and as a consequence, increase the acidity and reduce the alcohol content of the wine. To this end, the effect of the enzyme doses, whether immobilized in calcium alginate-silica biocapsules or in free state, the initial pH of the must and the temperature on glucose consumption, the decrease in pH and the variation in the color intensity of the must have been studied. The results obtained have shown that co-immobilized GOX and CAT can consume 37.1 g/L of glucose, decrease the pH by 0.60 and vary the must color intensity by 0.423 AU. For this reason, the use of this enzymatic system is effective in improving certain must parameters aggravated by climate change.

Keywords: Glucose oxidase, catalase, wine, alcohol reduction, immobilization.

1. Introducción

1.1. Incidencia del cambio climático en la calidad de la uva y el vino

Tanto los climas calurosos de ciertas regiones vitivinícolas, caracterizados por veranos cálidos, prolongados y secos, como el cambio climático, son los responsables de múltiples factores, pero principalmente del aumento de las temperaturas medias anuales y de la disminución de la disponibilidad de agua en el viñedo (Anocíbar, 2020; Roquet-Jalmar, 2018; Martínez et al., 2016). La subida de dichas temperaturas afecta a algunas fases decisivas del ciclo de crecimiento de la vid, sobre todo al periodo de brotación y floración, lo cual se debe al alcance anticipado del cero vegetativo de la planta, el cual es de 10°C para la viña (Anocíbar, 2020).

El calentamiento global ha provocado un incremento de la temperatura media de entorno a 1,5°C en los últimos 50 años. Como consecuencia a esto y a lo mencionado anteriormente, fases como la brotación y la vendimia se adelantan prácticamente un mes, lo cual ofrece una mayor flexibilidad a la hora de establecer la fecha de inicio de vendimia, pero supone un riesgo para la planta de sufrir heladas primaverales y, por consiguiente, un descenso de la producción a recoger (Anocíbar, 2020; Martínez et al., 2016).

Al igual que el crecimiento de la vid hasta la floración depende sobre todo de los grados día, la pendiente de dicho desarrollo lo hace de la cantidad de agua presente en el suelo. Para cuando empieza la brotación, es fundamental que el terreno cuente con una reserva hídrica, ya que de lo contrario y en caso de usar riego en el viñedo, el agua percola al suelo antes de servir a la propia planta (Anocíbar, 2020).

En un año cualquiera con una reserva de agua escasa, se observa la disminución del número de racimos por cada cepa, la cual puede alcanzar hasta un 30% de la producción, la reducción del crecimiento de la vid, y una parada más temprana de este último. Por otro lado, en un verano con un estrés hídrico considerable, se empiezan a secar los peciolo de la base en sentido ascendente, se reseca la yema apical, lo cual implica una parada del crecimiento, se comienzan a secar las hojas de abajo hacia arriba también y, en casos extremos, se pasifican las uvas del racimo (Anocíbar, 2020).

El aumento de la relación entre la temperatura y la sequía tiene como principales consecuencias la producción de uvas de menor tamaño debido a la deshidratación (tanto si la falta de agua tiene lugar al inicio de la fructificación, cuando los racimos son pequeños todavía, como si se produce al final del ciclo de la vid, momento en el que las bayas engordan por última vez, lo cual reduce la cantidad de producción (Anocíbar, 2020)), el bloqueo de la madurez, el incremento de la concentración de potasio que conlleva un aumento del pH, la disminución de la acidez total y la elaboración de vinos con mayor intensidad de color, estructura y grado alcohólico, lo cual se debe a la concentración por la escasez de agua de taninos, antocianos y azúcares respectivamente (Anocíbar, 2020; Martínez et al., 2016), fenómenos que influyen en la calidad del vino final (Roquet-Jalmar, 2018; Martínez et al., 2016).

La alta concentración de azúcares en el mosto genera una elevada presión osmótica sobre las levaduras, dificultando así su proceso metabólico y las suscita a producir una mayor cantidad de etanol, lo cual causa una ralentización de la fermentación alcohólica,

o incluso la parada fermentativa, ya que es un compuesto tóxico en altas concentraciones (Martínez et al., 2016).

Desde el punto de vista sensorial del vino, el aumento del contenido alcohólico modifica la apariencia visual, la percepción aromática y el sabor del vino. Visualmente, el etanol altera la estabilidad de algunos antocianos, lo cual implica una pérdida de hasta un 15% de la intensidad colorante (Hermosín, 2003). En nariz, se ven afectados tanto la volatilidad de los compuestos aromáticos como sus umbrales de percepción, predominando los aromas herbáceos (Athès et al., 2004). Además en boca, la alta concentración de etanol potencia el amargor y el dulzor del vino, reduce la percepción de la acidez y la astringencia, y aporta ciertas notas metálicas (Jones et al., 2008) y una sensación de ardor (King et al., 2013).

La subida del grado alcohólico del vino también tiene implicaciones económicas. Cuando se realizan exportaciones, el aumento del grado alcohólico afecta económicamente a los países que gravan el vino en función de su graduación alcohólica. Las regiones vinícolas donde el contenido en alcohol de los vinos es superior a los valores establecidos por el gravamen fiscal sobre bebidas alcohólicas, pueden dejar de ser competitivas en el mercado, lo cual se debe a la necesidad de incrementar el precio de los productos con el fin de mantener la cantidad de beneficios (Martínez et al., 2016).

Por otra parte, paralelamente al incremento del grado alcohólico del vino, se observa una disminución de la acidez del vino que está relacionada con el aumento del pH y del potasio. El pH del medio es, en gran medida, responsable de la adecuada estabilidad microbiológica del vino; con un valor elevado del mismo, el vino tiene una mayor probabilidad de oxidarse o sufrir daños biológicos (Martínez et al., 2016). Uno de los efectos negativos de la excesiva acumulación de potasio en la uva es la reducción del color de los vinos. El grado de ionización de los antocianos, o lo que es lo mismo, el porcentaje de antocianos coloreados presentes sobre el total, decrece a medida que aumenta el pH (Somers, 1975), el cual favorece la formación de antocianos hemiacetales, caracterizados por ser incoloros y aminorar el color del vino (Ribéreau-Gayon et al., 2021). A su vez, el aumento de pH disminuye la eficacia del SO₂, por lo que se precisa la utilización de mayores concentraciones de este para mantener los mismos efectos antisépticos (Costa, 2014).

Al igual que la subida del grado alcohólico, el incremento de los valores del pH afecta al aroma, el sabor y el color del vino, pero principalmente a este último. Con un pH demasiado alto se produce una oxidación mayor del etanol, dando lugar a acetaldehído libre, el cual confiere pardeamiento y colores propios de la oxidación, como pueden ser teja o ladrillo (Martínez et al., 2016).

1.2. Técnicas para reducir el grado alcohólico del vino

Los distintos procedimientos que existen para reducir la cantidad de alcohol y el pH del vino se pueden llevar a cabo tanto en el viñedo como antes, durante o después de la fermentación alcohólica. Con el fin de conseguir lo mencionado, es aconsejable prescindir de ciertas operaciones como el mantenimiento del suelo mediante cubiertas vegetales (Pascual, 2013) o el deshojado precoz durante la floración o el cuajado (Gil, 2010), ya que el grado alcohólico probable del mosto aumenta significativamente como

consecuencia de la disminución del peso de las bayas (Pascual, 2013; Gil, 2010). También, se puede iniciar la vendimia durante una etapa más temprana de la maduración, donde las uvas tienen un contenido menor de azúcares y una acidez total más elevada (Piccardo et al., 2021; Anocibar, 2020; Roquet-Jalmar, 2018). No obstante, la maduración inadecuada de los hollejos y semillas puede dar lugar a vinos mal coloreados, amargos, astringentes y con notas herbáceas, es decir, va a afectar a su calidad final. Asimismo, existen ciertas alternativas tecnológicas que permiten disminuir el grado alcohólico del vino sin modificar su color y composición fenólica. Un ejemplo de ellas es la sustitución parcial del mosto obtenido de la uva madura por mosto de uva inmadura, cuyo principal inconveniente es la imposibilidad de cuantificar con exactitud la relación entre ambos mostos, lo cual puede ocasionar una dilución indeseada de los compuestos fenólicos. Para solventar este problema, se puede usar como técnica complementaria la maceración prefermentativa en caliente, la cual potencia el color del vino y la extracción de polifenoles, antocianos, catequinas y proantocianidinas (Piccardo et al., 2021).

En la actualidad, los métodos físicos son los más utilizados para producir vinos con un contenido limitado de alcohol (Loyola et al., 2021; Pickering, 2000), tales como la ósmosis inversa, responsable de acentuar el dulzor del vino, y el empleo de columnas de conos rotatorios, los cuales potencian las notas a frutos rojos y aumenta la acidez, el amargor y la astringencia del vino (Loyola et al., 2021). Sin embargo, estos procesos implican la extracción selectiva de etanol mediante volatilidad o difusión (Pickering, 2000), y son caros, difíciles de realizar y responsables de la pérdida de equilibrio en boca y de ciertos compuestos aromáticos del vino (Heux et al., 2006). A su vez, también se utilizan procesos de separación mediante membranas de ultra y nanofiltración, con el objetivo de reducir el grado alcohólico hasta un 2,0% (v/v); en estas técnicas, se disminuye la concentración de azúcares antes de la fermentación, para preservar tanto las características organolépticas del vino como su calidad final (Martín, 2014).

Otra opción es modular la fermentación alcohólica mediante el uso de bloqueadores metabólicos, como pueden ser el furfural, la o-vainillina, el ácido cinámico, el glicolaldehído, la p-benzoquinona y el cobre, con el fin de controlar la producción de etanol. El redireccionamiento de la ruta glucolítica de *Saccharomyces cerevisiae* favorece el descenso del grado alcohólico gracias al incremento de la producción de metabolitos secundarios de interés enológico (Vejarano, 2013).

Además, la aplicación de las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT) en el mosto antes de la inoculación de las levaduras es una herramienta rápida para disminuir la concentración de glucosa en el mismo, y como consecuencia, aumentar la acidez del vino y reducir su grado alcohólico hasta un 2,0% (v/v) (Röcker et al., 2016).

1.3. Aplicación de la enzima glucosa oxidasa para reducir el contenido de glucosa en mostos

La GOX es una enzima que cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de oxígeno molecular como aceptor de electrones (Röcker et al., 2016; Biyela et al., 2009). Primeramente, la β -D-glucosa se oxida a D-glucono-1,5-lactona; más adelante, esta última se hidroliza espontáneamente

a ácido D-glucónico (Röcker et al., 2016) (Figura 1). La GOX actúa como catalizador gracias a un cofactor, concretamente al flavín adenín dinucleótido (FAD), el cual es una coenzima común en las reacciones metabólicas de oxidorreducción (Botezatu et al., 2021). Normalmente, la actividad enzimática de la GOX se combina con la de la CAT para mitigar la formación de H_2O_2 , el cual es bastante oxidante, modifica el color del mosto y provoca un alto porcentaje de muerte celular (Botezatu et al., 2021). Además, el O_2 generado por la acción de la CAT puede ser utilizado por la GOX (Bankar et al., 2009).

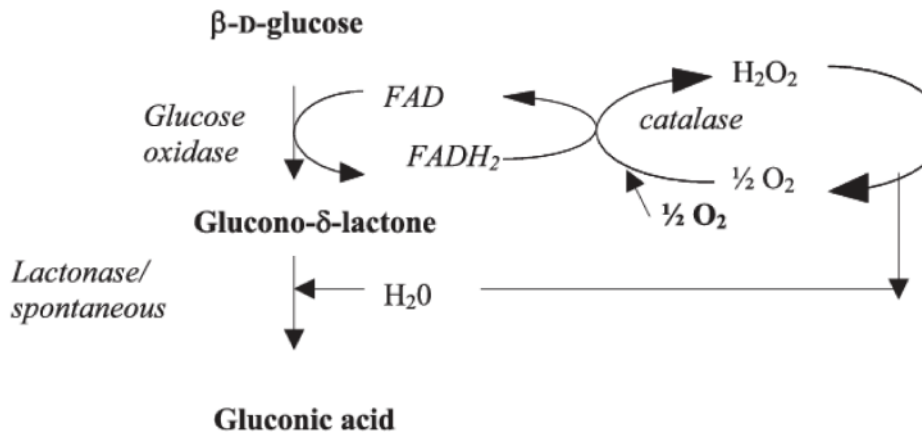


Figura 1: Oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa (Botezatu et al., 2021).

La enzima GOX tiene un origen fúngico y, aunque se encuentra presente en diferentes microorganismos, predomina en hongos filamentosas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, siendo *Aspergillus niger* la principal fuente de su producción industrial (Biyela et al., 2009; Voget, 1985).

Con el objetivo de que la actividad enzimática sea eficiente, se debe estudiar la concentración óptima de enzima, así como los distintos factores que influyen en su eficacia durante la vinificación, como son la temperatura de incubación, el pH y el grado de aireación (Biyela et al., 2009).

La temperatura óptima de actuación de la enzima se encuentra entre los 30 y 40°C. Por lo general, la cinética enzimática aumenta a medida que la temperatura también lo hace; sin embargo, en el caso de la GOX ocurre todo lo contrario, lo cual se debe a la disminución de la solubilidad del O_2 (Pickering et al., 1998). Por otra parte, el pH óptimo de la GOX se halla entre los valores 5,5 y 6,0 (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998), aunque la enzima es estable en un amplio rango que oscila entre 4,0 y 7,0. El bajo pH del mosto es un factor limitante tanto de la oxidación de la glucosa por la GOX, como de la velocidad de esta reacción (Pickering et al., 1998).

En el ámbito de la enología, los primeros ensayos sobre el empleo de la enzima GOX se llevaron a cabo con el fin de producir vinos con un contenido limitado de alcohol. Pickering et al. (1998) realizaron distintas pruebas con mosto de uva Riesling y Müller Thurgau con el objetivo de determinar los factores limitantes de la actividad del sistema enzimático GOX-CAT y optimizar el rendimiento del mismo. Para ello, antes de añadir la enzima, se desacidificaba el mosto con carbonato cálcico hasta obtener un pH 5,0 a

fin de favorecer la oxidación de la glucosa por la GOX. El uso de esta técnica permitió que la fermentación alcohólica se desarrollase sin incidentes, y la reducción de etanol oscilase entre un 36 y 40% con respecto a los vinos control. A su vez, se produjo una disminución de los niveles de ácido málico y, sobre todo, de ácido tartárico en el vino final, lo cual minimizó el desequilibrio de acidez causado por la alta concentración de ácido glucónico. Sin embargo, todo esto puede modificar el perfil fenólico tanto del mosto como del vino (Pickering et al., 1999).

Más recientemente, se han efectuado distintos estudios sobre la aplicación de la GOX para la reducción del grado alcohólico del vino eliminando la etapa previa de desacidificación del mosto. En variedades tintas, se ha alcanzado una reducción del 0,68% (v/v) del grado alcohólico del vino al tratar mosto de uva Pinotage (Biyela et al., 2009) y una del 3,0% (v/v) en vinos de la variedad Carmenere, aunque en este último caso se observó una oxidación de los compuestos fenólicos y pigmentos rojos del mosto en presencia de H₂O₂ (Valencia et al., 2017). En variedades blancas, se ha obtenido una reducción del grado alcohólico del 2,0% (v/v) al tratar mosto de uva Riesling y Pinot blanc; no obstante, los vinos resultantes son significativamente más ácidos y poseen una tipicidad menor, ya que el perfil aromático y la percepción sensorial han sido alterados (Röcker et al., 2016).

Asimismo, Vicente (2021) y Botezatu et al. (2021) han estudiado el uso del sistema enzimático GOX-CAT en mosto de uva Verdejo y Riesling respectivamente. En ambos casos, la oxidación de la glucosa a ácido glucónico fue la responsable de la rápida bajada del pH, del aumento de la acidez total y, en el caso de este último, de la mejora de múltiples características organolépticas del color, aroma y sabor del vino. También se ha observado que la intensidad colorante disminuyó y predominó el color amarillo sobre el naranja, ámbar o dorado característicos de la variedad. Además, el aroma del vino fue floral, afrutado, dulce y cítrico, y en su sabor destacaron las notas cítricas, frutales y agrias (Botezatu et al., 2021). Vicente (2021) llegó a la conclusión de que una dosis de GOX de 10 U/mL de mosto permitió una notable reducción en la concentración de glucosa en el mismo, la cual supuso una bajada del grado alcohólico de entre 1,5 y 2,5% (v/v) e incrementó la intensidad de color del vino.

Una alternativa para mejorar la aplicabilidad y rentabilidad del proceso enzimático con GOX-CAT es su uso en estado inmovilizado. Existe muy poca información sobre el uso de GOX inmovilizada para reducir la concentración de glucosa en mosto (Ruiz et al., 2018). En este estudio, se optimizaron las condiciones de encapsulación de la enzima GOX en perlas huecas de Ca-alginato, obteniéndose un inmovilizado con una mayor eficacia para reducir el contenido de glucosa en un mosto sintético (compuesto por glucosa, fructosa y ácido tartárico) a pH 3,0 - 4,0, respecto a la enzima en estado libre.

1.4. Inmovilización de enzimas como alternativa al uso de enzimas en estado libre

La inmovilización de enzimas es un proceso en el que se confina o localiza a la enzima en una región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica (Yushkova et al., 2019; Arroyo, 1998). Normalmente, esta

técnica modifica en gran medida el comportamiento enzimático, es decir, se produce un incremento en la estabilidad de las enzimas y un aumento, disminución, o incluso la pérdida de su actividad (Arroyo, 1998).

A continuación, se muestra la clasificación de los distintos métodos de inmovilización de enzimas en función de si la retención de la enzima en el soporte es física o la unión de la enzima al soporte es química (Figuras 2 y 3):

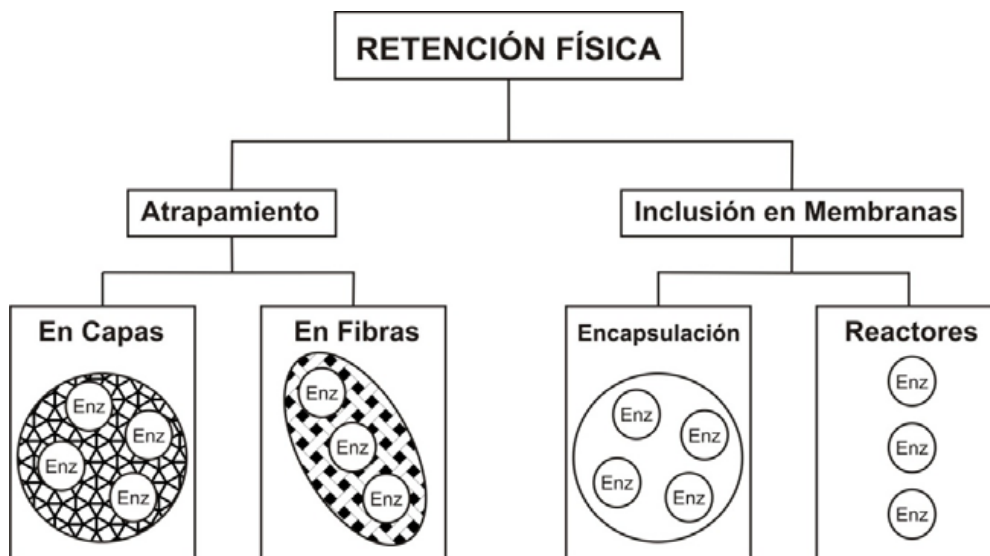


Figura 2: Métodos de inmovilización mediante retención física (Arroyo, 1998).

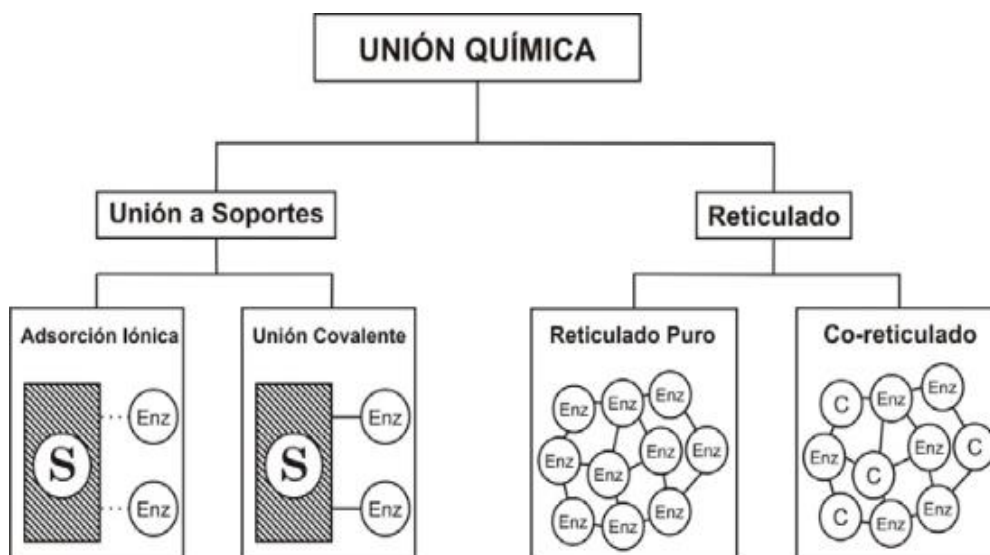


Figura 3: Métodos de inmovilización mediante unión química (Arroyo, 1998).

El procedimiento más utilizado es la inmovilización mediante unión química, concretamente la asociación a soportes, los cuales pueden ser inorgánicos u orgánicos (polímeros naturales o sintéticos). Los factores más importantes a tener en cuenta a la hora de escoger el método de inmovilización son las condiciones de la reacción

biocatalizada, el tipo de reactor que se va a emplear y el tipo de sustrato que se tiene que procesar (Yushkova et al., 2019; Arroyo, 1998).

En la industria alimentaria, es cada vez más frecuente el uso de procesos catalizados por enzimas inmovilizadas frente al de catalizadores convencionales no biológicos (Ottone et al., 2020; Arroyo, 1998), lo cual se debe a las numerosas ventajas que el procedimiento conlleva, siendo las siguientes las más relevantes:

- Las enzimas presentan una gran actividad catalítica, es decir, aumentan la velocidad de las reacciones químicas del medio.
- Se puede reutilizar el sistema enzimático en distintos lotes de mosto, reduciendo así los costes económicos del uso de enzimas y mejorando el control del proceso enzimático.
- Muestran una gran especificidad de sustrato, incluso estereoselectividad y regioselectividad.
- Presentan gran actividad enzimática a temperatura ambiente y presión atmosférica.
- Es una técnica sencilla desde el punto de vista experimental.
- Se precisa de poca cantidad de enzima.

A pesar de todas estas ventajas, la inmovilización de enzimas presenta algún que otro inconveniente, como pueden ser la inestabilidad enzimática bajo las condiciones de trabajo, la rigurosidad tanto del control de las condiciones de inmovilización, como de la comprobación de la inalterabilidad de los grupos reactivos de la proteína por la naturaleza química del proceso, o la gran sensibilidad de algunas enzimas frente a cambios de pH, fuerza iónica, etc. (Ottone et al., 2020; Yushkova et al., 2019; Arroyo, 1998).

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es el estudio de las condiciones de uso del sistema enzimático GOX-CAT en estado inmovilizado en mosto de uva de la variedad Verdejo, con el fin de disminuir su concentración en glucosa y aumentar su acidez.

3. Materiales y métodos

3.1. Co-inmovilización del sistema enzimático GOX-CAT

Los preparados comerciales empleados como fuente de GOX y CAT son Gluzyme Mono 10.000 BG (10.000 U/g) y Catazyme 25 L (25.000 U/g) respectivamente, ambos de la compañía biotecnológica Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Dichas enzimas se co-inmovilizaron en un único soporte, el cual fue un gel mixto orgánico-inorgánico de alginato cálcico y sílice (ALG-Si). A continuación, se describe el proceso llevado a cabo (Del-Bosque et al., 2023).

Se preparó una mezcla de silicato coloidal (LUDOX® HS40) y silicato de sodio 6,13 M ajustada a pH 6,6 con HCl 1 M. A esta mezcla se le añadió alginato de sodio y las soluciones de GOX y CAT, y se ajustó de nuevo a pH 6,6. La mezcla final se hizo gotear por gravedad a través de una jeringuilla de 10 mL sobre 200 mL de CaCl₂ 0,2 M y a una altura de 20 cm para favorecer la simetría esférica de las biocápsulas formadas. Con el fin de completar el proceso de gelificación y endurecimiento de dichas biocápsulas, estas se dejan en agitación a 300 rpm durante 1 hora. Por último, se filtraron, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar durante unos minutos sobre papel de filtro.

Para la preparación de unas 300 biocápsulas se necesitaron aproximadamente 60 mL de gel de ALG-Si cargado con GOX y CAT. Por ello, en el procedimiento se emplearon 4,43 g de silicato coloidal, 294 µL de silicato de sodio 6,13 M, 48,30 mL de agua destilada, 0,90 g de alginato de sodio, 72 µL de la solución de CAT y 6 mL de la solución de GOX, la cual se preparó disolviendo 0,54 g del preparado enzimático en 18 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 6,5.

3.2. Tratamiento enzimático de los mostos

Para la realización de los distintos ensayos, se ha empleado mosto de la variedad Verdejo procedente de la vendimia 2020, el cual se encontraba congelado con el fin de poder conservarlo. El mosto se descongeló a temperatura ambiente, se homogenizó y centrifugó a 5.000 rpm durante 5 minutos (Sorvall ST 8R, Osterode am Harz, Alemania), se pasteurizó a 90°C durante 30 s (Röcker et al., 2016) para evitar así el arranque de una fermentación alcohólica espontánea, y se dividió en 4 lotes iguales: A (pH inicial), B (pH ajustado a 3,60), C (pH ajustado a 3,80) y D (pH ajustado a 4,00). El ajuste del pH se llevó a cabo con NaOH 4 N. A continuación, se muestra la cuantificación previa de ciertos parámetros del mosto (Tabla 1):

Tabla 1: Características del mosto inicial.

ANALÍTICA	RESULTADO
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,3 ± 0,3
Anhídrido sulfuroso total (mg/L)	50 ± 4
Color (abs a 420 nm, UA)	0,31 ± 0,08
Glucosa (g/L)	115 ± 13
Grado alcohólico probable (% Vol)	12,7 ± 0,3
Grado brix (° Brix)	21,9 ± 0,3
pH	3,49 ± 0,08

Para evaluar y comparar la actividad de GOX y CAT cuando se encuentran inmovilizadas y en estado libre, y como consecuencia, optimizar el potencial del sistema enzimático, se ha empleado la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR) con 3 variables distintas e independientes relacionados con 3 variables de respuesta

dependientes. De forma simultánea y bajo las mismas condiciones experimentales se realizaron 2 ensayos independientes con mosto de la variedad Verdejo:

- A) GOX y CAT co-inmovilizadas en biocápsulas de ALG-Si.
- B) Sistema enzimático GOX-CAT en estado libre.

Siendo las variables independientes (i-iii) y las variables de respuesta dependientes (I-III) de ambos ensayos A y B respectivamente:

- i) Actividad enzimática de GOX y CAT (10-15-20 biocápsulas para el ensayo A o 1,6-2,4-3,6 U/mL de mosto para el ensayo B). Al utilizar el número de biocápsulas necesario para los 5 mL de mosto, se logró mantener la misma actividad enzimática que se utilizó en los ensayos con las enzimas en estado libre. Además, se empleó una relación de actividad GOX y CAT de 1:1 en todos los ensayos.
 - ii) pH inicial del mosto (3,60-3,80-4,00).
 - iii) Temperatura (10-15-20 °C).
-
- I) Consumo de glucosa.
 - II) Disminución del pH.
 - III) Variación de la intensidad de color.

Se seleccionó un diseño experimental Box-Behnken rotatorio, ortogonal, cuadrático procesado y con 7 puntos centrales para poder estimar el error experimental. Este generó 19 experimentos para cada uno de los ensayos mencionados anteriormente (Tablas 2 y 3). Además, se prepararon muestras de mosto sin ningún tipo de enzima que sirvieron como control.

En los tubos Falcón de 50 mL se añadieron 5 mL de mosto con el pH pertinente (3,60-3,80-4,00) y las distintas concentraciones de enzimas inmovilizadas o libres indicadas anteriormente. Posteriormente, todas las muestras se dejaron incubar durante 48 horas y en agitación a 150 rpm (Orbital Shaker SO1, Stuart™ Scientific, Stone, Reino Unido), en una estufa a 10, 15 o 20°C según correspondiese. Transcurrido ese tiempo se determinó el pH, la intensidad de color y la concentración de glucosa de los mostos con el fin de comprobar el potencial real del sistema enzimático, es decir, la disminución de la concentración de glucosa y como consecuencia, la reducción del grado alcohólico.

3.3. Control analítico

3.3.1. pH

La determinación del pH se realiza con ayuda de un pH-metro de sobremesa (SensION™ + pH3, HACH LANGE®, Barcelona, España), y se basa en la diferencia de potencial existente entre el electrodo de referencia y el electrodo de medida (OIV-MA-AS313-15).

3.3.2. Intensidad de color

La determinación de la intensidad de color de los mostos se realiza con ayuda de un espectrofotómetro mediante el método rápido de Glories, el cual se basa en medir en cubetas de 1 cm de espesor la absorbancia de los mostos a 420 nm (OIV-MA-AS2-07B).

3.3.3. Concentración de glucosa

Para la determinación de la concentración de glucosa se realiza una dilución 1,5:100 de cada muestra y se emplea un kit de D-fructosa y D-glucosa (K-FRGLQR 02/17, Megazyme, Bray, Irlanda), cuyo fundamento es el siguiente: la enzima hexocinasa (HK) en presencia de adenosín-5'-trifosfato (ATP) fosforila la D-glucosa en glucosa-6-fosfato (G-6-P) y forma simultáneamente adenosín-5'-difosfato (ADP). Posteriormente, la G-6-P es oxidada por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺) a gluconato-6-fosfato con la formación de NADPH, siendo la cantidad de NADPH estequiométrica con la cantidad de D-glucosa. Por ello y para cuantificar el incremento de NADPH, se mide la absorbancia a 340 nm con ayuda de un espectrofotómetro.

3.4. Tratamiento estadístico de los datos

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa informático STATGRAPHICS 19 Centurion (Virginia, EE.UU.) con un modelo de segundo orden para las variables independientes y a un nivel significativo de $\alpha=0,05$. El resultado del ANOVA para cada variable de respuesta dependiente se visualizó a través de un diagrama de Pareto, en el que se representa el valor absoluto del efecto estimado de cada factor estudiado. Para realizar el gráfico del efecto principal de una determinada variable, se ha fijado el resto de las variables a sus niveles medios (15 biocápsulas o 2,4 U/mL de mosto, pH 3,80 o 15°C).

4. Resultados y discusión

El efecto de cada factor se define como la modificación de la respuesta que se observa como consecuencia al cambio de nivel del mismo, promediado sobre los niveles del resto de factores. Con el fin de determinar la influencia de las variables experimentales sobre las respuestas, es necesario cuantificar los efectos de cada factor (Simó, 2021).

En las Tablas 2 y 3 se recogen los distintos resultados del estudio, es decir, el consumo de glucosa expresado en g/L, la disminución del pH y la variación de la intensidad de color de los mostos expresada en unidades de absorbancia (UA) a 420 nm. Más adelante y en función del estado libre o inmovilizado del sistema enzimático GOX-CAT, se muestran estos resultados de forma gráfica y desglosada.

Tabla 2: Diseño experimental y resultados del estudio para el sistema enzimático en estado inmovilizado (ALG-Si = Biocápsulas de ALG-Si cargadas con GOX y CAT).

Nº DE MUESTRA	TIPO DE INÓCULO	Nº DE BIOCÁPSULAS	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/mL)	pH INICIAL DEL MOSTO	TEMPERATURA (°C)	DISMINUCIÓN DEL pH	VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD DE COLOR (UA)	CONSUMO DE GLUCOSA (g/L)
1	ALG-Si	15	2,4	4,00	20,0	0,55	0,406	30,6
2	ALG-Si	10	1,6	4,00	15,0	0,51	0,418	13,1
3	ALG-Si	20	3,6	3,80	20,0	0,49	0,340	30,4
4	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,47	0,363	26,3
5	ALG-Si	15	2,4	3,60	20,0	0,33	0,335	18,0
6	ALG-Si	10	1,6	3,80	10,0	0,37	0,423	15,4
7	ALG-Si	15	2,4	3,60	10,0	0,34	0,332	23,6
8	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,43	0,367	26,0
9	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,44	0,365	24,7
10	ALG-Si	20	3,6	3,80	10,0	0,48	0,355	30,3
11	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,43	0,360	26,3
12	ALG-Si	10	1,6	3,60	15,0	0,28	0,361	12,2
13	ALG-Si	20	3,6	3,60	15,0	0,39	0,297	35,0
14	ALG-Si	10	1,6	3,80	20,0	0,32	0,403	16,6
15	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,44	0,365	26,1
16	ALG-Si	15	2,4	4,00	10,0	0,53	0,412	24,3
17	ALG-Si	20	3,6	4,00	15,0	0,60	0,364	37,1
18	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,41	0,362	25,3
19	ALG-Si	15	2,4	3,80	15,0	0,45	0,362	26,5

Tabla 3: Diseño experimental y resultados del estudio para el sistema enzimático en estado libre (EL= Enzima Libre).

Nº DE MUESTRA	TIPO DE INÓCULO	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/mL)	pH INICIAL DEL MOSTO	TEMPERATURA (°C)	DISMINUCIÓN DEL pH	VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD DE COLOR (UA)	CONSUMO DE GLUCOSA (g/L)
1'	EL	2,4	4,00	20,0	0,58	0,262	35,0
2'	EL	1,6	4,00	15,0	0,63	0,311	33,7
3'	EL	3,6	3,80	20,0	0,52	0,205	43,4
4'	EL	2,4	3,80	15,0	0,53	0,219	37,2
5'	EL	2,4	3,60	20,0	0,48	0,169	34,4
6'	EL	1,6	3,80	10,0	0,62	0,310	21,8
7'	EL	2,4	3,60	10,0	0,55	0,232	34,5
8'	EL	2,4	3,80	15,0	0,55	0,235	33,1
9'	EL	2,4	3,80	15,0	0,56	0,247	38,1
10'	EL	3,6	3,80	10,0	0,55	0,236	45,5
11'	EL	2,4	3,80	15,0	0,56	0,245	38,4
12'	EL	1,6	3,60	15,0	0,52	0,206	15,6
13'	EL	3,6	3,60	15,0	0,48	0,170	45,4
14'	EL	1,6	3,80	20,0	0,52	0,210	32,4
15'	EL	2,4	3,80	15,0	0,55	0,240	37,7
16'	EL	2,4	4,00	10,0	0,64	0,328	36,1
17'	EL	3,6	4,00	15,0	0,58	0,262	45,7
18'	EL	2,4	3,80	15,0	0,54	0,234	34,0
19'	EL	2,4	3,80	15,0	0,55	0,236	33,7

4.1. Consumo de glucosa

Como se puede observar en las Figuras 4 y 5, tanto la concentración de GOX y CAT, ya se encuentren inmovilizadas en biocápsulas de ALG-Si o en estado libre, como el pH inicial del mosto son los factores significativos para el consumo de glucosa ($\alpha = 0,05$). Ambos tienen un efecto positivo, lo que significa que cuanto mayor sea el pH inicial del mosto y el número de biocápsulas o la cantidad de GOX y CAT adicionada de manera independiente, mayor es el consumo de glucosa por parte del sistema enzimático. El factor "número de biocápsulas" o "concentración de GOX y CAT" tiene un efecto muy superior al resto debido a que al aumentar esta variable se incrementa la actividad enzimática de GOX y CAT, y como consecuencia, la oxidación de la glucosa presente en el mosto. A su vez, tanto la interacción entre el pH inicial del mosto y la temperatura cuando GOX y CAT se encuentran en estado inmovilizado, como la interacción entre la concentración de GOX y CAT y el pH inicial del mosto o la temperatura cuando dichas enzimas se encuentran en estado libre son estadísticamente significativas para el consumo de glucosa ($\alpha = 0,05$).

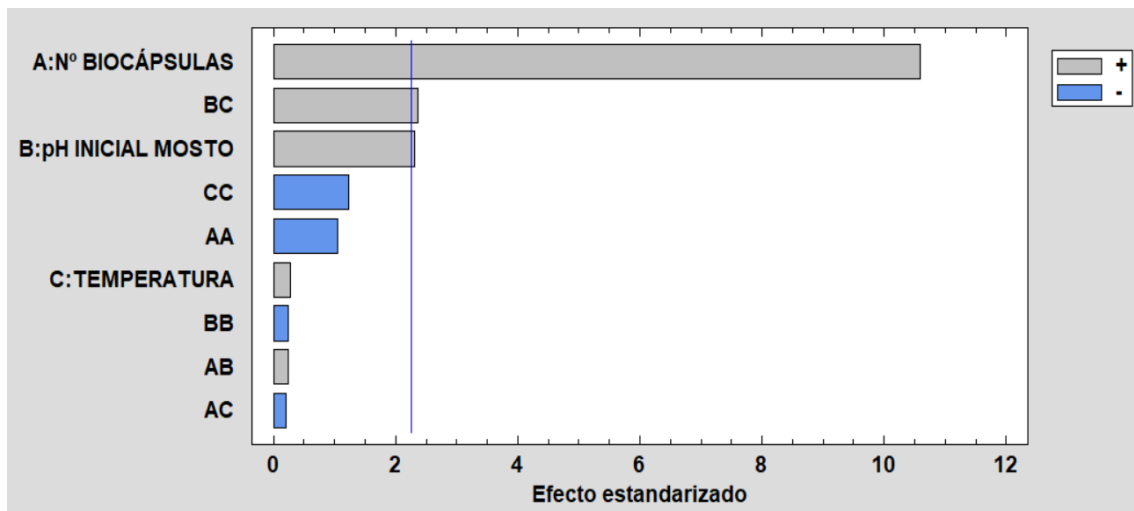


Figura 4: Diagrama de Pareto Estandarizada para el consumo de glucosa por GOX y CAT en estado inmovilizado.

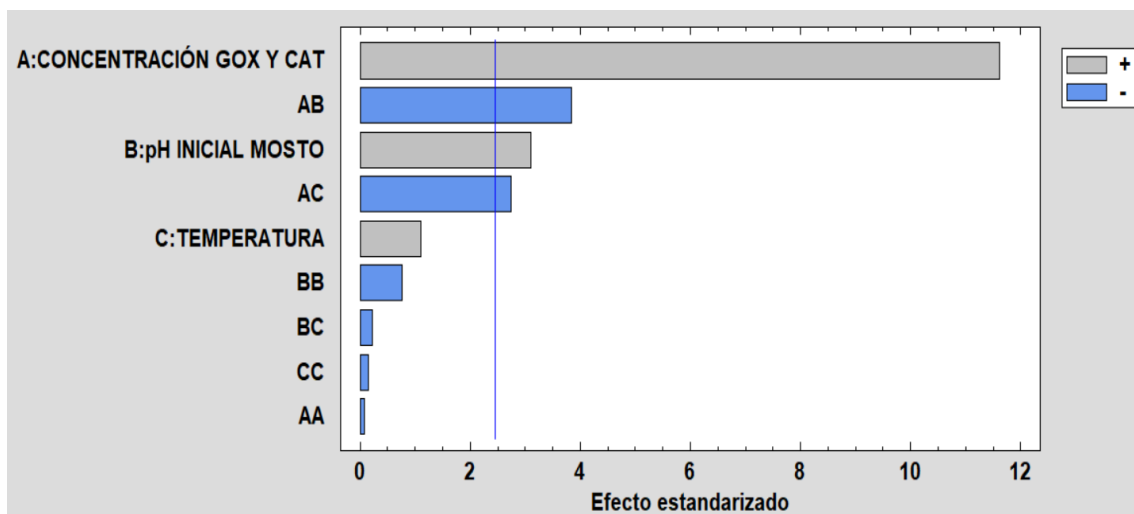


Figura 5: Diagrama de Pareto Estandarizada para el consumo de glucosa por GOX y CAT en estado libre.

En las Figuras 6 y 7 se muestra el efecto principal de cada factor sobre el consumo de glucosa para las enzimas inmovilizadas y libres respectivamente. Como se ha podido observar también en los diagramas de Pareto anteriores (Figuras 4 y 5), la oxidación de glucosa por parte del sistema enzimático GOX-CAT tanto en estado inmovilizado como en estado libre aumenta cuanto mayor es el pH inicial del mosto y el número de biocápsulas o la cantidad de GOX y CAT adicionada de manera independiente. En ambos casos, la temperatura no ha sido un factor estadísticamente significativo para el consumo de glucosa.

Cuando se añadió la dosis menor de biocápsulas el consumo de glucosa resultante fue de 15,2 g/L, valor que se incrementó hasta alcanzar los 34,1 g/L para la dosis más alta de las mismas, pudiéndose observar que el consumo de glucosa aumentó en un factor de 2,2. Por otro lado, cuando la dosis adicionada de GOX y CAT en estado libre fue menor se obtuvo un consumo de glucosa de 26,4 g/L, valor que se incrementó hasta alcanzar los 45,5 g/L para la dosis más alta de las mismas, pudiéndose observar que el consumo de glucosa aumentó en un factor de 1,7.

Por otra parte, cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le añadieron biocápsulas fue menor, el consumo de glucosa resultante fue de 23,5 g/L, valor que se incrementó hasta alcanzar los 27,6 g/L para el valor más alto del mismo, mientras que cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le adicionaron GOX y CAT en estado libre fue menor, se obtuvo un consumo de glucosa de 32,6 g/L, valor que se incrementó hasta alcanzar los 37,7 g/L para el valor más alto del mismo, pudiéndose observar que el consumo de glucosa aumentó en un factor de 1,2 en ambos casos.

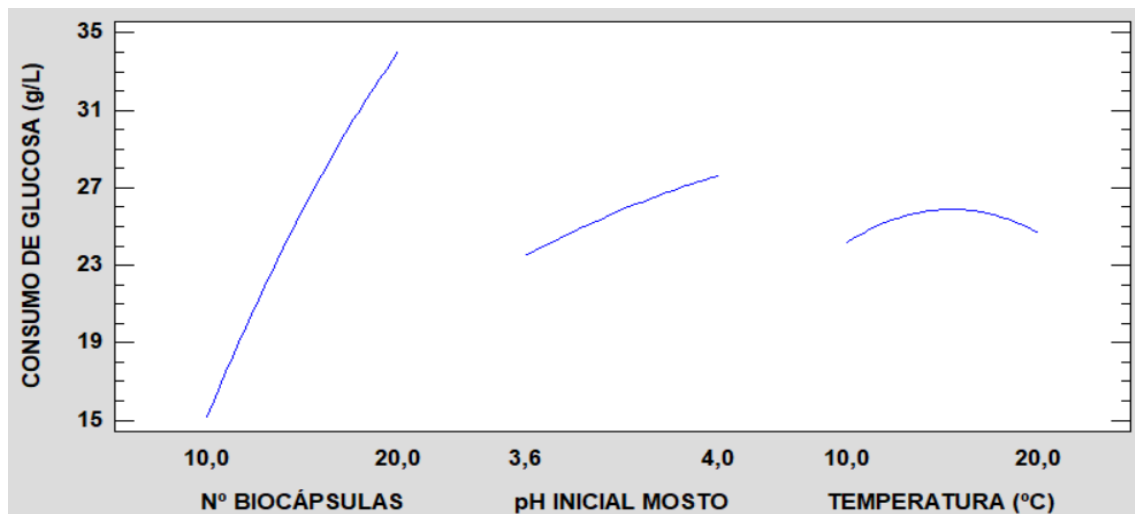


Figura 6: Gráfica de Efectos Principales para el consumo de glucosa por GOX y CAT en estado inmovilizado.

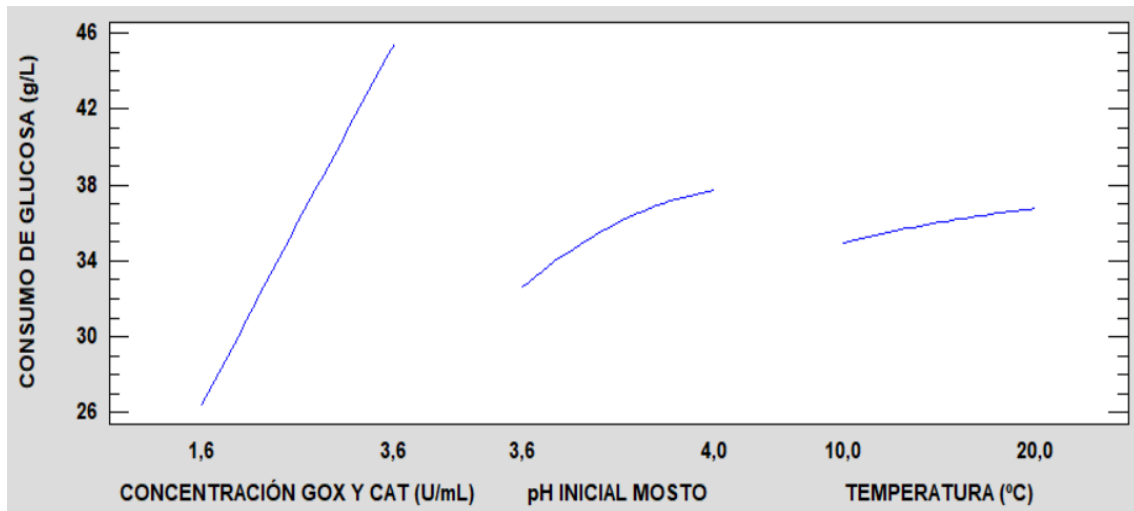


Figura 7: Gráfica de Efectos Principales para el consumo de glucosa por GOX y CAT en estado libre.

En la Figura 8 se puede ver como el consumo de glucosa por parte de GOX en estado inmovilizado es similar para ambos valores de pH cuando la temperatura es más baja. Sin embargo, el sistema enzimático oxida una mayor cantidad de glucosa a pH 4,00, valor más próximo al pH óptimo de la GOX, el cual se encuentra entre 5,5 y 6,0 (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998), que a pH 3,60 cuando la temperatura es más elevada.

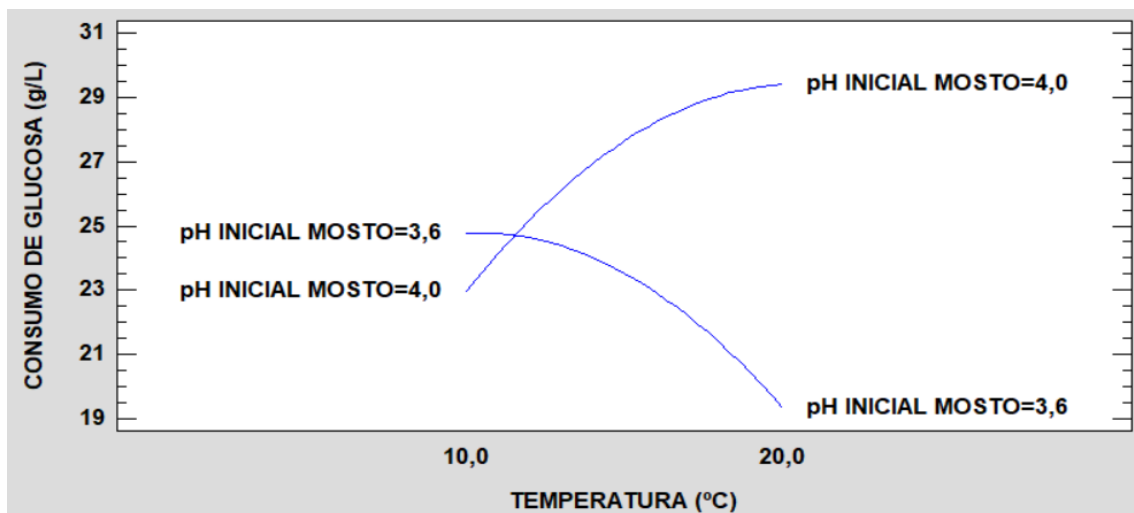


Figura 8: Gráfica de Interacción entre el pH inicial del mosto y la temperatura para el consumo de glucosa por GOX y CAT en estado inmovilizado.

En la Figura 9 se puede ver como el consumo de glucosa por parte de GOX y CAT en estado libre es similar para ambos valores de pH cuando la concentración de dichas enzimas es más elevada. Sin embargo, el sistema enzimático oxida una mayor cantidad de glucosa a pH 4,00 que a pH 3,60 cuando la concentración de GOX y CAT es más baja, ya que el bajo pH del mosto es un factor limitante tanto de la oxidación de la glucosa por la GOX, como de la velocidad de esta reacción (Pickering et al., 1998).

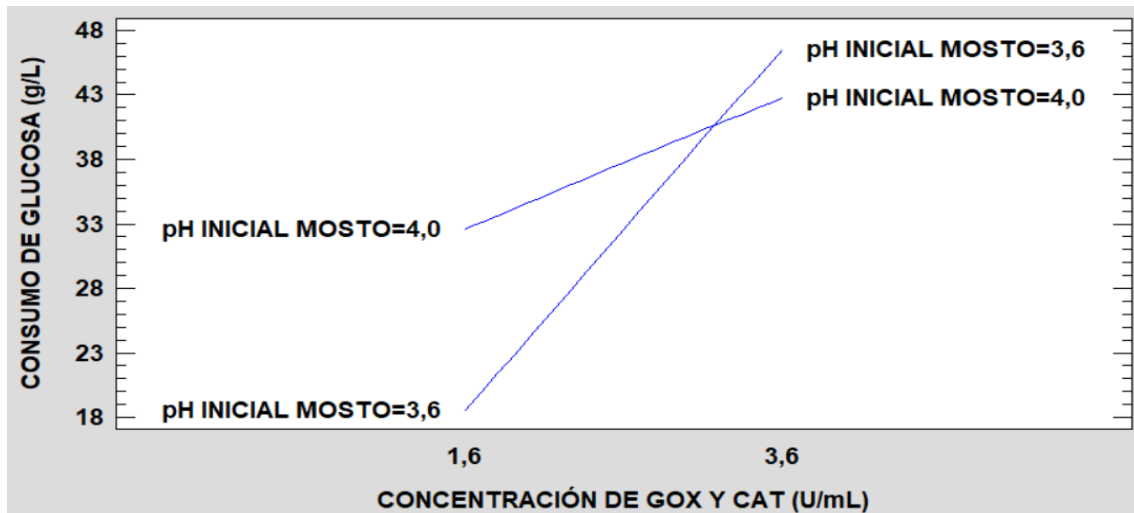


Figura 9: Gráfica de Interacción entre el pH inicial del mosto y la concentración de GOX y CAT para el consumo de glucosa por el sistema enzimático en estado libre.

En la Figura 10 se puede ver como el consumo de glucosa por parte de GOX y CAT en estado libre es mayor cuando la concentración de dichas enzimas es más elevada. Cuando la concentración enzimática es mayor, el incremento de la temperatura supone una ligera disminución del consumo de glucosa, mientras que se observa un efecto contrario cuando la concentración de GOX y CAT es menor.

Por lo general, las reacciones enzimáticas aumentan a medida que la temperatura también lo hace; sin embargo, en el caso de la GOX ocurre todo lo contrario, lo cual se debe a la disminución de la solubilidad del O_2 (Pickering et al., 1998). Por esta razón, la GOX es capaz de degradar una cantidad significativa de la glucosa del mosto cuando la temperatura oscila entre 10 y 15°C. Mantener el mosto a una de estas temperaturas mejorará el rendimiento de la enzima y evitará que la fermentación alcohólica arranque demasiado pronto.

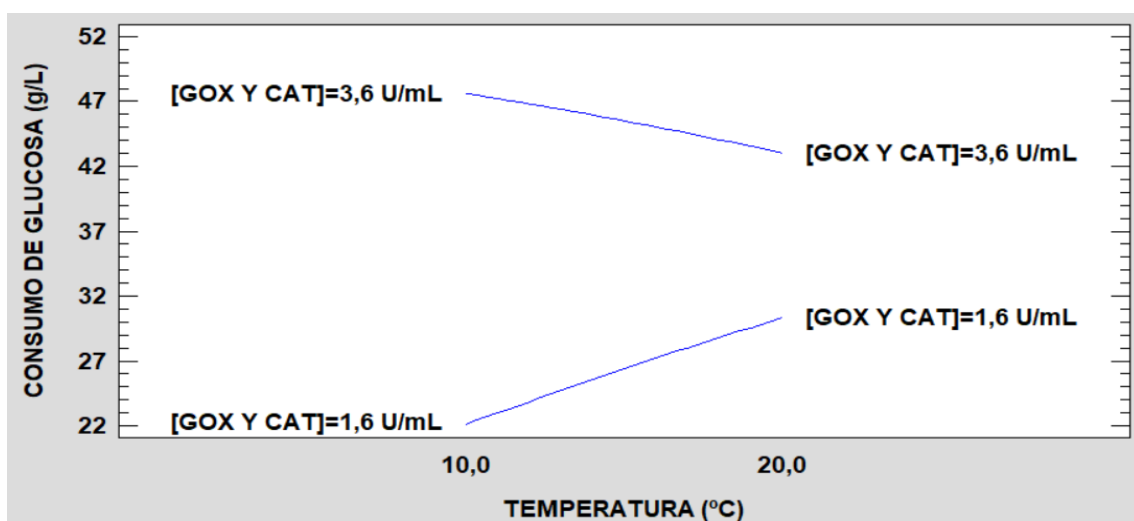


Figura 10: Gráfica de Interacción entre la temperatura y la concentración de GOX y CAT para el consumo de glucosa por el sistema enzimático en estado libre.

Cuando GOX y CAT se encuentran en estado inmovilizado, el consumo de glucosa teórico óptimo que se puede llegar a alcanzar es de 37,6 g/L si se añaden 20 biocápsulas, el pH inicial del mosto es 4,00 y la temperatura es de 20,0°C, mientras que cuando el sistema enzimático se encuentra en estado libre, el consumo de glucosa teórico óptimo que se puede llegar a alcanzar es de 48,4 g/L si se añaden 3,6 U/mL de enzimas, el pH inicial del mosto es 3,61 y la temperatura es de 10,0°C.

4.2. Disminución del pH

Como se puede observar en la Figura 11, tanto el pH inicial del mosto como el número de biocápsulas son los factores significativos para la disminución del pH cuando las enzimas GOX y CAT se encuentran inmovilizadas en biocápsulas de ALG-Si ($\alpha = 0,05$). Ambos tienen un efecto positivo, lo que significa que cuanto mayor sea el pH inicial del mosto y el número de biocápsulas, mayor es la disminución del pH por parte del sistema enzimático. En este caso, la temperatura no ha sido un factor estadísticamente significativo para la disminución del pH.

Por otro lado, y como se puede observar en la Figura 12, tanto el pH inicial del mosto como la concentración enzimática, la temperatura y la interacción entre estas dos últimas son significativos para la disminución del pH cuando las enzimas GOX y CAT se encuentran en estado libre ($\alpha = 0,05$). Solamente el factor "pH inicial del mosto" tiene un efecto positivo, es decir, cuanto mayor sea este, mayor es la disminución del pH por parte del sistema enzimático, mientras que los factores restantes tienen un efecto negativo, lo que significa que cuanto mayor sea la temperatura y la concentración de GOX y CAT, menor es la disminución del pH del mosto.

En ambos estados enzimáticos, es decir, GOX y CAT inmovilizadas o libres, el factor "pH inicial del mosto" tiene un efecto superior al resto debido a que la GOX oxida una mayor cantidad de glucosa a pH más elevados, ya que estos valores son más próximos al pH óptimo de dicha enzima, el cual se encuentra entre 5,5 y 6,0 (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998). Por esta razón, si el consumo de glucosa aumenta, también lo hace la oxidación de la misma a ácido glucónico, y como consecuencia, se observa una bajada del pH del mosto.

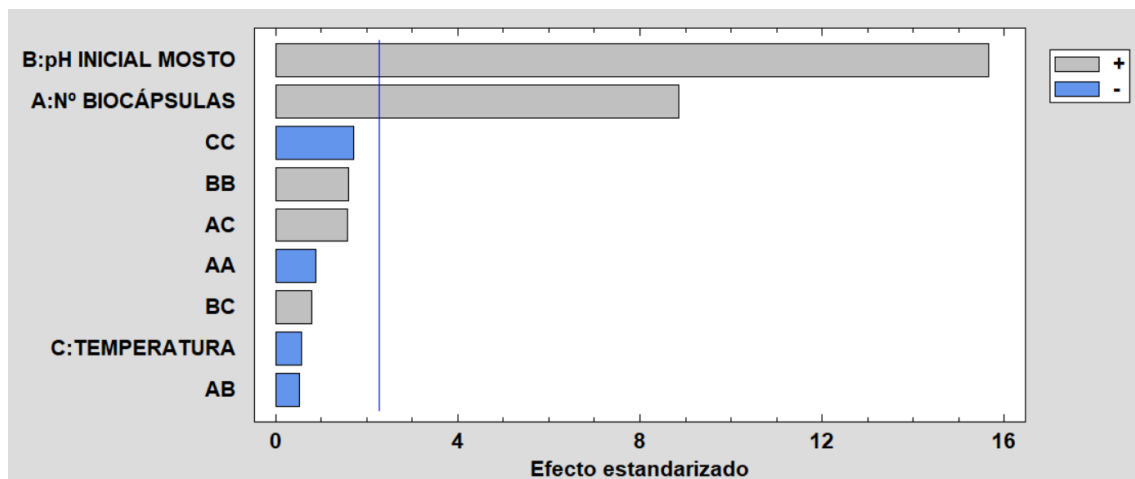


Figura 11: Diagrama de Pareto Estandarizada para la disminución del pH por GOX y CAT en estado inmovilizado.

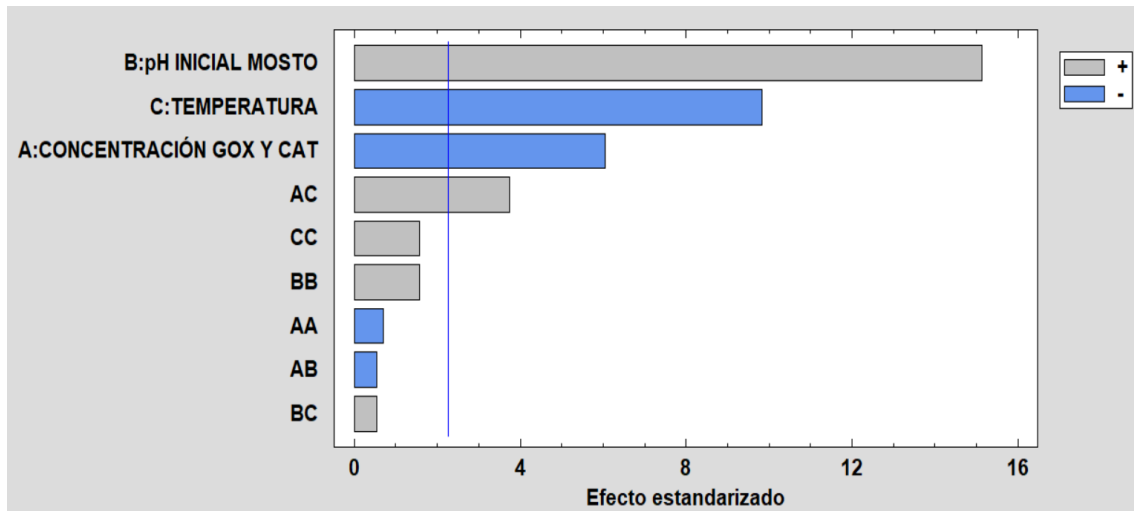


Figura 12: Diagrama de Pareto Estandarizada para la disminución del pH por GOX y CAT en estado libre.

En las Figuras 13 y 14 se muestra el efecto principal de cada factor sobre la disminución del pH para las enzimas inmovilizadas y libres respectivamente. Como se ha podido observar también en los diagramas de Pareto anteriores (Figuras 11 y 12), la disminución del pH por parte del sistema enzimático GOX-CAT en estado inmovilizado aumenta cuanto mayor es el número de biocápsulas y el pH inicial del mosto, mientras que la disminución del pH por parte del mismo sistema enzimático en estado libre también aumenta cuanto mayor es el pH inicial del mosto, pero se reduce cuanto mayor es la temperatura y la cantidad de GOX y CAT adicionada de manera independiente.

Cuando se añadió la dosis menor de biocápsulas la disminución del pH resultante fue de 0,37, valor que se incrementó hasta alcanzar los 0,49 para la dosis más alta de las mismas, pudiéndose observar que la disminución del pH aumentó en un factor de 1,3. Sin embargo, cuando la dosis adicionada de GOX y CAT en estado libre fue menor se obtuvo una disminución del pH de 0,57, valor que disminuyó hasta alcanzar los 0,53 para la dosis más alta de las mismas, pudiéndose observar que la disminución del pH decreció en un factor de 0,9. Este resultado es inesperado y contradictorio con el observado en la Figura 7, donde el consumo de glucosa aumenta cuanto mayor es la cantidad adicionada de las enzimas GOX y CAT en estado libre, y como consecuencia, se genera una concentración mayor de ácido glucónico.

Por otra parte, cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le añadieron biocápsulas fue menor, la disminución del pH resultante fue de 0,35, valor que se incrementó hasta alcanzar los 0,56 para el valor más alto del mismo, pudiéndose observar que la disminución del pH aumentó en un factor de 1,6. Por otro lado, cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le adicionaron GOX y CAT en estado libre fue menor, se obtuvo una disminución del pH de 0,51, valor que se incrementó hasta alcanzar los 0,61 para el valor más alto del mismo, pudiéndose observar que la disminución del pH aumentó en un factor de 1,2.

Por último, cuando la temperatura del mosto al que posteriormente se le adicionaron GOX y CAT en estado libre fue menor, la disminución del pH resultante fue de 0,59, valor que disminuyó hasta alcanzar los 0,52 para la temperatura más alta, pudiéndose observar que la disminución del pH decreció en un factor de 0,9.

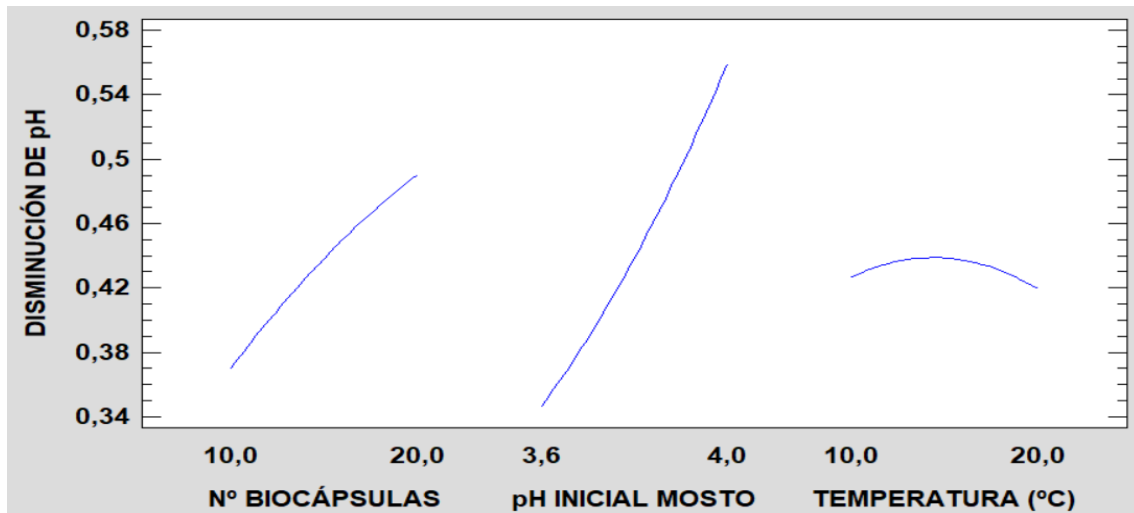


Figura 13: Gráfica de Efectos Principales para la disminución del pH por GOX y CAT en estado inmovilizado.

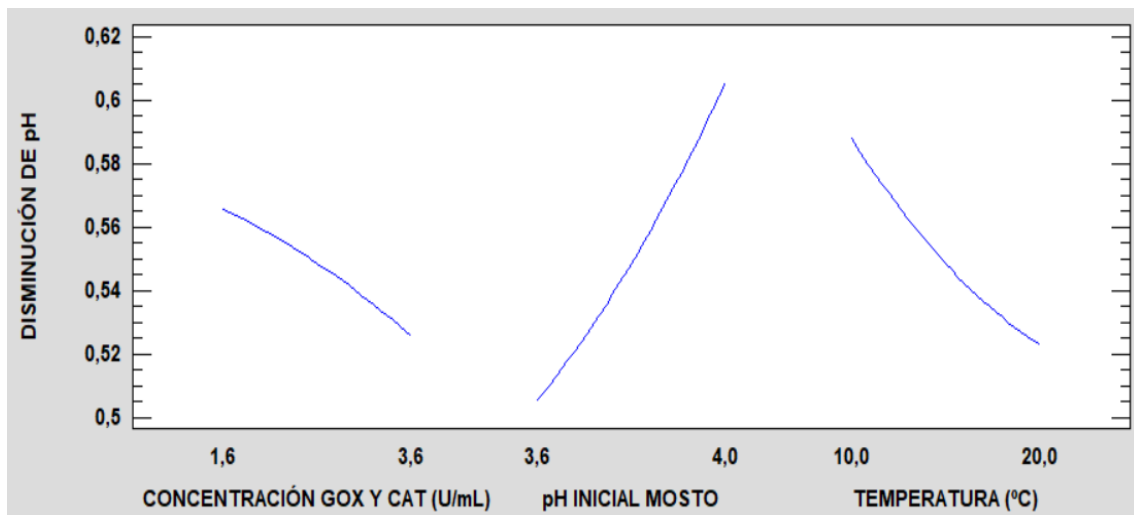


Figura 14: Gráfica de Efectos Principales para la disminución del pH por GOX y CAT en estado libre.

En la Figura 15 se puede ver como la disminución del pH por parte de GOX y CAT en estado libre es similar para ambas concentraciones de dichas enzimas cuando la temperatura es más elevada. Sin embargo, el sistema enzimático oxida una mayor cantidad de glucosa a ácido glucónico, y como consecuencia, disminuye el pH en mayor medida cuando la temperatura y la concentración de GOX y CAT son más bajas. Como se ha comentado anteriormente, la reacción enzimática de la GOX decrece a medida que la temperatura aumenta, lo cual se debe a la disminución de la solubilidad del O_2 (Pickering et al., 1998). Por esta razón, la GOX es capaz de degradar una cantidad significativa de la glucosa del mosto y transformarla en ácido glucónico cuando la temperatura oscila entre 10 y 15°C.

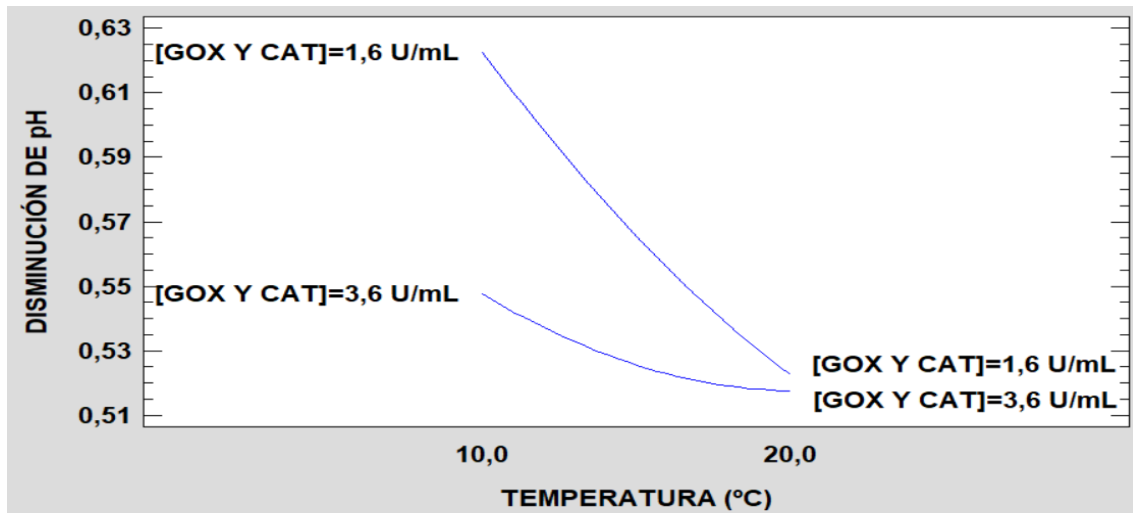


Figura 15: Gráfica de Interacción entre la temperatura y la concentración de GOX y CAT para la disminución del pH por el sistema enzimático en estado libre.

Cuando GOX y CAT se encuentran en estado inmovilizado, la disminución óptima del pH teórica que se puede llegar a alcanzar es de 0,61 si se añaden 20 biocápsulas, el pH inicial del mosto es 4,00 y la temperatura es de 18,0°C, mientras que cuando el sistema enzimático se encuentra en estado libre, la disminución óptima del pH teórica que se puede llegar a alcanzar es de 0,67 si se añaden 1,6 U/mL de enzimas, el pH inicial del mosto es 3,97 y la temperatura es de 10,0°C.

4.3. Variación de la intensidad de color

Como se puede observar en las Figuras 16 y 17, tanto la concentración de GOX y CAT, ya se encuentren inmovilizadas en biocápsulas de ALG-Si o en estado libre, como el pH inicial del mosto y la temperatura son significativos para la variación de la intensidad de color ($\alpha = 0,05$). Solamente el factor "pH inicial del mosto" tiene un efecto positivo, es decir, cuanto mayor sea este, mayor es la variación de la intensidad de color en el mosto por parte del sistema enzimático, mientras que los factores restantes tienen un efecto negativo, lo que significa que cuanto mayor sea la temperatura y el número de biocápsulas o la cantidad de GOX y CAT en estado libre, menor es la variación de la intensidad de color del mosto. En ambos casos, el factor "pH inicial del mosto" tiene un efecto superior al resto debido a que la GOX oxida una mayor cantidad de glucosa a pH más elevados, ya que estos valores son más próximos al pH óptimo de dicha enzima, el cual se encuentra entre 5,5 y 6,0 (Biyela et al., 2009; Pickering et al., 1998). Por esta razón, se puede apreciar una mejora del color del mosto y la disminución de la intensidad colorante del mismo entre otras características organolépticas (Botezatu et al., 2021) si el consumo de glucosa aumenta.

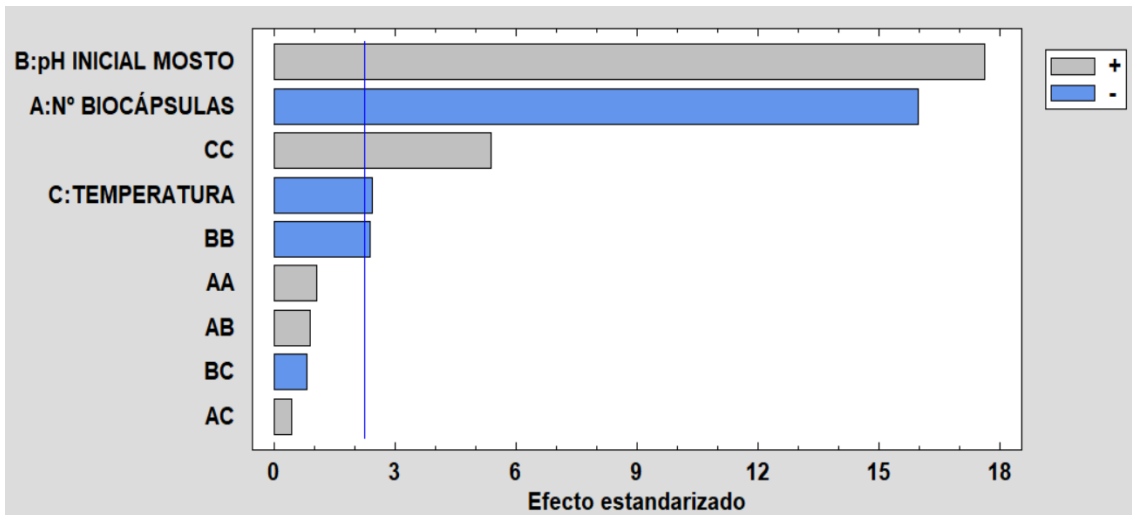


Figura 16: Diagrama de Pareto Estandarizada para la variación de la intensidad de color por GOX y CAT en estado inmovilizado.

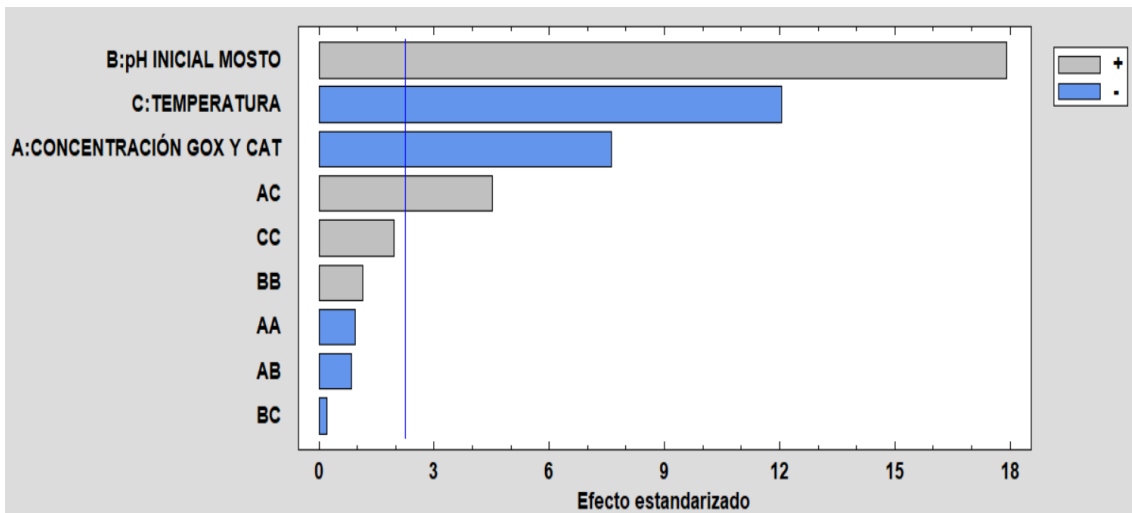


Figura 17: Diagrama de Pareto Estandarizada para la variación de la intensidad de color por GOX y CAT en estado libre.

En las Figuras 18 y 19 se muestra el efecto principal de cada factor sobre la variación de la intensidad de color para las enzimas inmovilizadas y libres respectivamente. Como se ha podido observar también en los diagramas de Pareto anteriores (Figuras 16 y 17), la variación de la intensidad de color por parte del sistema enzimático GOX-CAT tanto en estado inmovilizado como en estado libre aumenta cuanto mayor es el pH inicial del mosto, pero disminuye cuanto mayor es el número de biocápsulas o la cantidad de GOX y CAT adicionada en estado libre.

Simó (2021) y Massalha et al. (2007) llegaron a la conclusión de que la matriz utilizada para la inmovilización enzimática modifica la intensidad de color del mosto debido a que cuanto mayor fue el número de biocápsulas en los ensayos que realizaron, menor era la intensidad colorante de dicho mosto. Esto puede deberse a que cuando la cantidad de biocápsulas aumenta, también lo hacen la oxidación de glucosa a ácido glucónico, y como consecuencia, la acidificación del mosto, lo cual minimiza la oxidación del mismo cuando el pH es bajo (Paladino et al., 2008); o a la capacidad de las

biocápsulas para adsorber fenoles u otros compuestos oxidantes en su propia superficie.

Cuando se añadió la dosis menor de biocápsulas la variación de la intensidad de color resultante fue de 0,397 UA, valor que disminuyó hasta alcanzar los 0,335 UA para la dosis más alta de las mismas, mientras que cuando la dosis adicionada de GOX y CAT en estado libre fue menor, se obtuvo una variación de la intensidad de color de 0,254 UA, valor que disminuyó hasta alcanzar los 0,213 UA para la dosis más alta de las mismas, pudiéndose observar que la variación de la intensidad de color decreció en un factor de 0,8 en ambos casos.

Por otra parte, cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le añadieron biocápsulas fue menor, la variación de la intensidad de color resultante fue de 0,323 UA, valor que se incrementó hasta alcanzar los 0,392 UA para el valor más alto del mismo, pudiéndose observar que la variación de la intensidad de color aumentó en un factor de 1,2. Por otro lado, cuando el pH inicial del mosto al que posteriormente se le adicionaron GOX y CAT en estado libre fue menor, se obtuvo una variación de la intensidad de color de 0,192 UA, valor que se incrementó hasta alcanzar los 0,289 UA para el valor más alto del mismo, pudiéndose observar que la variación de la intensidad de color aumentó en un factor de 1,5.

La intensidad colorante del mosto aumentó con el uso del sistema enzimático GOX-CAT, probablemente como resultado de la oxidación de los fenoles a quinonas por acción de las polifenoloxidasas en presencia de O₂, las cuales se polimerizan más adelante para formar macromoléculas de un color que puede oscilar desde el amarillo hasta el marrón (Li et al., 2008). A su vez, la intensidad de color se incrementa cuando el pH del mosto es más elevado, lo cual acelera la oxidación enzimática de los fenoles (El Hosry et al., 2009).

En cuanto a la temperatura del mosto al que posteriormente se le añadieron biocápsulas, su tendencia tiene forma de parábola convexa, lo que significa que la variación de la intensidad de color disminuye a medida que la temperatura aumenta hasta alcanzar los 15°C aproximadamente, y por el contrario, aumenta a partir de esta misma temperatura. Cuando esta temperatura fue menor, se obtuvo una variación de la intensidad de color de 0,382 UA, valor que disminuyó y después se incrementó hasta alcanzar los 0,373 UA para el valor más alto de la misma, pudiéndose observar que el factor de crecimiento de la variación de la intensidad de color es 1,0. La temperatura condiciona el color del vino debido a que si es demasiado baja favorece la precipitación de los compuestos fenólicos, si es demasiado alta favorece el pardeamiento y la evolución del mismo (Marais, 1998), y si ronda los 15°C mejora tanto la composición fenólica como las características cromáticas del vino (Gómez-Plaza et al., 2000).

Por otro lado, cuando la temperatura del mosto al que posteriormente se le adicionaron GOX y CAT en estado libre fue menor, se obtuvo una variación de la intensidad de color de 0,276 UA, valor que disminuyó hasta alcanzar los 0,211 UA para el valor más alto de la misma, pudiéndose observar que la variación de la intensidad de color decreció en un factor de 0,8. Esto puede deberse a que cuando la temperatura aumenta, también lo hacen la oxidación de glucosa a ácido glucónico, y como consecuencia, la acidificación del mosto, lo cual minimiza la oxidación de los fenoles (Simó, 2021; Massalha et al., 2007).

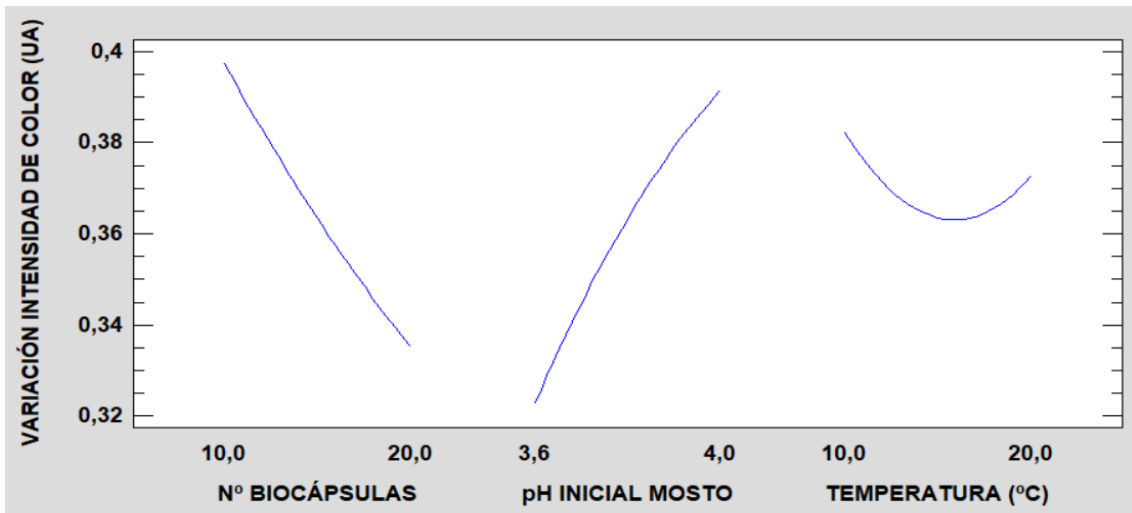


Figura 18: Gráfica de Efectos Principales para la variación de la intensidad de color por GOX y CAT en estado inmovilizado.

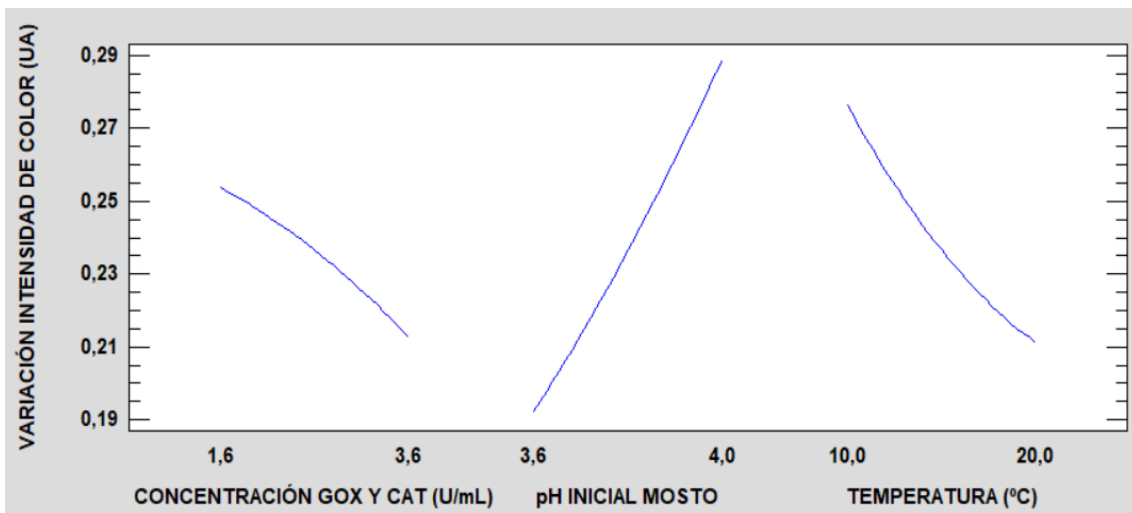


Figura 19: Gráfica de Efectos Principales para la variación de la intensidad de color por GOX y CAT en estado libre.

En la Figura 20 se puede ver como la variación de la intensidad de color por parte de GOX y CAT en estado libre es similar para ambas concentraciones de dichas enzimas cuando la temperatura es más elevada. Sin embargo, el sistema enzimático varía el color en mayor medida cuando la temperatura y la concentración de GOX y CAT son más bajas. Como se ha comentado anteriormente en las Figuras 10 y 15, la reacción enzimática de la GOX decrece a medida que la temperatura aumenta, lo cual se debe a la disminución de la solubilidad del O_2 (Pickering et al., 1998). Por esta razón, la GOX es capaz de degradar una cantidad significativa de la glucosa del mosto cuando la temperatura oscila entre 10 y 15°C, y como consecuencia, modificar la intensidad de color del mismo. Sin embargo, Vicente (2021) llegó a la conclusión de que una dosis de GOX de 10 U/mL de mosto permitió una notable reducción en la concentración de glucosa en el mismo, la cual incrementó la intensidad de color del vino.

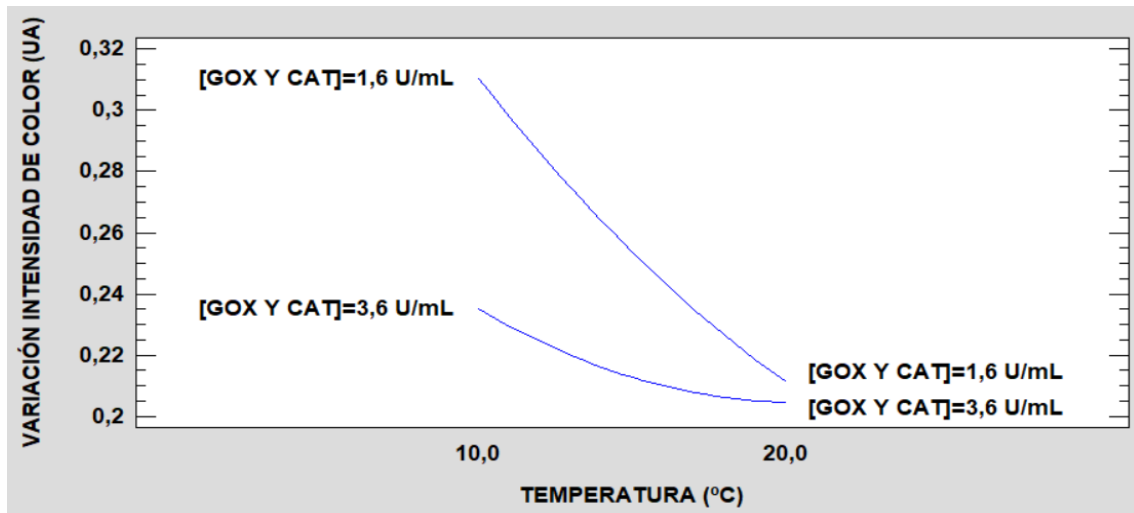


Figura 20: Gráfica de Interacción entre la temperatura y la concentración de GOX y CAT para la variación de la intensidad de color por el sistema enzimático en estado libre.

Cuando GOX y CAT se encuentran en estado inmovilizado, la variación máxima de la intensidad de color teórica que se puede llegar a alcanzar es de 0,292 UA si se añaden 20 biocápsulas, el pH inicial del mosto es 3,60 y la temperatura es de 15,2°C, mientras que cuando el sistema enzimático se encuentra en estado libre, la variación máxima de la intensidad de color teórica que se puede llegar a alcanzar es de 0,164 UA si se añaden 3,6 U/mL de enzimas, el pH inicial del mosto es 3,60 y la temperatura es de 20,0°C.

5. Conclusiones

- Una dosis mayor del sistema enzimático GOX-CAT tanto en estado inmovilizado como en estado libre ha supuesto el aumento del consumo de glucosa por parte de la enzima GOX.
- Una dosis mayor del sistema enzimático GOX-CAT en estado inmovilizado ha supuesto el aumento de la disminución del pH del mosto, mientras que una concentración superior de dichas enzimas en estado libre ha tenido el efecto contrario.
- La variación de la intensidad de color se ha minimizado cuanto mayor es la dosis del sistema enzimático GOX-CAT tanto en estado inmovilizado como en estado libre.
- Valores de pH inicial del mosto más elevados han permitido un mayor consumo de glucosa por parte de la enzima GOX tanto en estado inmovilizado como en estado libre, y como consecuencia, una mayor disminución del pH y una mayor variación de la intensidad de color en el mosto.
- El incremento de la temperatura no ha afectado al consumo de glucosa por parte del sistema enzimático GOX-CAT, pero si ha reducido la disminución del pH del mosto en estado libre.

6. Bibliografía

- Anocíbar, A. (9 de marzo de 2020). El cambio climático y su influencia. Agua y temperatura [Sesión de conferencia]. Conferencia de la Escola Agrària de Viticultura i Enologia Mercè Rossell i Domènech, Sant Sadurní d'Anoia, Barcelona, España. <https://www.vitivin.pro/contenido/el-cambio-climatico-y-su-influencia-agua-y-temperatura> (Recuperado el 10/03/2022).
- Arroyo, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars pharmaceutica*, 39(2), 23-39.
- Athès, V., Peña y Lillo, M., Bernard, C., Pérez-Correa, R., & Souchon, I. (2004). Comparison of experimental methods for measuring infinite dilution volatilities of aroma compounds in water/ethanol mixtures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 2021-2027.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase—an overview. *Biotechnology advances*, 27(4), 489-501.
- Biyela, B. N. E., Du Toit, W. J., Divol, B., Malherbe, D. F., & Van Rensburg, P. (2009). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10.000 BG-treated grape juice. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 124-131.
- Botezatu, A., Elizondo, C., Bajec, M., & Miller, R. (2021). Enzymatic management of pH in white wines. *Molecules*, 26(9), 2730.
- Costa, O. L. (2014). *Acidificación biológica de vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas* (Tesis doctoral, Universidad de Valencia). <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/37898/TESIS%20FINAL.pdf?sequence=1> (Recuperado el 10/03/2022).
- Del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023). Silica-Calcium-Alginate Hydrogels for the Co-Immobilization of Glucose Oxidase and Catalase to Reduce the Glucose in Grape Must. *Gels*, 9(4), 320.
- El Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., & Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2459-2463.
- Gil, P. L. O. (2010). *Efectos del deshojado precoz, durante cuatro años, sobre las características de la producción en las variedades Tempranillo, Mazuelo y Graciano (Vitis vinifera L.)* (Tesis doctoral, Universidad de La Rioja). <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=6hPdTWzhsJg%3D> (Recuperado el 11/03/2022).
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., & Martínez, A. (2000). Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 736-741.
- Hermosín Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4079-4083.

Simó Hernando, G. (2021). *Inmovilización de Oenococcus oeni en geles híbridos de sílice-alginato y su aplicación para la fermentación maloláctica de vinos tintos* (Tesis doctoral, Universidad de Valladolid).

<https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=2cPAP2Rqu84%3D> (Recuperado el 30/06/2022).

Heux, S., Sablayrolles, J. M., Cachon, R., & Dequin, S. (2006). Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5822-5828.

Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19(6), 596-607.

King, E. S., Dunn, R. L., & Heymann, H. (2013). The influence of alcohol on the sensory perception of red wines. *Food Quality and Preference*, 28(1), 235-243.

Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food chemistry*, 108(1), 1-13.

Loyola García, R., Gutiérrez-Gamboa, G., Medel-Marabolí, M., & Díaz-Gálvez, I. (2021). Lowering Wine Alcohol Content by Reverse Osmosis and Spinning Cone Columns: Effects on Sensory Characteristics of the Beverages. *IVES Technical Reviews Vine Wine*, 10, 5-6.

Marais, J. (1998). Effect of grape temperature, oxidation and skin contact on Sauvignon blanc juice and wine composition and wine quality. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 19(1), 10-16.

Martín, N. G. (2014). *Reducción de azúcar en mostos por nanofiltración para la obtención de vinos de menor grado alcohólico* (Tesis doctoral, Universidad de Valladolid).

<https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=8d5OWFGFkvI%3D> (Recuperado el 12/03/2022).

Martínez, 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. *Enoviticultura*, 42, 4-26.

Massalha, N., Basheer, S., & Sabbah, I. (2007). Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46(21), 6820-6824.

OIV-MA-AS2-07B: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos, (2022). Método determinación características cromáticas.

OIV-MA-AS313-15: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos, (2011). Método determinación pH.

Ottone, C., Romero, O., Aburto, C., Illanes, A., & Wilson, L. (2020). Biocatalysis in the winemaking industry: Challenges and opportunities for immobilized enzymes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 595-621.

Paladino, S., Nazralla, J., Vila, H., Genovart, J., Sánchez, M. L., & Maza, M. (2008). Oxidación de los vinos tintos: influencia del pH. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 40(2), 105-112.

Pascual, S. I. (2013). *Gestión del suelo en viñedo mediante cubiertas vegetales. Incidencia sobre el control del rendimiento y del vigor: Aspectos ecofisiológicos, nutricionales, microclimáticos y de calidad del mosto y del vino* (Tesis doctoral, Universidad de La Rioja). <http://hdl.handle.net/10261/149527> (Recuperado el 10/03/2022).

Piccardo, D., Zamora, F., & González-Neves, G. (2021). Desarrollo y evaluación de alternativas tecnológicas para reducir el contenido de alcohol y el pH de vinos tintos. *Memoria Investigaciones en Ingeniería*, (20), 24-33.

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.

Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999). 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, G. J. (2000). Low-and reduced-alcohol wine: a review. *Journal of Wine Research*, 11(2), 129-144.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2021). *Handbook of Enology, volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. John Wiley & Sons.

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.

Roquet-Jalmar, M. N. (2018). El canvi climàtic en el cultiu de la vinya. Efectes en la garnatxa negra. *Quaderns agraris*, (45), 71-90.

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.

Somers, T. C. (1975). In search of quality for red wines. *Food Technology in Australia*, 27, 49-56.

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.

Vejarano Mantilla, R. D. (2013). *Utilización de bloqueadores metabólicos y optimización de las condiciones de aplicación para la reducción del grado alcohólico en vinos*

elaborados a partir de uva procedente de zonas cálidas (Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Madrid).

https://oa.upm.es/22769/1/RICARDO_DAVID_VEJARANO_MANTILLA.pdf (Recuperado el 12/03/2022).

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

<https://uvadoc.uva.es/bitstream/handle/10324/49238/TFG-L2895.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (Recuperado el 01/03/2022).

Voget, C. E. (1985). *Producción de glucosa oxidasa* (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata).

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2533/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y (Recuperado el 08/03/2022).

Yushkova, E. D., Nazarova, E. A., Matyuhina, A. V., Noskova, A. O., Shavronskaya, D. O., Vinogradov, V. V., ... & Krivoshapkina, E. F. (2019). Application of immobilized enzymes in food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42), 11553-11567.