



---

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

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Grado en Enología**

Estrategias biotecnológicas para  
la reducción del grado alcohólico:  
empleo de *Schizosaccharomyces* spp.  
en la elaboración de vino Verdejo

Alumno/a: Alba Aguilar Rivera

Tutora: Violeta Ruipérez Prádanos

Junio de 2024



## Agradecimientos

Después de todos estos meses, tras este día por fin puedo decir que soy enóloga. Han sido unos años muy intensos envueltos en trabajo, COVID y unas cuantas botellas de vino, y por eso me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado durante esta etapa.

En primer lugar me gustaría agradecer a mi tutora Violeta Ruipérez Prádanos por haber confiado en mí para hacer este trabajo. Pese a las dificultades, siempre ha estado dispuesta a ayudarme y dedicarme su tiempo y conocimiento. Gracias.

Gracias a Miguel Ángel García Esteban por su ayuda y paciencia.

Gracias a todos los profesores que me han dado clase por regalarme su conocimiento y ser una fuente de inspiración.

Gracias a mis compañeros por el apoyo, las copas compartidas, por estar en las buenas y en las malas, por los que están y los que ya no. Brindo por vosotros allí donde estéis.

Por último, gracias a mi familia: a mis padres, a mis hermanos y a Bombón por apoyarme y estar siempre ahí para mí.

Gracias de corazón.

Alba Aguilar Rivera

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.    Enzimas .....	2
1.2.    Levaduras <i>Schizoaccharomyces</i> spp. ....	3
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1.    Microorganismos .....	6
3.1.1. Levaduras.....	6
3.1.2. Conservación, multiplicación, cuantificación de los microorganismos ....	6
3.2.    Medios de cultivo.....	7
3.2.1. Mosto Verdejo .....	7
3.2.2. Medio YPD .....	7
3.3.    Microvinificaciones .....	7
3.3.1. Tratamiento enzimático del mosto .....	7
3.3.2. Microvinificaciones con <i>Schizosaccharomyces</i> spp. en mosto tratado con GOX/CAT.....	8
3.3.3. Vinificación a escala de laboratorio con <i>S. pombe</i> seleccionada .....	8
3.3.4. Análisis fisicoquímicos.....	9
3.3.5. Análisis estadístico .....	10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	11
4.1.    Microvinificación con <i>Schizosaccharomyces</i> spp. en mosto tratado con GOX/CAT.....	11
4.1.1. Cinética fermentativa .....	12
4.1.2. Características fisicoquímicas de los vinos.....	13
4.2.    Vinificación a escala de laboratorio con <i>S. pombe</i> seleccionada .....	18
5. CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	22
6. BIBLIOGRAFÍA.....	23

## RESUMEN

Debido al cambio climático, en los últimos años se han observado cambios en la composición de la uva y un incremento en el contenido en azúcares y del pH, produciéndose vinos con mayor graduación alcohólica y con menor acidez.

Una estrategia biotecnológica prometedora para la reducción del contenido inicial de glucosa en los mostos es el empleo de las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT). Su uso permite disminuir el grado alcohólico final, sin embargo, durante este tratamiento se ha observado un incremento notable en el contenido de ácido glucónico. Por ello, la capacidad que poseen algunas cepas de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* para reducir la concentración de ácido glucónico es de gran interés enológico.

En el presente trabajo, se evalúa el uso de diferentes cepas de *Schizosaccharomyces* spp. en la fermentación de un mosto Verdejo tratado enzimáticamente con GOX/CAT. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de un tratamiento enzimático junto con el empleo de *Schizosaccharomyces* spp. puede ser eficaz para la reducción del contenido alcohólico final de los vinos.

**Palabras clave:** glucosa oxidasa, catalasa, reducción del grado alcohólico, ácido glucónico, *Schizosaccharomyces pombe*, Verdejo.

## ABSTRACT

Due to climate change, in recent years changes have been observed in the composition of the grapes and an increase in the sugar content and pH, producing wines with higher alcohol content and lower acidity.

A promising biotechnological strategy for reducing the initial glucose content in musts is the use of the enzymes glucose oxidase (GOX) and catalase (CAT). Its use allows the final alcoholic level to be reduced, however, during this treatment a notable increase in the gluconic acid content has been observed. Therefore, the ability of some strains of the *Schizosaccharomyces pombe* yeast to reduce the concentration of gluconic acid is of great oenological interest.

In the present work, the use of different strains of *Schizosaccharomyces* spp. in the fermentation of a Verdejo must treated enzymatically with GOX/CAT is evaluated. The results obtained suggest that the use of an enzymatic treatment together with the use of *Schizosaccharomyces* spp. can be effective in reducing the final alcoholic content of wines.

**Keywords:** glucose oxidase, catalase, alcoholic strength reduction, gluconic acid, *Schizosaccharomyces pombe*, Verdejo.

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos 50 años, el calentamiento global ha generado un aumento en la temperatura media de aproximadamente 1,5 °C. Como resultado de esto, se han producido alteraciones en los ciclos de maduración, sobre todo en la brotación y la vendimia, que se está adelantado casi un mes en zonas de clima cálido. Estas alteraciones se manifiestan también en la uva, provocando desequilibrios en su composición e influyendo en la calidad del vino final (Martínez et al., 2016; Jones et al., 2008).

La elevada concentración de azúcares en el mosto puede ejercer una fuerte presión osmótica sobre las levaduras, dificultando su metabolismo y suscitándolas a una mayor producción de etanol, pudiendo ralentizar la fermentación alcohólica e incluso detenerla por completo dado que el etanol es tóxico en altas concentraciones (Martínez et al., 2016). Por otro lado, la disminución de acidez lleva consigo un incremento del pH, provocando así una inestabilidad en la población microbológica del vino y una degradación de la calidad organoléptica del vino final. Todo ello deriva en un incremento del contenido alcohólico en los vinos finales, con repercusiones organolépticas y económicas (Mangas et al., 2023).

En consecuencia, el estudio para reducir el grado alcohólico es un foco de interés, por lo que se han desarrollado nuevas estrategias fisicoquímicas, tecnológicas y biológicas que pueden llevarse a cabo desde el viñedo hasta la bodega, en los procesos de antes, durante o después de la fermentación alcohólica. Entre las estrategias biotecnológicas se encuentra el uso de las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT), que consiste en un tratamiento prefermentativo para disminuir la concentración de glucosa en el mosto, produciendo vinos de alcohol reducido (Mangas et al., 2023).

### 1.1. Enzimas

La enzima GOX es una flavoproteína capaz de catalizar la oxidación de  $\beta$ -D-glucosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en presencia de oxígeno ( $O_2$ ). En el primer paso de la reacción,  $\beta$ -D-glucosa se oxida a  $\delta$ -glucono-1,5-lactona y se forma  $H_2O_2$ . En el segundo paso de la reacción  $\delta$ -glucono-1,5-lactona se hidroliza de forma espontánea a ácido D-glucónico. El cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD), coenzima común en reacciones metabólicas de oxidorreducción, hace que GOX funcione como un catalizador. Normalmente la reacción enzimática de GOX va acompañada de la de la catalasa (CAT), capaz de degradar el  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ , para que así GOX pueda usarlo en un nuevo ciclo (Röcker et al., 2016).

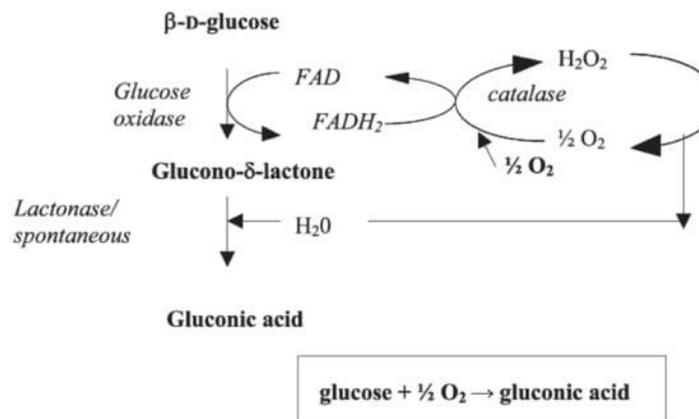


Figura 1. Oxidación de la glucosa por la glucosa oxidasa (Botezatu et al., 2021)

El ácido glucónico no es un ácido natural que se encuentra en las uvas o el vino, sino que puede ser causado por la infección de ciertos hongos como *Botrytis* o *Aspergillus*. La fruta infectada por hongos puede ser la mejor explicación para las trazas de ácido glucónico en los tratamientos de control y aireación (Valencia et al., 2017; Röcker et al., 2016).

La enzima GOX es de origen fúngico, y está sobre todo presente en los hongos del género *Penicillium* y *Aspergillus niger*, siendo este último la fuente principal de los preparados comerciales. Algunos de los factores que más influyen en su actividad son la temperatura y el pH. La temperatura óptima se encuentra en un rango de entre los 30 – 40 °C, y el pH entre 4,0 – 7,0, siendo su óptimo a 5,5 – 6,0. Uno de los factores limitantes es que el mosto tenga un pH bajo. Los niveles bajos de pH causados por el incremento de acidez debido al ácido glucónico afectan a las características sensoriales y al color de los vinos. Además de que debido a la oxidación de la glucosa se pueden producir pardeamientos en los mostos tratados, por lo que serán necesarias unas dosis de sulfuroso (SO<sub>2</sub>) mayores para proteger el vino (Röcker et al., 2016; Valencia et al., 2017; Mangas et al., 2023).

El ácido glucónico es el indicador de la calidad de las uvas que han sido atacadas por hongos y bacterias en el viñedo. Las altas concentraciones de ácido glucónico afectan a la estabilidad microbiológica y producen sabores desagradables en el vino. En definitiva, la producción de ácido glucónico al aplicar el tratamiento GOX/CAT al mosto es un problema, por eso, una alternativa para mejorar la efectividad del proceso enzimático con GOX/CAT es su uso junto con una inoculación de levaduras *Schizosaccharomyces* spp (Benito et al., 2018; Benito, 2019; Peinado et al., 2009).

## 1.2. Levaduras *Schizosaccharomyces* spp.

Las levaduras del género *Schizosaccharomyces* son levaduras de fisión binaria, es decir, se dividen tras la formación de una pared o tabique en el centro de la célula madre. Según la clasificación taxonómica, hay tres especies principales en este género: *S. pombe*, *S. japonicus* y *S. octosporus* (Benito, 2019).

En general, de forma tradicional las *Schizosaccharomyces* se han considerado levaduras de alteración debido a que su uso en vinificación ha resultado en vinos con sabores y olores desagradables debido a la producción de ácido acético en altas concentraciones, al acetaldehído, a la acetoína, al acetato de etilo o al ácido sulfhídrico. Otra de las limitaciones que presenta esta levadura actualmente es la poca cantidad de cepas comerciales disponibles que hay en el mercado de la industria vitivinícola, aunque se están estudiando para mejorar la calidad y la seguridad de los mostos y vinos (Benito et al., 2013; Benito et al., 2014; Benito et al., 2018).

Pese a estas limitaciones, su principal característica que la diferencia de otros géneros de levaduras es su capacidad para desacidificar el ácido málico al metabolizar este en etanol y CO<sub>2</sub>, haciendo innecesario el uso de bacterias lácticas como *Oenococcus oeni* para realizar la fermentación maloláctica, manteniendo así los aromas varietales. Esta característica es muy interesante para las regiones vitícolas frías, donde las uvas pueden tener un alto contenido de ácido málico (Benito et al., 2013; Mylona et al., 2016; Benito, 2019).

Otras características metabólicas que poseen estas levaduras es que son capaces de crecer en medios que contienen ácido glucónico como única fuente de carbono, posee actividad reductora de ureasa (principal precursor del carbamato de etilo, un compuesto tóxico en el vino), posee una mayor liberación autolítica de polisacáridos que

*Saccharomyces cerevisiae*, no presentan actividad  $\beta$ -glucosidasa, en sus estructuras celulares se encuentran polisacáridos únicos como la  $\alpha$ -galactomanosa y los glucanos  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3), y no asimila nitratos (Peinado et al., 2004; Peinado et al., 2005; Benito et al., 2019).

Actualmente pese a que *Schizosaccharomyces japonicus* empieza a mostrar resultados prometedores para la vinificación, la especie más común en la industria enológica es *Schizosaccharomyces pombe* ya que en los últimos años se ha empleado para la liberación de polisacáridos autolíticos en nuevas aplicaciones para el envejecimiento sobre lías, la reducción de ácido glucónico, la reducción de compuestos peligrosos para la salud humana como las aminas biógenas, la histamina o el carbamato de etilo, aumentando así la seguridad alimentaria, o la producción de ácido pirúvico relacionada con el color (Benito, 2019; S. Benito et al., 2014).

Por lo tanto, en el presente trabajo se evalúan y comparan los efectos del uso de *Schizosaccharomyces* spp. en un mosto tratado enzimáticamente con GOX y CAT.

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El grupo de investigación ENOBIOTEC perteneciente a la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIAA), en estudios previos, ha expuesto una bajada significativa de glucosa tras tratar un mosto de uva Verdejo con GOX/CAT, que lleva asociada un incremento en el contenido de ácido glucónico.

Por otro lado, estudios realizados por investigadores de la Universidad Politécnica de Madrid, con los que colabora el grupo de investigación de la ETSIAA, han permitido la selección de cepas de *Schizosaccharomyces* spp. con capacidad para consumir ácido glucónico en mosto sintético.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la capacidad de consumo de ácido glucónico de diferentes cepas de *Schizosaccharomyces* spp., en la fermentación alcohólica de un mosto Verdejo tratado previamente con las enzimas GOX y CAT para reducir el grado alcohólico del vino final.

Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación del comportamiento fermentativo de *Schizosaccharomyces* spp. en un mosto tratado con GOX/CAT.
- Evaluación de la capacidad de *Schizosaccharomyces* spp. para metabolizar ácido glucónico.
- Análisis de las características fisicoquímicas del vino elaborado con una cepa seleccionada de *Schizosaccharomyces pombe* en mostos sin y con tratamiento con GOX/CAT.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Microorganismos

##### 3.1.1. Levaduras

En este estudio se han empleado 17 cepas de *Schizosaccharomyces* spp, de las especies *S. pombe*, *S. octosporus* y *S. japonicus*, cedidas por investigadores del Dpto. Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid. Además, se utilizó WAM (Lallemand), una cepa comercial de *Saccharomyces cereviseae*, como control para la fermentación.

De las 17, 15 cepas fueron *Schizosaccharomyces pombe*, identificadas numéricamente de la 1 a la 15 respectivamente con el prefijo Sp antes del número (Sp 1, Sp 2, ..., Sp 15); una cepa de *Schizosaccharomyces octosporus*, designada como So; y por último una cepa de *Schizosaccharomyces japonicus* nombrada como Sj.

Tabla 1. Levaduras empleadas en la vinificación.

CÓDIGO	Cepa	Especie
So	CECT 1374	<i>S. octosporus</i>
Sp 1	CECT 1375	<i>S. pombe</i>
Sp 2	CECT 1376	<i>S. pombe</i>
Sp 3	CECT 1378	<i>S. pombe</i>
Sp 4	CECT 1379	<i>S. pombe</i>
Sp 5	CECT 1381	<i>S. pombe</i>
Sp 6	CECT 10685	<i>S. pombe</i>
Sp 7	CECT 10812	<i>S. pombe</i>
Sj	CECT 11183	<i>S. japonicus</i>
Sp 8	CECT 11197	<i>S. pombe</i>
Sp 9	CECT 12622	<i>S. pombe</i>
Sp 10	CECT 12776	<i>S. pombe</i>
Sp 11	CECT 12821	<i>S. pombe</i>
Sp 12	CECT 12918	<i>S. pombe</i>
Sp 13	V2	<i>S. pombe</i>
Sp 14	ATECREM 12H	<i>S. pombe</i>
Sp 15	UPM 936	<i>S. pombe</i>
WAM	Uvaferm WAM™	<i>Saccharomyces cereviseae</i>

##### 3.1.2. Conservación, multiplicación, cuantificación de los microorganismos

Para la correcta conservación de los microorganismos, estos se mantuvieron en tubos con medio YPD sólido (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glucosa y 15 g/L de agar) a 4°C (OIV, 2020).

Antes de la inoculación de las levaduras, se hizo una multiplicación en tubos de ensayo en condiciones de esterilidad con medio YPD líquido durante 48 horas a 25°C. Para determinar los microorganismos presentes en cada tubo de ensayo, se usó la técnica de turbidimetría, que se basa en la medición de la turbidez a 600 nm mediante un

espectrofotómetro de una serie de patrones de sulfato de bario (escala McFarland) que establece una relación entre la turbidez de éstos y la concentración de los microorganismos presentes en los cultivos. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

### 3.2. Medios de cultivo

#### 3.2.1. Mosto Verdejo

Para todos los ensayos que se llevan a cabo, se utiliza un mosto de uva Verdejo procedente de la D.O. Rueda. El mosto se ha mantenido congelado en las cámaras frigoríficas de la Universidad de Valladolid hasta su uso. Tras su descongelación, se analizó el pH y el grado probable, siguiendo los métodos de la OIV (OIV, 2020).

Analítica	Valores
pH	3,61
°Brix	22 °Brix
Grado probable	12,80 %vol

#### 3.2.2. Medio YPD

El medio YPD (Yeast extract-Peptone-Dextrose) líquido es un medio de cultivo que favorece el crecimiento de levaduras. Se utilizó en tubos de ensayo para la multiplicación de los microorganismos que posteriormente se inoculan en matraces para las vinificaciones.

Medio YPD (OIV/OENO 206/2010)

Extracto de levadura	10,0 g/L
Peptona	20,0 g/L
Glucosa	20,0 g/L

Antes de utilizar este medio se esteriliza durante 15 minutos a una temperatura de 121°C en el autoclave.

### 3.3. Microvinificaciones

#### 3.3.1. Tratamiento enzimático del mosto

El mosto Verdejo se dividió en matraces de 1 litro y se suplementó con Actimax Natura (Agrovin), a una dosis de 30 g/hL, como recomienda la casa comercial, antes de esterilizarlos a vapor fluyente en el autoclave.

Las enzimas glucosa oxidasa (GOX, EC 1.1.3.4, Gluzima® Mono 10.000 BG de *Aspergillus niger*, 10.000 U/g) y catalasa (CAT, EC 1.11.1.6, Catazima® 25 L de *Aspergillus niger*, 25.000 U/mL), fueron proporcionadas por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

Para el tratamiento enzimático con GOX/CAT se realizó el siguiente protocolo:

- i. Extracción de GOX en tampón citrato

El GOX comercial debido a su contenido de harina de trigo (Valencia et al., 2017), se prepara un extracto enzimático sin harinas disolviendo 0,75 g de stock de Gluzyme® Mono (10.000 U/g) en 25 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 6,5 ± 0,1 con agitación a 225

rpm (agitador orbital SO1, Stuart Scientific, Stone, Reino Unido) durante 30 minutos en la estufa a 25 °C. Luego la solución se lleva a centrifugar a 2320 x g durante 15 minutos (Sorvall ST 8R Centrífuga, Osterode am Harz, Alemania), se pasa el sobrenadante que se utilizará como fuente de GOX a un Falcon estéril de 50 mL, y se mantiene en refrigeración a 4 °C hasta su uso. En los casos en los que no es suficiente, es necesario hacer la extracción por duplicado y juntar los dos sobrenadantes en un único tubo. La concentración del extracto de GOX es de 300 U/mL. La CAT se toma directamente de la preparación enzimática comercial (preparado enzimático a 25.000 U/mL).

ii. Aplicación de las enzimas GOX/CAT al mosto Verdejo

El tratamiento se añade en el mosto Verdejo y se mantiene a 25°C durante 24 horas. Inicialmente, en el primer ensayo se trabaja sin agitación, y en ensayos posteriores el tratamiento se trabaja con agitación.

Se estima que 1 mol de glucosa da lugar a 1 mol de ácido glucónico. Para que la proporción final por litro de mosto GOX:CAT (1:1) se añaden 5.000 U/L de GOX y 5.000 U/L de CAT a los mostos que se tratan con ambas enzimas.

### 3.3.2. Microvinificaciones con *Schizosaccharomyces* spp. en mosto tratado con GOX/CAT

En estas microvinificaciones se quiere determinar el consumo de glucosa por la enzima GOX a las 24 horas de hacer el tratamiento, evaluar la cinética fermentativa de las diferentes cepas de levaduras y determinar el consumo de ácido glucónico de las cepas del estudio.

Inicialmente se realiza un ensayo donde se compara la capacidad fermentativa de un mosto tratado con GOX/CAT en un periodo de 24 horas a 25 °C sin agitación con un mosto fresco. A las 24 horas se hace la medición de pH y °Brix para comparar los resultados iniciales de los mismos análisis y comprobar la efectividad del tratamiento. Esta microvinificación inicial se hace con triplicados, habiendo un total de 6 matraces de 100 mL (previamente esterilizados) con 50 mL de mosto.

Debido a los resultados obtenidos se realiza un segundo ensayo siguiendo el mismo protocolo, pero esta vez con agitación. A las 24 horas de realizar el tratamiento se hace la medición de pH y °Brix para comparar con los resultados iniciales de los mismos análisis y comprobar la efectividad del tratamiento.

Cada ensayo se hizo por triplicado, teniendo un total de 54 matraces de 100 mL (previamente esterilizados), cada matraz con 50 mL de mosto. Luego se inocularon las cepas de levaduras a una concentración de  $10^6$  UFC/mL en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones y se cerró con válvulas Müller para conocer el desprendimiento de CO<sub>2</sub> durante la fermentación. Ese mismo día se hace la primera pesada de cada matraz y se llevan a la estufa a una temperatura de 21 °C para poder controlar la fermentación. El seguimiento se realizó mediante la pesada diaria de cada matraz.

Se consideró el fin de fermentación a los 21 días de la inoculación y se guardó una muestra de cada matraz en tubos Eppendorf y un Falcon a -20 °C para determinar la concentración de glucosa y ácido glucónico.

### 3.3.3. Vinificación a escala de laboratorio con *S. pombe* seleccionada

En esta vinificación se evalúa y compara un mosto con tratamiento enzimático frente a un mosto fresco o sin tratamiento. A su vez se compara cada uno de los mostos en función de la especie de levadura que se haya inoculado, WAM o Sp 3.

El mosto fue tratado enzimáticamente con GOX/CAT durante 24 horas a 25 °C con agitación, y el mosto sin tratar se mantuvo a una temperatura de 4 °C hasta la inoculación de las cepas. A las 24 horas se hace la medición de pH y de °Brix para comparar los resultados con los parámetros iniciales y comprobar la efectividad del tratamiento.

Cada ensayo se hizo por duplicado, teniendo un total de 8 matraces de 1 L (previamente esterilizados) y cada uno con 500 mL de mosto. Cada mosto se inoculó a una concentración de 10<sup>6</sup> UFC/mL en cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones, y se cerró con algodón y papel de aluminio.

Se considera el fin de la fermentación a los 14 días desde la inoculación de WAM y la cepa seleccionada. Para controlar la fermentación se mantienen los matraces en la estufa a 21 °C. Para el seguimiento de la fermentación se recogen muestras cada 24 horas los primeros tres días y luego 1 vez a la semana para poder hacer la determinación de glucosa y glucónico. A su vez, a la semana se hizo una medición del pH y se observan los mostos al microscopio.

En esta vinificación, debido a los resultados del ensayo anterior, se realiza una inactivación de las proteínas en las muestras tomadas previo a su conservación. La inactivación consiste en sumergir las muestras en agua hasta ebullición (100 °C) durante 15 minutos, e inmediatamente después llevarlas a 4 °C durante un periodo de 15 minutos. Después estas muestras se mantienen congeladas a una temperatura de -20 °C hasta la realización de los análisis.

#### **3.3.4. Análisis fisicoquímicos**

##### **- pH**

La determinación de pH se hace mediante el método potenciométrico. Se basa en la diferencia de potencial entre el electrodo de medida y el electrodo de referencia. Esta medida se tomó mediante un pH-metro (BASIC 20, CRISON) previamente calibrado.

##### **- Grado alcohólico probable**

El grado alcohólico probable se determina mediante el refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1). Este instrumento mide la concentración de azúcares de la muestra empleando el índice de refracción. Los resultados se expresan en °Brix.

##### **- Acidez total**

La determinación de acidez total se mide con un pH-metro (BASIC 20, CRISON), calibrado previamente antes de su uso. Se emplea el método potenciométrico, basado en llevar la muestra a pH 7 con una solución de NaOH 0,1 N (OIV, 2020). Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico.

##### **- Glucosa**

El análisis de glucosa se realiza en el espectrofotómetro Multiskan GO del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la ETSIIAA. Se mide la absorbancia de las muestras siguiendo protocolo descrito en el método enzimático de D-Fructose and D-Glucose (K-FRGLQR) de Megazyme (Megazyme Bray Co., Wicklow, Ireland). Los resultados se expresan en g/L de glucosa.

- **Ácido glucónico**

El análisis de ácido glucónico se realiza en el espectrofotómetro Multiskan GO del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la ETSIIAA. Se mide la absorbancia de las muestras siguiendo protocolo descrito en el método enzimático de D-Gluconic Acid/D-Glucono- $\delta$ -Lactone (K-GATE) de Megazyme. Los resultados se expresan en g/L de ácido glucónico.

- **Acidez volátil**

La acidez volátil se determina con el método de García Tena, basado en la separación del ácido acético del vino mediante una destilación simple y posterior valoración del destilado con una disolución de NaOH 0,01 N de factor conocido. Los resultados se expresan en g/L de ácido acético (García Barceló, 1990; OIV, 2020).

- **Grado alcohólico**

La determinación del grado alcohólico se hace mediante el método de ebulloimetría, basado en la diferencia existente entre los puntos de ebullición del agua (100 °C) y el alcohol (78,5 °C). Los resultados se expresan en grado alcohólico % vol (García Barceló, 1990; OIV, 2020).

**3.3.5. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se ha empleado el programa Statgraphics Centurion XIX, usando la herramienta de análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las varianzas de las diferentes muestras.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Microvinificación con *Schizosaccharomyces* spp. en mosto tratado con GOX/CAT

Se realizaron microvinificaciones para evaluar la cinética fermentativa y el consumo de glucónico de las diferentes cepas de *Schizosaccharomyces* spp, tras determinar el consumo de glucosa por la enzima GOX en un tiempo de 24 horas.

Inicialmente, el tratamiento enzimático se realiza sin agitación. En la tabla 2 se ven reflejados los resultados obtenidos en el mosto inicial y el tratado a las 24 horas. En el valor del pH se ve una reducción de 0,33 unidades y en el del grado alcohólico probable una reducción de 0,3 % (v/v) respecto al mosto inicial. Estos resultados indican que no se produce la reducción de azúcar deseada en las condiciones en las que se ha realizado el tratamiento enzimático. Esto puede deberse a que las condiciones del tratamiento fueron sin agitación, lo que puede reducir la disponibilidad de O<sub>2</sub> en el medio. Algunos autores en ensayos similares muestran que la agitación promueve la homogeneidad y una ligera oxigenación por lo que esto puede aumentar la absorción de ácido glucónico en cultivos que sí están agitados (Peinado et al., 2005).

Tabla 2. Análisis del mosto inicial y mosto tratado enzimáticamente con GOX/CAT a las 24 horas del tratamiento.

	Mosto inicial	Mosto a las 24 h del tratamiento
°Brix	22,0 °Brix	21,6 °Brix
Grado alcohólico probable	12,80 %vol	12,50 %vol
pH	3,61	3,28

Por lo tanto, se plantea una modificación en el tratamiento con GOX/CAT, realizando éste en condiciones de agitación para que la enzima tenga mejores rendimientos, y así se aumente el consumo de glucosa.

En condiciones de agitación, se observa una bajada de °Brix afectando de forma directa al grado alcohólico probable y a la cantidad de azúcares totales (tabla 3). Al estar en agitación, se observa como efectivamente se ha aumentado el consumo de glucosa y la efectividad de la GOX, reflejándose estos resultados a las 24 horas del tratamiento.

Tabla 3. Análisis del mosto inicial y mosto tratado con enzimas GOX/CAT tras 24 horas con agitación .

	Mosto inicial	Mosto a las 24 h del tratamiento
°Brix	21,0 °Brix	19,4 °Brix
Grado alcohólico probable	12,20 %vol	11,00 %vol
pH	3,43	3,29

Se determinó la concentración de glucosa y ácido glucónico mediante el kit enzimático, observando una disminución de la glucosa y un aumento del ácido glucónico (tabla 4). La determinación de glucosa en el mosto inicial es de  $134,8 \pm 11,0$  g/L reduciéndose a  $126,7 \pm 13,0$  g/L de glucosa en la determinación del mosto tratado durante un periodo de 24 horas, una reducción de 8,1 g/L nos indica que GOX/CAT si puede haber sido

efectiva ya que en este caso es una disminución de glucosa importante. Si se observa por otro lado la producción de ácido glucónico, esta crece de  $1,1 \pm 3,0$  g/L del mosto inicial hasta  $13,4 \pm 0,50$  g/L del mosto tratado a las 24 horas. La producción de casi 10 g/L confirma que el tratamiento ha sido efectivo.

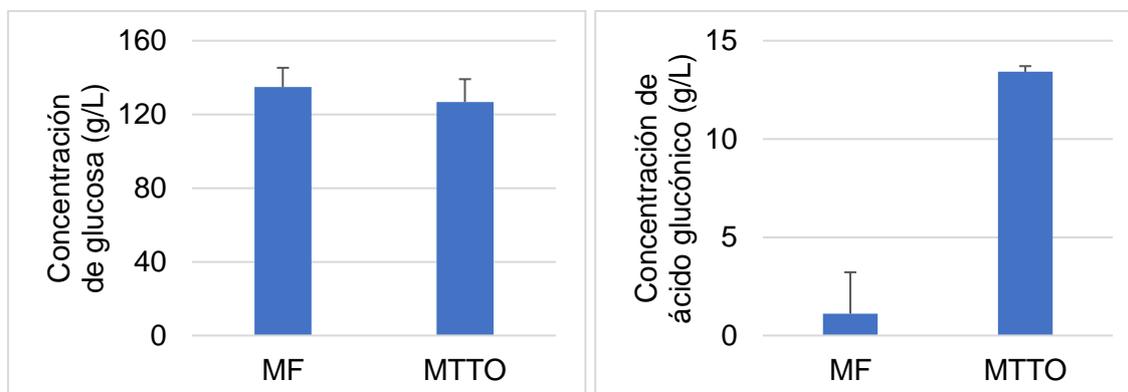


Figura 2. Determinación de glucosa y de ácido glucónico (g/L) de un mosto fresco (MF) y un mosto tratado enzimáticamente con GOX/CAT en agitación durante 24 horas (MTTO).

#### 4.1.1. Cinética fermentativa

Según Suarez Lepe et al. (2004), la cinética fermentativa controla la velocidad de metabolización de azúcares con respecto al tiempo, permitiendo el seguimiento de la misma para evitar desviaciones en su curso. En la selecciones de cepas se investigan aquellas que tienen un arranque rápido de la fermentación para garantizar la estabilidad de las uvas e imposibilitando los ataques bacterianos y oxidaciones, sin explosiones calóricas para garantizar una cinética progresiva sin elevaciones bruscas de temperatura y sin problemas de acabado para garantizar que finaliza la fermentación sin que en el vino presente azúcares residuales. Por ello, se compara la rapidez en el arranque de la fermentación, la curva que presente y la finalización de la fermentación. La cinética fermentativa de las levaduras se muestra en la figura 3.

Las cepas con arranque de fermentación más rápido son Sp1, Sp 7, Sp 12 y Sp 14, empezando a fermentar al cuarto día desde la inoculación. De estas cepas, Sp 1 y Sp 12 y Sp 14 mantienen el ritmo durante todo el proceso fermentativo finalizando este de forma rápida y con una curva regular. Sp 7 pese a su rápido arranque, luego tiene una curva irregular pero alcanza niveles similares a las anteriores.

Por el contrario, la cepa Sj es la última cepa en iniciar la fermentación, comenzando el día 7 desde su inoculación, pero a su vez presenta una curva regular y finaliza rápidamente.

Las cepas Sp 2, Sp 3, Sp 6, Sp 9, Sp 10, Sp 11 y Sp 15, son cepas con una cinética fermentativa similar a WAM, presentan un arranque y un final rápido y correcto, con una curva de cinética regular.

Comentar que se parte de que WAM es una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* con muy buenas características fermentativas ya que provoca un arranque de la fermentación rápido y posee una cinética fermentativa rápida y regular (Ruiz, 2018; Franch, 2018). Con lo cual, llama la atención que en este caso tarde 4 días en inicial la fermentación. Esto puede deberse a la presencia de ácido glucónico o la disminución del pH provocado por el tratamiento enzimático realizado de forma previa a la fermentación. La concentración de ácido glucónico puede ralentizar su comportamiento fermentativo haciendo que le lleve más tiempo comenzar la fermentación alcohólica.

Por otro lado, Sp 4, Sp 5, Sp 7, Sp 8 y So arrancan rápido la fermentación y la finalizan de forma correcta, pero presentan una forma de curva irregular. Las cepas que presentan cinéticas fermentativas irregulares no se consideran recomendables para la elaboración de vino a una escala real.

Por último destacar a Sp 11, que presenta un arranque rápido pero tiene una curva irregular que refleja que la fermentación se produce lentamente sin alcanzar las pérdidas de CO<sub>2</sub> a unos niveles como el resto de las cepas, siendo estas pérdidas de 40 g/L (figura 3). Esto puede deberse a un error en el procedimiento experimental de los matraces pese a que se hicieron pruebas por triplicado y los tres reflejan resultados similares, o a que sea una cepa que no es capaz de terminar la fermentación alcohólica ella sola. Varios autores han recomendado el uso de *Schizosaccharomyces* en coinoculación con *Saccharomyces* ya que las cepas de estudio no fueron capaces de fermentar el mosto sin la coinoculación o inoculación secuencial de *Saccharomyces* (Benito et al., 2013).

En resumen, las fermentaciones concluyen entre los 10 y 14 días siendo la primera So seguida de las cepas Sp 1, Sp 2, Sp 6, Sp 10 y Sp 12, y entre los 14 y los 17-20 días para las demás siendo las primeras en este rango WAM, Sp 3 y Sp 9.

#### **4.1.2. Características fisicoquímicas de los vinos**

La determinación de glucosa al finalizar la fermentación indica que las levaduras han sido capaces de producir vinos secos con una concentración de glucosa final inferior a 2,0 g/L (tabla 4), y un contenido de alcohol de aproximadamente 8,50 % (v/v) (figura 4).

Estos valores no son los esperados por lo que hace posible que la actividad enzimática de GOX de forma incontrolada permita que esta continúe transformando la glucosa, por lo que sería recomendable inactivar la enzima o retirarla tras el tratamiento.

Destacar que aunque Sp 11 no muestra finalización de la fermentación en la curva de cinética fermentativa, los datos de glucosa sugieren terminada la fermentación, conteniendo menos de 2,0 g/L (tabla 4) de glucosa, y una producción de alcohol de aproximadamente  $4,50 \pm 0,60$  % (v/v) (figura 4). La incoherencia entre los datos de cinética y glucosa puede deberse a un error experimental, posiblemente en la determinación del contenido de glucosa, y por ello no se consideran fiables los datos obtenidos para esta cepa de levadura.

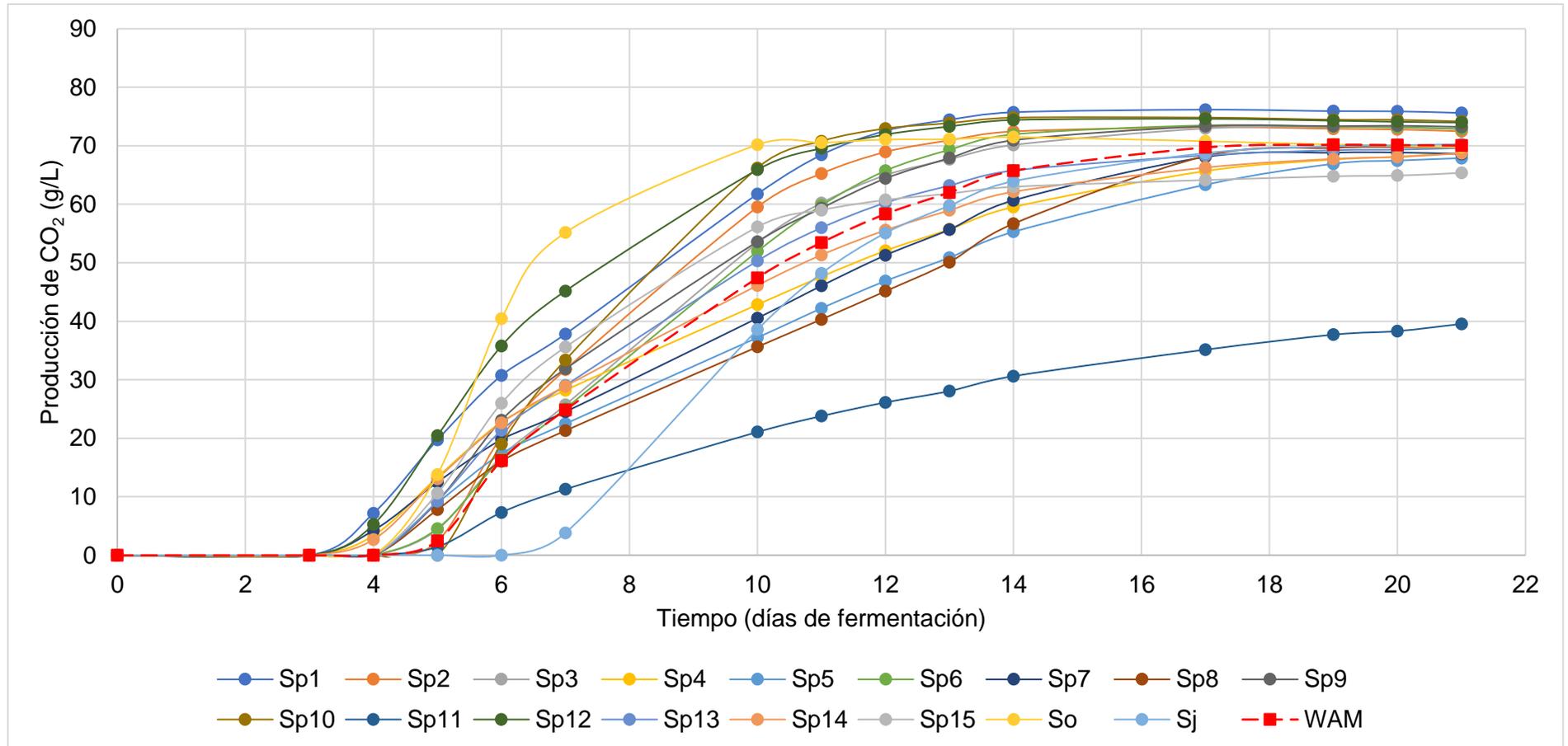


Figura 3. Producción de CO<sub>2</sub> (g/L) durante el proceso de fermentación alcohólica de 17 cepas de *Schizosaccharomyces* spp.

Tabla 4. Determinación de glucosa (g/L), de un mosto tratado con GOX/CAT de las muestras inoculadas con *Schizosaccharomyces* spp., tras realizar el proceso de fermentación alcohólica.

Muestras	Concentración de glucosa (g/L)
Sp 1	0,6 ± 0,5 <sup>ab</sup>
Sp 2	0,4 ± 0,7 <sup>ab</sup>
Sp 3	1,8 ± 0,7 <sup>b</sup>
Sp 4	0,9 ± 1,0 <sup>ab</sup>
Sp 5	1,8 ± 0,1 <sup>b</sup>
Sp 6	0,7 ± 0,9 <sup>ab</sup>
Sp 7	1,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>
Sp 8	0,9 ± 0,9 <sup>ab</sup>
Sp 9	0,6 ± 0,7 <sup>ab</sup>
Sp 10	1,1 ± 1,1 <sup>ab</sup>
Sp 11	1,6 ± 1,2 <sup>b</sup>
Sp 12	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Sp 13	0,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
Sp 14	0,9 ± 1,8 <sup>ab</sup>
Sp 15	1,0 ± 1,8 <sup>ab</sup>
So	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>
Sj	0,0 ± 0,2 <sup>a</sup>
WAM	0,0 ± 0,0 <sup>a</sup>

Respecto al grado alcohólico, debido a la incoherencia de resultados en la glucosa final y el grado alcohólico de la cepa Sp 11, se decide sacarla de la estadística ya que los resultados obtenidos no pueden considerarse fiables. Entre las cepas restantes se aprecian diferencias significativas entre ellas a un nivel de confianza del 95 %. Se observa la existencia de dos grupos de significancia, "a" y "b", donde Sp 15, perteneciente al grupo "a", es la única diferente de forma significativa a Sp 2, Sp 6, Sp 3, Sp 9, Sp 12, Sp 10 y Sp 1, pertenecientes al grupo "b" y siendo estas las cepas que mayor grado alcohólico alcanzan. Las demás cepas pertenecientes al grupo "ab" no presentan diferencias significativas entre ellas ni entre las anteriores.

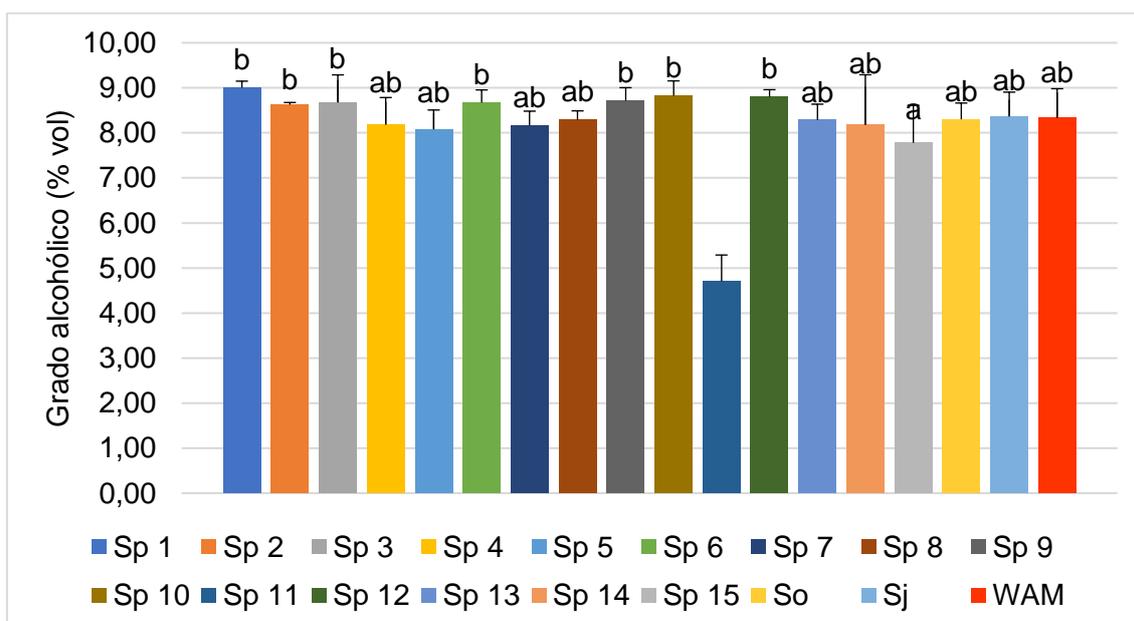


Figura 4. Determinación del grado alcohólico (% vol) de un vino tratado enzimáticamente e inoculado con cepas de *Schizosaccharomyces* spp.

La determinación del contenido de ácido glucónico consumido por las cepas de *Schizosaccharomyces* spp., representados en la figura 5, muestra que todas las cepas de *Schizosaccharomyces* consumen ácido glucónico, mientras que WAM presenta unos niveles superiores respecto a la determinación del ácido glucónico a las 24 horas del tratamiento del mosto. Este incremento es de 5,0 g/L y va de  $13,4 \pm 0,3$  a  $18,9 \pm 6,0$  g/L de ácido glucónico. Este resultado refuerza la hipótesis planteada anteriormente de que la enzima puede seguir actuando ya que está libre en el medio y no tiene impedimentos para seguir produciendo ácido glucónico, pero no se puede descartar un error experimental en la determinación de glucónico, estableciendo un intervalo entre 25,0 y 13,0 g/L de ácido glucónico, ya que las levaduras *Saccharomyces* no son capaces de metabolizar dicho ácido (Suarez Lepe et al., 2004).

Respecto a las demás cepas de *Schizosaccharomyces*, Sp 1, Sp 2, Sp 3, Sp 5, Sp 6, Sp 10, Sp 11, Sp 12, Sp 15 y So han consumido más del 50 % del ácido glucónico, siendo Sp 1, Sp 12 y Sp 3 las cepas que más, con un consumo del 80 %, 76 % y 68 % del ácido glucónico respectivamente.

Por el contrario Sp 4, Sp 7, Sp 9, Sp 13, Sp 14 y Sj son las cepas que consumen entre el 30 % y el 50 %. Y por último destacar Sp 8 por consumir un 1 % del ácido respecto al mosto tratado, por eso no se observan diferencias significativas entre ambas muestras.

Además, si este consumo en vez de referenciarlo al mosto tratado se compara respecto a la cepa WAM, el consumo de glucónico por parte de las cepas de *Schizosaccharomyces* spp. es incluso mayor.

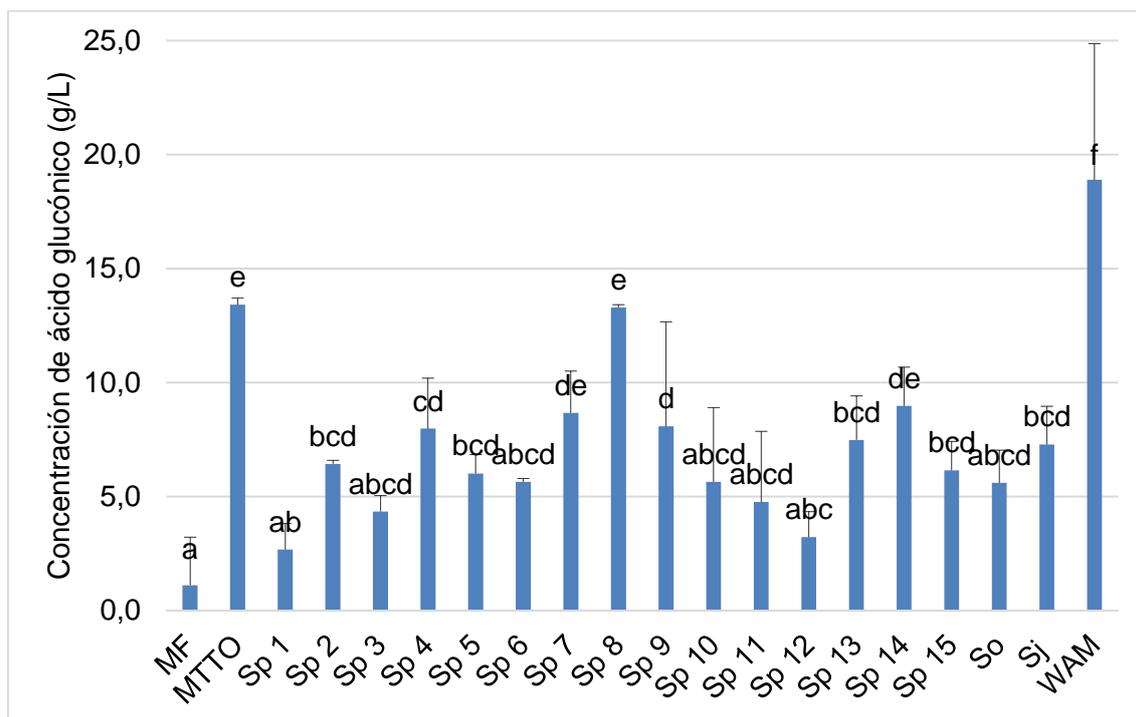


Figura 5. Determinación de ácido glucónico expresado en g/L de un vino que ha sido tratado con GOX/CA e inoculado con cepas de *Schizosaccharomyces* spp.

Respecto al pH, se parte de un mosto con un valor de pH de 3,43 que tras hacer el tratamiento y pasado un periodo de 24 horas se queda con un valor de 3,29 (tabla 3), y al finalizar la fermentación alcohólica se obtienen los resultados de pH que se muestran en la figura 6 y en la tabla 5.

Por un lado, destacar aquellas cepas que han alcanzado valores de pH superiores al mosto inicial sin tratar que son Sp 1, Sp 10 y Sp 12. Estos resultados son coherentes teniendo en cuenta los valores obtenidos en la determinación de ácido glucónico (figura 5), pero hay que ser precavidos, ya que un pH más alto facilita una tasa de oxidación más rápida y es inductor de un mayor deterioro microbiano (Peinado et al., 2004).

Por el contrario, aquellas que han terminado la fermentación alcohólica con valores inferiores a 3,29 son Sp 11, So, Sj y WAM, cepas que presentaron una cinética fermentativa más lenta (figura 3).

Las demás cepas de *Schizosaccharomyces pombe* se encuentran en un rango de valores entre 3,30 y 3,40, valores superiores respecto al pH del mosto tratado, por lo tanto *Schizosaccharomyces pombe* ha acidificado el mosto comparado con el valor de pH del mosto inicial sin tratar.

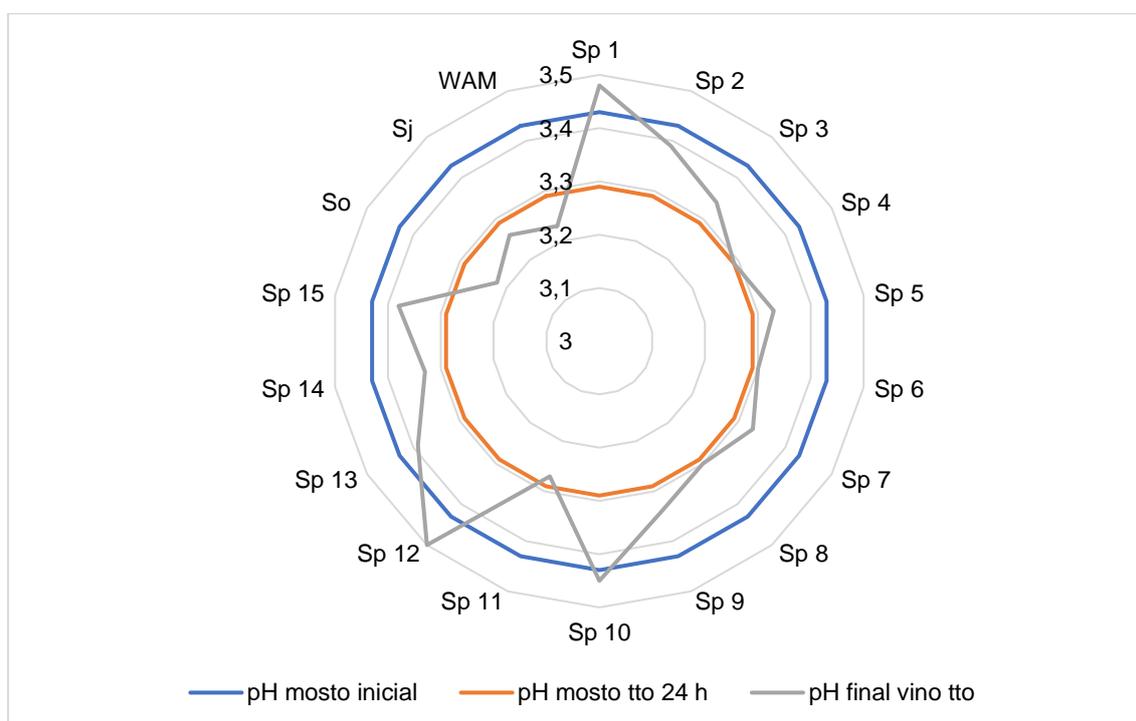


Figura 6. Comparación del pH final de los vinos procedentes de mostos tratados frente al pH del mosto fresco inicial y el pH del mosto tratado con GOX/CAT en agitación durante 24 horas.

En la realización del análisis de varianza unidireccional (ANOVA), en la tabla 5 se muestran las diferencias existentes entre los valores de pH obtenidos de las cepas del estudio (figura 6). Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95 % entre las cepas, habiendo 9 nueve grupos homogéneos desde la "A" hasta la "I".

Tabla 5. Tabla de medias para pH por muestras con intervalos de confianza del 95,0% y prueba de múltiples rangos.

Muestras	Casos	Media	Error Est. (s agrupada)	Límite Inferior	Límite Superior	Grupos Homogéneos
So	3	3,21667	0,0117923	3,1997	3,2336	A
WAM	2	3,225	0,0144425	3,2042	3,2458	AB
Sj	3	3,25667	0,0117923	3,2397	3,2736	BC

Sp 11	3	3,26667	0,0117923	3,2497	3,2836	CD
Sp 4	3	3,28667	0,0117923	3,2697	3,3036	CD
Sp 6	3	3,29667	0,0117923	3,2797	3,3136	DE
Sp 8	3	3,3	0,0117923	3,2830	3,3170	DE
Sp 5	2	3,325	0,0144425	3,3042	3,3458	EF
Sp 14	3	3,32667	0,0117923	3,3097	3,3436	EF
Sp 7	2	3,33	0,0144425	3,3092	3,3508	EF
Sp 3	3	3,34	0,0117923	3,3230	3,3570	F
Sp 9	3	3,34	0,0117923	3,3230	3,3570	F
Sp 15	3	3,38	0,0117923	3,3630	3,3970	G
Sp 2	3	3,39	0,0117923	3,3730	3,4070	G
Sp 13	3	3,39333	0,0117923	3,3764	3,4103	G
Sp 10	3	3,44667	0,0117923	3,4297	3,4636	H
Sp 1	3	3,47667	0,0117923	3,4597	3,4936	HI
Sp 12	3	3,50333	0,0117923	3,4864	3,5203	I
Total	51	3,34157				

#### 4.2. Vinificación a escala de laboratorio con *S. pombe* seleccionada

Para esta vinificación, se seleccionó una cepa de *Schizosaccharomyces pombe* de las estudiadas con anterioridad para llevar a cabo vinificaciones en volúmenes más elevados con el objetivo de evaluar y comparar el proceso de vinificación en relación a la cepa WAM (*Saccharomyces cerevisiae*).

Unos estudios previos realizados por el grupo de investigación de la Universidad Politécnica de Madrid en mostos sintéticos señalaron a la cepa Sp 3 como una de las más efectivas para el consumo de ácido glucónico.

Los datos obtenidos en el ensayo anterior se muestran en figura 7, representando las diferencias entre Sp 3 y WAM en la cinética fermentativa. Ambas cepas tienen una cinética de fermentación muy similar.

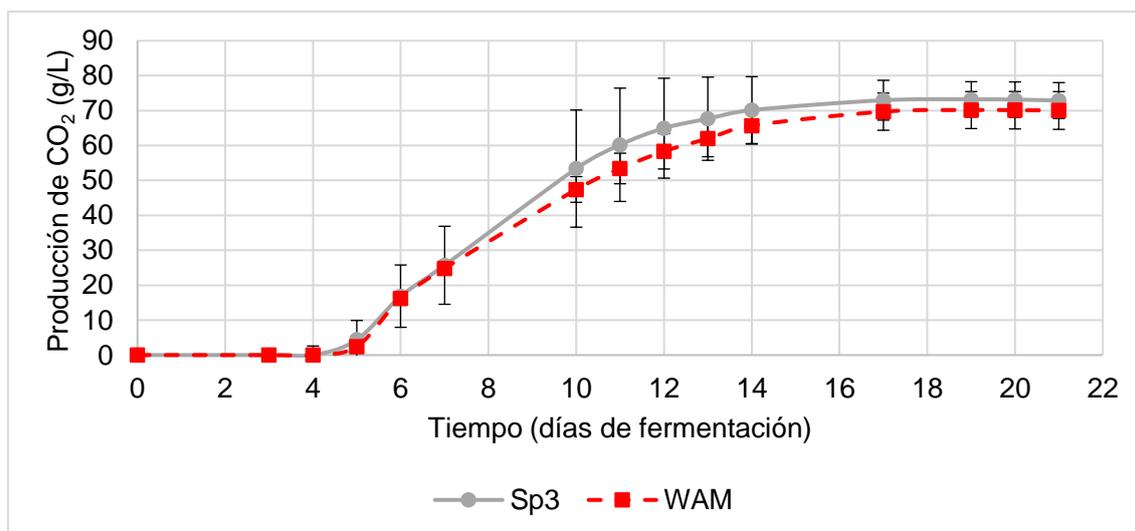


Figura 7. Comparación de la cinética de fermentación alcohólica de Sp 3 y WAM.

También se observa la capacidad de consumo de ácido glucónico que posee la cepa seleccionada. De un valor de  $13,4 \pm 0,3$  g/L que presentaba el mosto tratado después de 24 horas de tratamiento, se obtienen un valor de  $4,4 \pm 0,7$  g/L en la determinación de

ácido glucónico al finalizar la fermentación para Sp 3. Hay una reducción de 9,0 g/L de ácido glucónico, lo que equivale a una reducción del 32% del ácido glucónico presente al inicio de la fermentación. En estudios previos realizados por Peinado et al. (2005), una cepa de *Schizosaccharomyces pombe* tras una fermentación de una duración de 20 días fue capaz de metabolizar 2,1 g de ácido glucónico (el 42% de la cantidad total añadida).

Si se compara este consumo de Sp 3 respecto a la producción de ácido glucónico que presenta WAM, al finalizar la fermentación se observa que WAM tiene un valor de  $18,9 \pm 6,0$  g/L de ácido glucónico. Entre Sp 3 y WAM hay una diferencia de 14,5 g/L de ácido glucónico. Además, esta reducción de ácido glucónico de Sp 3 y WAM respecto a la determinación del mosto tratado a las 24 horas, se ve reflejado en los valores de pH de ambos, obteniendo unos valores de 3,34 y 3,23 respectivamente (figura 7).

Una vez elegida la cepa a inocular en esta vinificación, la cepa Sp 3, se hace un análisis de los parámetros iniciales del mosto. También se determina la glucosa y el ácido glucónico para comprobar el efecto del tratamiento en el mosto. Todos los análisis se realizan a las 24 horas de hacer el tratamiento enzimático.

En la tabla 6 se observa como el tratamiento con GOX/CAT acidifica el medio afectando al pH y a la acidez total. El pH disminuye de  $3,46 \pm 0,20$  del mosto fresco a  $3,11 \pm 0,02$  del mosto tratado y la acidez total aumenta de 4,3 a 6,8 g/L de ácido tartárico, debido a un aumento del ácido glucónico. Resultados similares han sido descritos previamente por Botezatu et al., (2023) en ensayos donde el tratamiento con GOX/CAT se investigó como método eficaz para reducir el pH en el mosto de uva, aumentando la acidez y disminuyendo la glucosa y el alcohol potencial. En sus resultados redujo el pH del mosto de 4,60 a 4,00 y de 4,60 a 3,80.

Tabla 6. Análisis iniciales en el mosto fresco y el mosto tratado con GOX/CAT a las 24 horas con agitación.

	Mosto fresco	Mosto tratado
pH	$3,46 \pm 0,20$	$3,11 \pm 0,02$
Acidez Total	4,3 g/L	6,8 g/L
Glucosa	$135,9 \pm 0,0$ g/L	$129,2 \pm 0,1$ g/L
Ácido glucónico	$0,0 \pm 0,0$ g/L	$10,3 \pm 0,0$ g/L

A los 7 días desde la inoculación se hace un análisis visual del color de los mostos, se observan las muestras al microscopio y se analiza el pH de todas las muestras por duplicado para ver el efecto de la enzima.

Tabla 7. Análisis del pH en los mostos inoculados con *Schizosaccharomyces pombe* y WAM en mosto tratado enzimáticamente y en un mosto sin tratar.

	WAM	Sp 3	T - WAM	T - Sp 3
pH	$3,31 \pm 0,01$ <sup>c</sup>	$3,18 \pm 0,03$ <sup>b</sup>	$2,99 \pm 0,02$ <sup>a</sup>	$2,97 \pm 0,02$ <sup>a</sup>

En la figura 8 se observa la diferencia de color entre las muestras, y al llevarlas al microscopio la diferencia es más evidente ya que los matraces que estaban tratados enzimáticamente con GOX/CAT no indicaban que hubiese crecimiento microbiano. Esto puede deberse a la caída de pH del mosto tras el tratamiento que se observa en la tabla 7, donde además se muestra que hay una diferencia significativa a un nivel de confianza del 95 % entre los mostos tratados y los mostos sin tratar. Algunos autores encontraron

que un pH bajo en el mosto puede ser un factor limitante en la capacidad catalítica de la enzima GOX (Ruiz et al., 2018). Pese a llegar a estas conclusiones, se decide continuar con la vinificación como estaba previsto.



Figura 8. Muestras de mosto-vino del día 7 desde la inoculación.

En el día 21 desde la inoculación de las cepas, en los matraces que contenían los mostos tratados enzimáticamente se observa la aparición de moho. Los datos de glucosa tras su determinación confirman que ninguno de los mostos tratados ha sido capaz de realizar la fermentación obteniéndose para ellos valores entre 100,0 y 135,0 g/L de glucosa.



Figura 9. Matraz de mosto con moho.

Por todo ello, se procede a caracterizar mediante el análisis de los parámetros fisicoquímicos los vinos elaborados a partir de mostos sin tratamiento enzimático para ver las diferencias entre *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* y comparar los resultados de las vinificaciones.

En los resultados obtenidos en la determinación de glucosa (figura 10) se observa como los mostos que no fueron sometidos al tratamiento enzimático sí han sido capaces de terminar la fermentación con éxito, siendo WAM más rápida que Sp 3. WAM es capaz de terminar la fermentación a los 7 días mientras que Sp 3 lo hace a los 14 desde la inoculación de ambas.

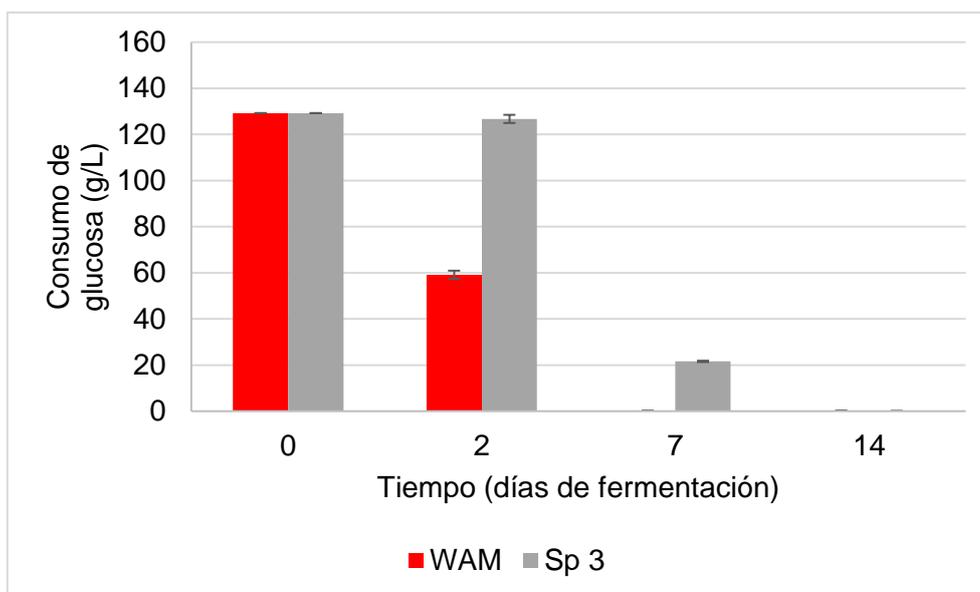


Figura 10. Consumo de glucosa durante la elaboración de vino Verdejo.

Por último, en la tabla 8 se muestra como Sp 3 es capaz de reducir la acidez volátil con diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95 % en comparación con la cepa WAM de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros autores en ensayos similares han descrito previamente que las levaduras de *Schizosaccharomyces pombe* no eran recomendables para la elaboración de vino ya que la concentración de ácido acético igual o superiores a 1 g/L no son compatibles con los vinos de alta calidad (Benito et al., 2012; Benito et al., 2014; Benito et al., 2018; Benito, 2019); mientras que otros han llegado a resultados similares al presentado en este trabajo, una disminución de la acidez volátil (Peinado et al., 2004).

Tabla 8. Resultados de los análisis fisicoquímicos de mostos fermentados con WAM o Sp 3. Las muestras se midieron por duplicado.

	pH	Acidez Total (g/L)	Grado Alcohólico (% vol)	Acidez Volátil (g/L)
Sp 3	3,45 ± 0,02 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	12,60 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,01 <sup>a</sup>
WAM	3,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	13,35 ± 0,80 <sup>a</sup>	0,43 ± 0,03 <sup>b</sup>

## 5. CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Las cepas de *Schizosaccharomyces* spp. estudiadas son capaces de llevar a cabo la fermentación alcohólica y finalizarla.
- Las cepas de *Schizosaccharomyces* spp. demostraron su capacidad para reducir el ácido glucónico de un mosto con alta concentración de dicho ácido.
- La mayoría de las cepas del estudio fueron capaces de acidificar los mostos respecto al mosto inicial, haciendo estas cepas interesantes para combatir el cambio climático.
- Es necesario un mecanismo de control para la actividad de la enzima libre, ya que es una limitación para la vinificación al no poder controlarse.
- La cepa Sp 3 presenta características enológicas de interés: una cinética fermentativa similar a *Saccharomyces cerevisiae*, un alto consumo de ácido glucónico, y bajos niveles de acidez volátil, que hacen que esta cepa de *Schizosaccharomyces pombe* se postule como una buena candidata para trabajar con ella a mayor escala.

El uso combinado de las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT), junto con el empleo de cepas de *Schizosaccharomyces* spp., es una estrategia biotecnológica prometedora para disminuir el grado alcohólico final en vinos Verdejo.

Sería interesante continuar investigando para optimizar el proceso y evaluar el impacto en diferentes variedades de uva y condiciones de fermentación. También se sugiere el uso de la encapsulación de la enzima ya que puede ser una herramienta para solucionar la limitación que supone para la vinificación.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2018). *Schizosaccharomyces pombe* biotechnological applications in winemaking. *Methods in Molecular Biology*, 1721, 217-226. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4_19)
- Benito, S., Palomero, F., Calderón, F., Palmero, D., & Suárez-Lepe, J. A. (2014). Selection of appropriate *Schizosaccharomyces* strains for winemaking. *Food Microbiology*, 42, 218-224. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.014>
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., Palmero, D., & Suárez-Lepe, J. A. (2013). Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines. *European Food Research and Technology*, 236(1), 29-36. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1836-2>
- Benito, Santiago. (2019). The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4291-4312. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09827-7>
- Benito, Santiago, Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., & Suárez-Lepe, J. A. (2012). New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(10), 2101-2108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03076.x>
- Benito, Santiago, Ruiz, J., Belda, I., Kiene, F., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Santos, A., & Rauhut, D. (2019). *Application of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production BT - Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application* (A. Sibirny (ed.); pp. 75-89). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_3)
- Botezatu, A., Elizondo, C., Bajec, M., & Miller, R. (2021). Enzymatic Management of pH in White Wines. *Molecules*, 26(9). <https://doi.org/10.3390/molecules26092730>
- Botezatu, A., Essary, A., & Bajec, M. (2023). Glucose Oxidase in Conjunction with Catalase – An Effective System of Wine pH Management in Red Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 74(1), 1-9. <https://doi.org/10.5344/ajev.2022.22001c>
- García Barceló, J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. En *Técnicas analíticas para vinos* (1ª Edición). GAB Sistemática Analítica S.L.
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2008.03.005>
- Mangas, R., González, M. R., Martín, P., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023). Impact of glucose oxidase treatment in high sugar and pH musts on volatile composition of white wines. *Lwt*, 184(March). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114975>
- 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. En *Enoviticultura* (Número 42, pp. 4-26).
- Mylona, A. E., Del Fresno, J. M., Palomero, F., Loira, I., Bañuelos, M. A., Morata, A., Calderón, F., Benito, S., & Suárez-Lepe, J. A. (2016). Use of *Schizosaccharomyces* strains for wine fermentation-Effect on the wine composition and food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.023>

- OIV. (2020). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis; International Organisation of Vine and Wine: Paris, France, 2020; ISBN 978-2-85038-016-7
- Peinado, R. A., Maestre, O., Mauricio, J. C., & Moreno, J. J. (2009). Use of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant to reduce the content in gluconic acid of must obtained from rotten grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2368-2377. <https://doi.org/10.1021/jf803479r>
- Peinado, R. A., Moreno, J. J., Medina, M., & Mauricio, J. C. (2005). Potential Application of a Glucose-Transport-Deficient Mutant of capacidad del mutante YGS-5 *Schizosaccharomyces pombe* for Removing Gluconic Acid from Grape Must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1017–1021.
- Peinado, R. A., Moreno, J. J., Maestre, O., Ortega, J. M., Medina, M., & Mauricio, J. C. (2004). Gluconic Acid Consumption in Wines by *Schizosaccharomyces pombe* and Its Effect on the Concentrations of Major Volatile Compounds and Polyols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 493-497. <https://doi.org/10.1021/jf035030a>
- Röcker, J., Schmitt, M., Pasch, L., Ebert, K., & Grossmann, M. (2016). The use of glucose oxidase and catalase for the enzymatic reduction of the potential ethanol content in wine. *Food Chemistry*, 210, 660-670. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.093>
- Ruiz, E., Busto, M. D., Ramos-Gómez, S., Palacios, D., Pilar-Izquierdo, M. C., & Ortega, N. (2018). Encapsulation of glucose oxidase in alginate hollow beads to reduce the fermentable sugars in simulated musts. *Food Bioscience*, 24(June), 67-72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.004>
- Suarez Lepe, J. A., Morata, A., & Gonzalez, C. (2004). Mejora de la cinética fermentativa en la vinificación en tinto levaduras resistentes a estres fermentativo. *Tecnología del Vino*, January.
- 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>