



---

**Universidad de Valladolid**

**MÁSTER EN CALIDAD, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE  
ALIMENTOS**

CURSO 2024/25

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**OPTIMIZACIÓN DE LA COINMOVILIZACIÓN DE GLUCOSA  
OXIDASA Y CATALASA EN GELES DE ALGINATO-SÍLICE PARA  
REDUCIR EL GRADO ALCOHÓLICO EN VINO BLANCO**

**Realizado por:**

**Ana de la Iglesia Granado**

Tutores:

José Manuel Rodríguez Nogales

Violeta Ruipérez Prádanos

**Septiembre 2025**

## ÍNDICE:

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....	7
OBJETIVOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS .....	8
Coinmovilización de la glucosa oxidasa y catalasa.....	8
Análisis fisicoquímico del mosto y del vino .....	10
Estudio de las paradas fermentativas.....	11
Análisis estadístico.....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	13
Análisis fisicoquímico del mosto .....	14
Microvinificaciones con Sp3 y WAM en mosto tratado con GOX:CAT .....	15
Análisis fisicoquímico del vino.....	16
Estudio de las paradas fermentativas .....	18
CONCLUSIONES .....	22
BIBLIOGRAFÍA.....	23

## RESUMEN

El cambio climático está afectando significativamente a la viticultura, provocando un adelanto en la maduración de la uva, mayor concentración de azúcares y una reducción de la acidez. Esto da lugar a vinos con mayor grado alcohólico, desequilibrio sensorial y mayor riesgo de paradas fermentativas. Como alternativa biotecnológica, se propone el uso de la glucosa oxidasa (GOX) como tratamiento prefermentativo para reducir el contenido de azúcares fermentables en el mosto. Sin embargo, su uso conlleva la generación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) el cual es perjudicial para la viabilidad de las levaduras fermentativas y para la calidad del vino. Para mitigar estos efectos, se ha estudiado la coinmovilización de GOX con catalasa (CAT) en geles de alginato-sílice, permitiendo descomponer el  $H_2O_2$  generado. En este trabajo se evaluaron diferentes concentraciones de GOX:CAT inmovilizadas para analizar su impacto en la reducción del grado alcohólico y las características fisicoquímicas de los mostos y vinos elaborados.

Los resultados indican que una correcta proporción GOX:CAT permite reducir el grado alcohólico del vino sin comprometer la fermentación ni alterar su composición fisicoquímica, teniendo gran importancia el uso complementario de la catalasa para evitar paradas fermentativas y acumulación de  $H_2O_2$ .

Palabras clave: glucosa oxidasa, catalasa, agua oxigenada, coinmovilización, glucosa, fermentación, levaduras, grado alcohólico, ácido glucónico.

## ABSTRACT

Climate change is significantly affecting viticulture, leading to earlier grape ripening, higher sugar concentration and reduced acidity. This results in wines with higher alcohol content, sensory imbalance and increased risk of stuck fermentations. As a biotechnological alternative, the use of glucose oxidase (GOX) is proposed as a prefermentative treatment to reduce the fermentable sugars content in the must. However, its use leads to the generation of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which is detrimental to the viability of fermentative yeasts and wine quality.

To mitigate these effects, the coimmobilization of GOX with catalase (CAT) in alginate-silica gels has been studied, allowing the  $H_2O_2$  generated to be broken down. In this work, different concentrations of immobilized GOX:CAT were evaluated to analyze their impact on reducing alcoholic degree and the physicochemical characteristics of the musts and wines produced.

These results indicate that a correct GOX:CAT ratio allows reducing the alcohol content of the wine without compromising fermentation or altering its physicochemical composition, with the complementary use of catalase being of great importance to avoid fermentation stoppages and  $H_2O_2$  accumulation.

Keywords: GOX, CAT,  $H_2O_2$ , coimmobilization, fermentation, yeasts, alcohol content, gluconic acid.

## INTRODUCCIÓN

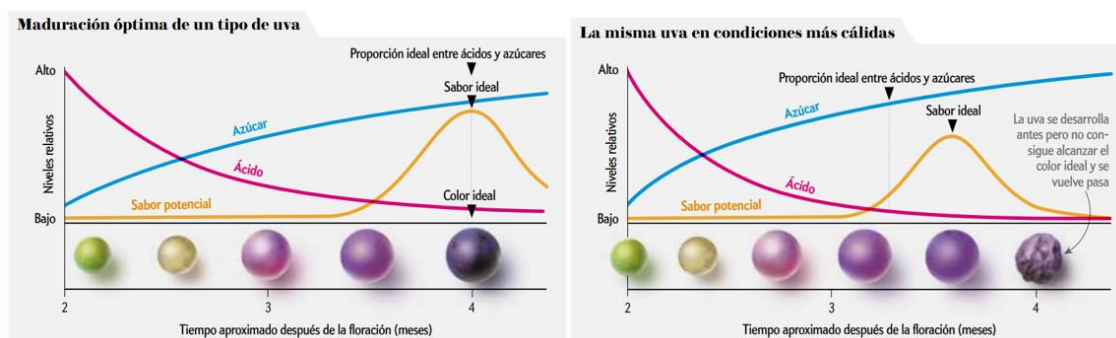
### 1. IMPACTO DEL CAMBIO CLIMÁTICO EN LA COMPOSICIÓN DE LA UVA Y EN LA VINIFICACIÓN

El cambio climático es un problema que presenta gran impacto en cultivos como la vid. Las fuertes lluvias o granizadas, olas de calor frecuentes y temperaturas de frío extremo, están afectando considerablemente a la fisiología de la vid y por consiguiente a las uvas, cambiando sus características y afectando así a su microbiota y a las propiedades finales de los vinos (Jones et al., 2022).

El calentamiento global ha provocado un incremento de la temperatura media en torno a 1,5 °C, observándose que, por cada °C de calentamiento, se adelanta entre 5 a 10 días los diversos estados fenológicos de la vid. La superficie foliar de la vid puede verse modificada por este problema en varios aspectos: acortamiento del periodo de desarrollo vegetativo; adelanto en la parada del crecimiento vegetativo, especialmente entre el cuajado y el envero; disminución de la superficie foliar total; riesgo de degradación de los pigmentos fotosintéticos por el exceso de la temperatura; variaciones en la fotosíntesis; más déficit hídrico; y envejecimiento anticipado de las uvas (Yuste, 2017). Por consiguiente, la maduración y la calidad de la uva también se ven afectadas por el cambio climático. Como se puede ver en la Imagen 1, se produce un adelanto en la madurez tecnológica provocando que se necesiten unas cosechas mucho más tempranas, cuando aún no se han alcanzado la madurez fenólica y aromática (Nicholas, 2015, Yuste, 2017).

Durante este proceso se acumulan los azúcares fermentables (glucosa y fructosa), que no solo aumentan el grado alcohólico del vino, sino que también pueden dificultar el inicio de la fermentación alcohólica debido a que los transportadores proteicos de las levaduras se saturan y el estrés osmótico aumenta, lo que favorece la aparición de metabolitos secundarios indeseados en la fermentación (Martínez et al., 2016; Catelen, 2022).

Además, se produce una reducción significativa de la acidez total en la uva, principalmente por la degradación del ácido málico durante la maduración. En paralelo, también se produce un aumento del pH del mosto por el incremento de los niveles de potasio (Martínez et al., 2016; Yuste, 2017).



**Imagen 1.** Diferencias en la maduración óptima de las uvas frente a la maduración en condiciones más cálidas (Nicholas, 2015).

El pH elevado y el aumento del grado alcohólico en los vinos pueden generar problemas sensoriales o relacionados con la conservación. Respecto al color, un pH más elevado favorece la conversión de los antocianos hacia formas incoloras, reduciendo su intensidad (Martínez et al., 2016; Dangles & Fenger, 2018). Elevadas temperaturas pueden generar que la cantidad de taninos se reduzca, disminuyendo así la astringencia o el amargor y alterando la percepción del dulzor, dando lugar a vinos desequilibrados. Los aromas afrutados tienden a disminuir, mientras que los relativos a los defectos aromáticos pueden intensificarse en el vino (King et al., 2013; Nicholas, 2015; Martínez et al., 2016; Cretin et al., 2018). Por otro lado, el aumento de la temperatura acelera las reacciones biológicas y metabólicas en el mosto, lo que favorece la proliferación de microorganismos no deseados y aumenta el riesgo de alteraciones microbiológicas. Esto, a su vez, puede interferir en la fermentación alcohólica, generando condiciones inestables que incrementan la probabilidad de paradas fermentativas (Martínez et al., 2016).

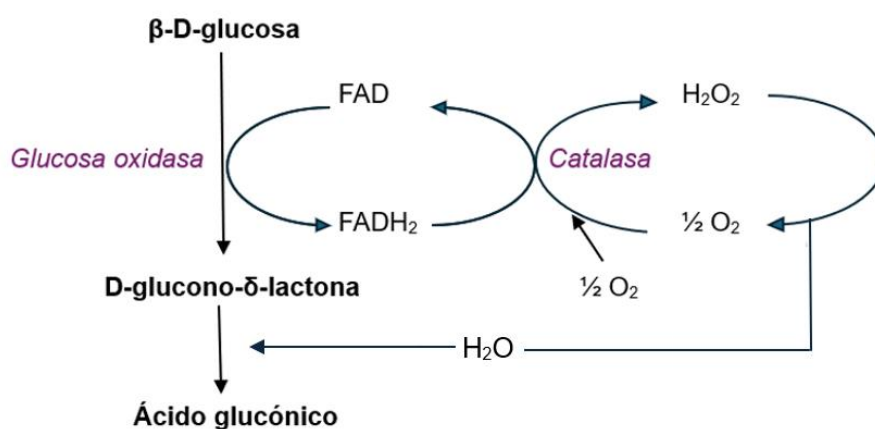
También, hay que tener en cuenta las implicaciones legales que pueden presentar este tipo de vinos. En muchos países, un mayor grado alcohólico implica un incremento en los impuestos aplicables al vino, afectando así a la competitividad y rentabilidad del producto final (Martínez et al., 2016).

## 2. ESTRATEGIA BIOTECNOLÓGICA PARA REDUCIR EL GRADO ALCOHÓLICO EN VINOS

Para moderar el grado alcohólico en estos vinos, se han propuesto diversas estrategias que varían en coste y complejidad técnica, que abarcan desde cambios en la gestión de la viticultura hasta modificaciones en los procesos enológicos (Antonio, 2013; Barceló, 2017).

Una de las estrategias biotecnológicas estudiadas para reducir el contenido alcohólico en los vinos consiste en el uso de la enzima glucosa oxidasa (GOX) como tratamiento prefermentativo, con el objetivo de reducir el contenido de azúcares fermentables en el mosto. No obstante, esta reducción de azúcares es menor a la esperada debido a que la GOX presenta unos intervalos óptimos de actividad a temperatura entre 30 y 40 °C y pH entre 5 y 6. Por tanto, el bajo pH del mosto, junto las temperaturas relativamente bajas durante su procesado representan un factor limitante para la aplicación efectiva de esta enzima (Botezatu et al., 2021).

La GOX es una flavoproteína de origen fúngico, principalmente producida por *Aspergillus niger*. Esta enzima es capaz de oxidar la  $\beta$ -D-glucosa en D-glucono- $\delta$ -lactona y  $H_2O_2$ , siendo el  $O_2$  el aceptor final de electrones (Imagen 2). La D-glucono- $\delta$ -lactona se hidroliza a ácido glucónico y el cofactor flavina adenina nucleótido (FAD) se reduce a  $FADH_2$ , pero posteriormente, cuando entra el  $O_2$ , el  $FADH_2$  se reconvierte en FAD de nuevo. Junto con esta enzima se emplea la enzima catalasa (CAT) descomponiendo el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ , permitiendo la reutilización del  $O_2$  por la GOX en un nuevo ciclo (Mangas et al., 2023).



**Imagen 2.** Reacción de oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa (adaptado de Botezatu et al., 2019).

Es importante eliminar el  $H_2O_2$  ya que uno de los principales inconvenientes del uso de GOX en enología es la generación de  $H_2O_2$  como subproducto de la oxidación de la glucosa. El  $H_2O_2$  es una molécula con propiedades oxidantes que puede producir efectos adversos tanto en la calidad del mosto como en la viabilidad de las levaduras fermentativas. Por un lado, disminuye la intensidad de color y estabilidad fenólica debido a reacciones no enzimáticas y favorece la degradación de ésteres frutales y compuestos

volátiles aromáticos reduciendo la frescura del mosto (Mangas et al., 2023; Del-Bosque et al., 2023a, 2023b).

Por otro lado, concentraciones altas de  $H_2O_2$  pueden ser tóxicas para las levaduras, ya que causan estrés oxidativo, dañando estructuras celulares, proteínas y el ADN. Esto puede derivar en fermentaciones incompletas o lentas, con presencia de azúcares residuales (Zhao et al., 2025). Además, tiene un efecto negativo sobre la GOX ya que inhibe su capacidad enzimática, lo que conlleva un menor consumo de glucosa (Ojeda, 2011).

En este contexto, la coinmovilización de GOX y CAT en soportes poliméricos se presenta como una alternativa prometedora para mejorar su estabilidad y eficacia en condiciones enológicas (Del-Bosque et al., 2023a, 2023b). La coinmovilización de estas enzimas puede llevarse a cabo empleando alginato de sodio, un polímero de bajo costo, fácil manejo y elevada biocompatibilidad. Este polímero, formado por residuos del ácido  $\beta$ -D-manurónico y  $\alpha$ -L-gulurónico, en presencia de cationes divalentes como el  $Ca^{2+}$  forma un gel poroso que permite atrapar eficazmente enzimas en su interior. Además, la incorporación de derivados de sílice en la matriz de coinmovilización permite mejorar la estabilidad del gel de alginato de calcio (Del-Bosque et al., 2023a). Estos autores han estudiado la coinmovilización de las enzimas GOX y CAT en geles de alginato-sílice con el objetivo de optimizar su actividad en condiciones enológicas. Los resultados muestran velocidades de reacción más rápidas y una mayor estabilidad en comparación con su forma libre. Por otro lado, han demostrado que esta matriz tiene la capacidad para retener hasta un 75 % del ácido glucónico generado por la acción de la GOX, lo que contribuye a minimizar el impacto sensorial y la acidificación excesiva del mosto (Del Bosque et al., 2023b).

Diversos estudios han abordado el estudio de la relación de las enzimas GOX y CAT en estado libre para su aplicación enológica. Valencia et al. (2017) comprobaron que la presencia de CAT en mosto tinto tratado con GOX, en comparación de un control sin CAT, mejoró la conversión de la glucosa y redujo la oxidación del mosto, probablemente al descomponer el  $H_2O_2$  y reciclar el  $O_2$ . Mangas et al., (2023) y Röcker et al., (2016), estudiaron el efecto de la relación GOX:CAT aplicado a los mostos. Mangas et al., (2023) comprobaron que la aplicación de GOX y CAT a mostos con pH alto produce vinos más equilibrados, con menos alcohol y más acidez en comparación con el vino control. Röcker et al., (2016) también verificaron que al aplicar GOX y CAT descendió el contenido de alcohol y, además, que la acumulación de  $H_2O_2$  sin suficiente CAT inactiva GOX produciendo unos vinos con una acidez alta debido al exceso de ácido glucónico.



Fuera del ámbito enológico la relación GOX:CAT también se ha estudiado. Por ejemplo, Grigoras (2019) revisó diversas estrategias de inmovilización de CAT para preservar su actividad frente a la acumulación de  $H_2O_2$ , mientras que Ojeda (2011), obtuvo extractos de GOX y CAT que actuaban como aditivos para conservar alimentos al eliminar la glucosa y neutralizar el  $H_2O_2$  generado.

En conjunto estas investigaciones subrayan la importancia de ajustar y optimizar la proporción GOX:CAT, ya que una relación adecuada mejora la eficiencia del sistema enzimático y minimiza los efectos no deseados garantizando un mejor control del tratamiento enzimático.

## JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La aplicación enológica de la GOX inmovilizada ha mostrado ser una estrategia efectiva como tratamiento para disminuir el contenido de azúcares en el mosto y así obtener vinos blancos con un menor grado alcohólico. Sin embargo, su aplicación genera  $H_2O_2$  el cual puede afectar a la actividad de la GOX y comprometer la viabilidad de las levaduras durante la fermentación.

Para mitigar este problema, se utiliza la enzima CAT, que cataliza la descomposición del  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ . Sin embargo, hasta la fecha no se ha explorado el estudio de la proporción óptima de GOX:CAT cuando ambas enzimas se coinmovilizan en geles de alginato-sílice, con el fin de maximizar la eficacia del proceso.

## OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la relación GOX:CAT inmovilizadas en geles de alginato-sílice en el mosto, como estrategia para reducir el grado alcohólico en vino blanco.
- Analizar las características fisicoquímicas del vino elaborado a partir del mosto tratado enzimáticamente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Coinmovilización de la glucosa oxidasa y catalasa

#### MOSTO

El mosto empleado en los diferentes ensayos procede de la variedad Verdejo de la Denominación de Origen Rueda (D.O. Rueda). Su composición fisicoquímica inicial viene representada en la Tabla 1, expresada como media  $\pm$  desviación típica, a partir de los resultados obtenidos en tres repeticiones para cada parámetro analizado.

**Tabla 1.** Caracterización del mosto

Grados Brix (°Bx)		19,8 $\pm$ 0,0
Grado alcohólico probable (%v/v)		11,3 $\pm$ 0,0
pH		3,85 $\pm$ 0,01
Acidez total (g/L)		2,68 $\pm$ 0,02
Ácido glucónico (g/L)		nd.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)		nd.
IPT		8,43 $\pm$ 0,23
Color	L*	83,1 $\pm$ 0,08
	a*	0,28 $\pm$ 0,02
	b*	21,2 $\pm$ 0,15

nd.: no detectado

#### ENZIMAS

El extracto de GOX se preparó mezclando 0,54 g de Gluzyme Mono 10.000 BG (Novozyme®, Dinamarca) en 18 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 6,5. Tras la agitación a 225 rpm durante 30 minutos, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos (Sorvall ST 8R Centrífuga, Osterode am Harz, Alemania). El sobrenadante con GOX se llevó a un Falcon estéril conservándolo a 4 °C hasta su uso. La enzima CAT se utilizó directamente del preparado comercial Catazyme 25 L (Novozyme®, Dinamarca).

#### PREPARACIÓN DE LA MATRIZ ALGINATO-SÍLICE

La coinmovilización se realizó mediante el método de la red polimérica interpenetrada (IPNM) utilizando derivados de sílice (silicato de sodio y silicato coloidal (LUDOX HS40), alginato de sodio y CaCl<sub>2</sub> (Del-Bosque et al., 2023a).

La solución de silicato se preparó mezclando 4,43 g de silicato de sodio coloidal 6,13 M con 18,30 mL de agua desionizada (ajustada el pH a 6,57) y 0,294 mL de silicato de

sodio. Se ajustó el pH a 6,57 con HCl 1 M y se calentó hasta 40 °C permaneciendo en agitación a 700 rpm.

Por otro lado, se añadió 30 mL del agua desionizada, se calentó hasta 40 °C y se incorporó 0,9 g de alginato de sodio con agitación controlada. Cuando la mezcla estuvo bien disuelta, se añadió la anterior solución de silicatos.

Posteriormente, se incorporaron en el mosto 6 mL de la solución de GOX y diferentes concentraciones de CAT en diferentes matraces por duplicado (Tabla 2), llegando a un volumen final de 60 mL.

**Tabla 2.** Concentraciones de GOX y CAT aplicadas.

GOX:CAT	GOX (U/mL gel)	CAT (U/mL gel)
1:0	10	-
1:1	10	10
1:2	10	20
1:5	10	50

Finalmente, la mezcla se extruyó a través de una bomba peristáltica a un flujo de 13,6 mL/min (BQ80S, Lead Fluid, China) sobre una disolución de 1,5 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,2 M a 20 cm de altura para crear la forma de la esfera (Imagen 4). A continuación, se dejó durante 1 hora en agitación con un agitador orbital SO1 (Stuart scientific, Stone, Staffordshire, Inglaterra) para favorecer la gelificación y el endurecimiento de las esferas que permanecieron a 8 °C hasta el día siguiente.



**Imagen 4.** Formación de las esferas sobre  $\text{CaCl}_2$

### TRATAMIENTO ENZIMÁTICO DE LOS MOSTOS

Se aplicaron los distintos tipos de cápsulas con distintas concentraciones de GOX:CAT (Tabla 2) y un control sin enzimas, por duplicado, en 25 mL de mosto Verdejo en

matraces de 100 mL de capacidad durante 48 horas a 15 °C. Las cápsulas de GOX:CAT se añadieron en una proporción del 6 % (p/v) respecto al volumen de mosto.

### MICROVINIFICACIONES

Las microvinificaciones se realizaron mediante inoculación secuencial de una cepa de *Schizosaccharomyces pombe* (Sp3), cedida por el Dr. Benito de la Universidad Politécnica de Madrid y una levadura *Saccharomyces cerevisiae* comercial Uvaferm WAM™ (Lallemand, España).

La cuantificación de la concentración de levaduras se determinó por turbidimetría en un espectrofotómetro (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, Spain) utilizando como curva patrón la escala McFarland. Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonia por mL (UFC/mL).

Para evaluar el efecto del tratamiento enzimático sobre la composición del vino, se realizaron microvinificaciones de 25 mL mosto de uva Verdejo previamente tratado con las perlas de GOX:CAT inmovilizadas con las diferentes proporciones de enzimas (Tabla 2). Además, se realizó una vinificación control sin tratamiento enzimático.

La fermentación alcohólica secuencial se realizó por duplicado. Para ello, se inoculó Sp3 a una concentración de  $10^6$  UCF/mL y transcurridas 72 horas se inoculó WAM a la misma concentración.

Los matraces permanecieron a 21 °C hasta el fin de la fermentación alcohólica que se comprobó evaluando la cantidad de azúcares reductores residuales.

### Análisis fisicoquímico del mosto y del vino

En mosto, se determinaron los grados Brix (OENO 377/2009) (refractómetro ATC-1, Atago, Japón), el pH (OENO 438-2011) (pH-metro BASIC 20, Crison), la acidez total (OENO 551-2015), el índice de polifenoles totales (IPT) (Zamora, 2003), los parámetros de color (OENO 377/2009) (OIV, 2020) y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (kit Quantofix peroxide 100, Macherey-Nagel, Alemania). Por otra parte, en vinos, se analizó el grado alcohólico, el pH, la acidez total y volátil, los IPT y los parámetros del color.

La acidez total se realizó mediante potenciometría y los resultados se expresan en g/L ácido tartárico. La acidez volátil se determinó por el método de García Tena (GAB, 1990),

basado en una separación del ácido acético con una destilación directa y parcial. Los resultados se expresan en g/L ácido acético.

El grado alcohólico se determinó por espectroscopía FTIR (Infrarrojo por Transformada de Fourier) en el Instituto Tecnológico Agrario (ITAGRA). Los resultados obtenidos fueron expresados en (% v/v).

El seguimiento de la concentración de  $H_2O_2$  en el mosto y en el vino se realizó a través de un método semi-cuantitativo con tiras reactivas (kit Quantofix peroxide 100, Macherey-Nagel, Alemania).

El índice de polifenoles totales (IPT) se determinó en cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor, midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, Spain) a 280 nm.

La determinación de color se realizó por el método CIELab que permite caracterizar el color a partir de un sistema tridimensional definido por las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , que describen la percepción visual del color siendo  $L^*$  la luminosidad y  $a^*$  y  $b^*$  los matices cromáticos. Para determinar estas coordenadas, se miden las absorbancias en un espectrofotómetro (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, Spain) a 450, 520, 570 y 630 nm. Para evaluar si dos vinos presentan una diferencia de color perceptible por el ojo humano, se empleó la fórmula de diferencia colorimétrica  $\Delta E^*$  ( $\Delta E^* = \sqrt{[(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2]}$ ). Si el valor de este parámetro es menor a 1 se puede interpretar que la diferencia visual entre los colores es imperceptible.

La determinación de la concentración de ácido glucónico se determinó en el mosto inicial, el mosto tras el tratamiento y en el vino final mediante espectrofotometría (Multitask GO, Laboratorio de Técnica Instrumentales, UVa). Para ello se empleó un kit enzimático específico, D-gluconic acid/D-glucono- $\delta$ -lactone (K-GATE, Megazyme, Bray, Irlanda). Los resultados se expresan en g/L.

Estos análisis se realizaron por duplicado en cada matraz, excepto la glucosa y el ácido glucónico, de los que se realizaron 4 réplicas.

## Estudio de las paradas fermentativas

Una vez observada la falta de fermentación alcohólica en los mostos previamente tratados con las relaciones enzimáticas GOX:CAT 1:0, 1:1 y 1:2, se diseñaron ensayos adicionales para evaluar las posibles causas de la parada fermentativa.

### *Evaluación de la tolerancia al $H_2O_2$ de las levaduras fermentativas*

Para evaluar la tolerancia al  $H_2O_2$  de las cepas WAM y Sp3, se diseñó un experimento en condiciones controladas. Ambas cepas se cultivaron por separado en matraces de 100 mL con 50 mL de medio YPD, ajustado al mismo pH que el mosto tratado.

Se empleó el medio YPD por ser un medio de cultivo nutritivo que favorece el crecimiento óptimo de las levaduras y permite una monitorización precisa mediante espectrofotometría. A diferencia del mosto, que es un medio más complejo y variable, el YPD evita interferencias como partículas en suspensión, compuestos fenólicos o precipitados que pueden alterar la lectura de la densidad óptica (DO) a 600 nm durante el crecimiento celular.

Para cada levadura se realizaron los siguientes tratamientos:

- Control (sin  $H_2O_2$  ni levadura)
- Control con solo la levadura
- Levadura + 50 mg/L de  $H_2O_2$
- Levadura + 150 mg/L de  $H_2O_2$
- Levadura + 300 mg/L de  $H_2O_2$

Las levaduras fueron inoculadas a una concentración de  $10^6$  UFC/mL y se incubaron a 21 °C. La DO de cada cultivo se midió diariamente durante 5 días consecutivos mediante espectrofotometría a 600 nm con el fin de monitorizar la evolución del crecimiento celular.

### *Prueba de la catalasa*

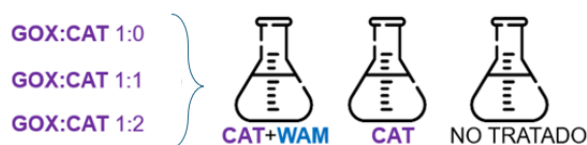
Se llevó a cabo una prueba cualitativa para determinar si las levaduras empleadas presentaban actividad catalasa. Para ello, se extendió una colonia de cada cultivo en un portaobjetos y se añadió una gota de  $H_2O_2$  al 30 % (v/v). La formación de burbujas se interpretó como una reacción positiva, indicando la presencia de la actividad catalasa en la levadura (Torrens y Martín, 2012).

### *Efecto de la adición de enzimas y levaduras*

Los mostos que no fermentaron se dispusieron en distintos matraces a los cuales se aplicaron los siguientes tratamientos a cada concentración de GOX:CAT (Imagen 5):

- Adición de 50 U/mL de CAT y WAM a una concentración de  $10^6$  UFC/mL
- Adición exclusiva de CAT

- Sin adición de tratamiento (control)



**Imagen 5.** Ensayo del efecto del  $H_2O_2$

De esta manera, se podría comprobar si el  $H_2O_2$  presente en los mostos tratados a diferentes concentraciones de GOX:CAT afectaban al desarrollo de WAM tras su inoculación.

Tras la incubación durante 12 días a 21 °C de los mostos tratados, se determinó la concentración de azúcares reductores (OENO 377/2009) en cada muestra para evaluar el grado de fermentación y detectar posibles paradas fermentativas.

## Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar. El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion 19.2.01 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, USA). Se aplicó un análisis de varianza univariante (ANOVA) con el objetivo de evaluar si existían diferencias significativas entre las medias de las distintas muestras. Se consideraron significativas aquellas diferencias con un nivel de confianza del 95 % ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la eficacia de la relación GOX:CAT inmovilizadas en geles de alginato-sílíce como estrategia prefermentativa para reducir el grado alcohólico en vinos blancos, se aplicaron distintos tratamientos enzimáticos al mosto de uva Verdejo utilizando distintas concentraciones GOX:CAT (Tabla 2). El tratamiento se llevó a cabo en condiciones controladas, con el objetivo de analizar la eficiencia en la reducción de la glucosa y  $H_2O_2$  tras la aplicación enzimática.

Además, se analizaron diferentes parámetros fisicoquímicos del mosto y del vino tratado con las enzimas y se comparó con su control no tratado. De esta manera, se comprobó la eficacia del tratamiento y el impacto sobre la calidad final del vino.

## Análisis fisicoquímico del mosto

En la Tabla 3, se pueden observar los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos junto con el análisis estadístico realizado al mosto.

**Tabla 3.** Resultados del análisis fisicoquímico realizado al mosto control y al mosto con el tratamiento enzimático a distintas concentraciones de GOX:CAT.

PARÁMETROS ANALÍTICOS		MOSTO	MOSTO GOX:CAT			
		CONTROL	1:0	1:1	1:2	1:5
Ácido glucónico (g/L)		0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	2,97 ± 0,34 <sup>AB</sup>	6,26 ± 0,13 <sup>BC</sup>	7,21 ± 0,04 <sup>C</sup>	12,29 ± 1,20 <sup>D</sup>
pH		3,85 ± 0,01 <sup>D</sup>	3,45 ± 0,02 <sup>C</sup>	3,34 ± 0,00 <sup>B</sup>	3,29 ± 0,01 <sup>AB</sup>	3,23 ± 0,00 <sup>A</sup>
COLOR	L*	83,1 ± 0,08 <sup>B</sup>	78,03 ± 5,13 <sup>B</sup>	62,58 ± 0,53 <sup>A</sup>	61,73 ± 0,53 <sup>A</sup>	60,28 ± 0,32 <sup>A</sup>
	a*	0,28 ± 0,02 <sup>A</sup>	0,98 ± 0,70 <sup>A</sup>	3,07 ± 0,04 <sup>B</sup>	3,14 ± 0,13 <sup>B</sup>	3,10 ± 0,09 <sup>B</sup>
	b*	21,2 ± 0,15 <sup>A</sup>	22,25 ± 1,06 <sup>A</sup>	25,11 ± 0,20 <sup>B</sup>	25,12 ± 0,22 <sup>B</sup>	25,25 ± 0,08 <sup>B</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)		0,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	3,0 ± 0,0 <sup>D</sup>	2,5 ± 0,0 <sup>C</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>B</sup>	1,0 ± 0,0 <sup>B</sup>

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores ( $p \leq 0,05$ ) comparados mediante el ANOVA.*

En primer lugar, respecto al análisis del mosto representado en la Tabla 3, se comprobó que hay diferencias significativas respecto a la concentración de ácido glucónico. El tratamiento GOX:CAT 1:5 generó la mayor concentración de este ácido siendo significativamente superior a todos los demás tratamientos, a continuación, GOX:CAT 1:2 y 1:1 y por último 1:0 y el control. Estos resultados pueden deberse a que, a una mayor concentración de CAT aplicada, mayor es la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por lo tanto mayor O<sub>2</sub> puede ser reutilizado de nuevo por la GOX para producir el ácido glucónico. Hay que tener en cuenta que la cantidad producida de este ácido tras el tratamiento enzimático es mayor que la cantidad detectada en el mosto, ya que, tal como se ha descrito previamente, se produce una acumulación de este ácido en el interior de este tipo de geles (Bosque et al., 2023b).

En la valoración del pH se observaron diferencias significativas en el pH final del mosto tras el tratamiento enzimático. El mosto control presentó el valor más elevado, siendo significativamente diferente de todos los tratamientos con GOX:CAT. El tratamiento con mayor proporción de CAT resultó en el pH más bajo, lo que concuerda con la mayor producción de ácido glucónico. Esta acidificación progresiva confirma el efecto de la acción enzimática sobre el equilibrio del pH mosto.

En el estudio realizado por Botezatu et al. (2023) con enzimas en estado libre describieron resultados similares, donde comprobaron que al aplicar el tratamiento con GOX:CAT se reducía el pH del mosto en comparación con el control, reduciéndose en



mayor medida a mayores niveles de CAT. Respecto al ácido glucónico, aumentó significativamente a las 24 horas del tratamiento como era de esperar.

Respecto a los parámetros del color, en los tres parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  se observan diferencias significativas entre el control y la muestra 1:0, las cuales presentan más luminosidad y tonos menos rojizos y amarillos, y las muestras 1:1, 1:2 y 1:5.

Aunque cabría esperar que la presencia de CAT, al reducir la concentración de  $H_2O_2$ , limitase la oxidación de los compuestos fenólicos, los resultados obtenidos muestran un incremento en la intensidad del pardeamiento con la presencia de CAT. Este comportamiento sugiere que el  $H_2O_2$  residual no es el principal responsable del cambio del color del mosto.

Por otro lado, la reducción del pH observada en los mostos tratados con CAT tampoco debería ser el causante de este efecto, ya que se ha descrito que tanto el pardeamiento no enzimático, como el pardeamiento por enzimas oxidasas, como la polifenol oxidasa, son menores a pH más ácidos (García-Roldán et al., 2024; Wang and Kumar, 2024).

Por último, se ha reportado que el ácido glucónico generado por la GOX puede combinarse con el  $SO_2$  (Barbe et al., 2002), reduciendo su fracción libre y, por lo tanto, su capacidad antioxidante. Este fenómeno podría explicar el mayor grado de pardeamiento observado en los mostos tratados con CAT.

La determinación de la concentración  $H_2O_2$  de cada tratamiento mostró diferencias significativas entre el mosto control (0 g/L de  $H_2O_2$ ) y las muestras tratadas enzimáticamente, las cuales también presentan diferencias significativas entre ellas, excepto 1:2 y 1:5 que tienen el valor más bajo de  $H_2O_2$  ya que contienen más cantidad de CAT. Röcker et al. (2016) también observaron que a mayor concentración de CAT disminuye en mayor medida los niveles de  $H_2O_2$ .

## Microvinificaciones con Sp3 y WAM en mosto tratado con GOX:CAT

Tras la aplicación del tratamiento enzimático, se llevaron a cabo microvinificaciones utilizando dos cepas de levaduras: *Schizosaccharomyces pombe* (Sp3) y *Saccharomyces cerevisiae* (WAM). Se realizó una estrategia de inoculación secuencial, inoculando en primer lugar Sp3 y a las 72 horas WAM. Esta estrategia de inoculación se fundamenta en estudios previos que demostraron la eficacia de la cepa Sp3 en el consumo de ácido glucónico en mostos en inoculación secuencial con la cepa WAM (del Bosque et al., 2025). Dado que la GOX genera ácido glucónico, la presencia de Sp3

podría contribuir a su reducción, minimizando la acidificación excesiva del mosto y sus posibles implicaciones en la calidad final (Benito et al., 2018). Además, WAM presenta una velocidad de crecimiento y adaptación al medio mayor que Sp3, por lo que podría inhibir el desarrollo de esta última si ambas fueran inoculadas simultáneamente.

En cuanto a los resultados, se comprobó que, tras el tratamiento enzimático de los mostos, en los matraces con proporciones de GOX:CAT de 1:0, 1:1 y 1:2 no se observó actividad fermentativa, mientras que en el control y en el tratamiento 1:5 sí se inició y completó la fermentación. Este resultado puede deberse a la acumulación de  $H_2O_2$ , generado como subproducto de la reacción catalizada por GOX. Los resultados sugieren que en ausencia o con baja concentración de catalasa, este no se eliminó, alcanzando niveles tóxicos que han podido inhibir el metabolismo de las levaduras (Vivancos, A., et al., 2006). Sin embargo, el tratamiento con una proporción de GOX:CAT 1:5, la mayor concentración de catalasa permitió una degradación más eficiente del  $H_2O_2$ . Estos resultados ponen de manifiesto la importancia del equilibrio entre la actividad glucosa oxidasa y catalasa.

## Análisis fisicoquímico del vino

En la Tabla 4, se pueden observar los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos junto con el análisis estadístico realizado a los vinos.

**Tabla 4.** Resultados del análisis fisicoquímico realizado al vino control y al vino con el tratamiento enzimático de GOX:CAT 1:5

PARÁMETROS ANALÍTICOS		VINO CONTROL	VINO GOX:CAT 1:5
Ácido glucónico (g/L)		0,00 ± 0,00 <sup>A</sup>	8,19 ± 1,29 <sup>B</sup>
pH		3,56 ± 0,13 <sup>B</sup>	3,06 ± 0,01 <sup>A</sup>
COLOR	L*	99,75 ± 0,05 <sup>A</sup>	99,63 ± 0,03 <sup>A</sup>
	a*	(-0,89) ± 0,06 <sup>A</sup>	(-0,91) ± 0,01 <sup>A</sup>
	b*	6,43 ± 0,09 <sup>A</sup>	6,94 ± 0,05 <sup>B</sup>
Azúcares reductores (g/L)		0,85 ± 0,05 <sup>A</sup>	1,85 ± 0,55 <sup>A</sup>
$H_2O_2$ (g/L)		0,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	0,0 ± 0,0 <sup>A</sup>
Acidez total (g/L)		3,02 ± 0,59 <sup>A</sup>	3,55 ± 0,10 <sup>A</sup>
Acidez volátil (g/L)		0,33 ± 0,02 <sup>B</sup>	0,19 ± 0,02 <sup>A</sup>
IPT		4,04 ± 0,09 <sup>B</sup>	3,07 ± 0,02 <sup>A</sup>
Grado alcohólico (% vol)		11,57 ± 0,05 <sup>B</sup>	10,34 ± 0,11 <sup>A</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre valores ( $p \leq 0,05$ ) comparados mediante el ANOVA.

El contenido de ácido glucónico fue significativamente superior en el vino tratado con GOX:CAT que en su control. A su vez, esto se relaciona con la reducción significativa del pH en el vino tratado, indicando una mayor acidez de este.

Además, se observó una disminución significativa en la concentración del ácido glucónico en el vino respecto a los valores del mosto tras el tratamiento enzimático debido al metabolismo de la cepa Sp3 (Del Bosque et al., 2025).

En cuanto a los parámetros de color, a diferencia de los mostos, las coordenadas  $L^*$  y  $a^*$  en los vinos no mostraron diferencias significativas entre el vino tratado y el control, lo que sugiere que el tratamiento enzimático no afectó a la luminosidad ni a los tonos rojizos del vino. Sin embargo, la coordenada  $b^*$  relacionada con el componente amarillo, fue algo mayor en el tratamiento frente al control indicando una ligera intensificación del tono amarillo. A pesar de esta diferencia, el valor de la diferencia colorimétrica  $\Delta E^*$  entre ambos vinos fue de 0,52, lo que indica que dicha variación no es perceptible por el ojo humano. Mangas et al. (2023) en su estudio tampoco encontraron diferencias significativas en las propiedades cromáticas de los vinos control y tratados con GOX.

No hubo diferencias significativas en cuanto a la concentración de azúcares reductores en ambas muestras, indicando que la fermentación fue eficaz en ambos casos y que el tratamiento enzimático no generó una parada fermentativa relevante a esta concentración de GOX:CAT.

A pesar de que las diferencias en la acidez total no fueron significativas, se observó un valor ligeramente más alto en el vino tratado. Esto podría deberse a la formación de ácido glucónico en el tratamiento con la GOX.

En cuanto a la acidez volátil, se observaron diferencias significativas entre las muestras, siendo menor en el vino tratado con GOX:CAT en comparación con el control. Mangas et al. (2023), al igual que en este estudio, determinaron en sus vinos una acidez volátil baja, lo cual indica que la fermentación alcohólica se llevó a cabo sin desviaciones.

El vino tratado con GOX:CAT 1:5 presentó un IPT significativamente menor que el control debido a la capacidad de adsorción de las cápsulas de compuestos fenólicos (Del Bosque et al., 2023a).

En cuanto al grado alcohólico, el vino tratado con GOX:CAT mostró una reducción significativa respecto al control, confirmando la eficacia del tratamiento que disminuye la concentración de glucosa en el mosto, reduciendo así la cantidad de azúcares fermentables para las levaduras. Estos resultados están en línea con estudios previos,

como Biyela et al. (2009), que demuestran que el uso combinado de GOX y CAT permite reducir el grado alcohólico del vino.

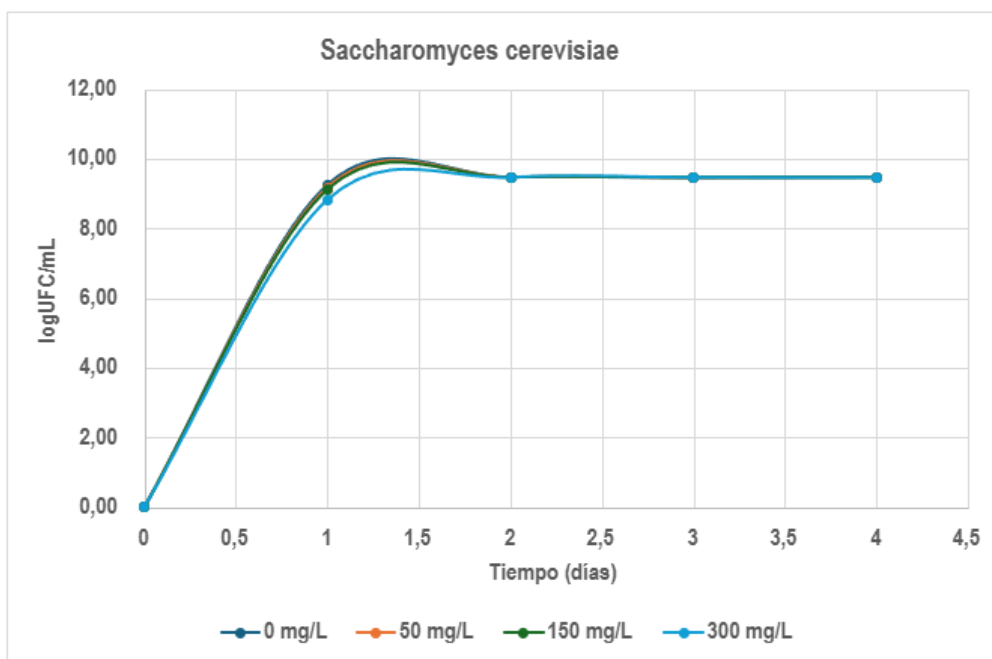
## Estudio de las paradas fermentativas

Como se ha comentado anteriormente, los mostos con proporciones de GOX:CAT 1:0, 1:1 y 1:2 no fermentaron, lo que indica la posible existencia de algún factor inhibidor que impidió el desarrollo normal del proceso fermentativo. Al analizar los resultados, se descartó el ácido glucónico como causa principal de la inhibición, ya que el mosto con mayor concentración de este compuesto logró fermentar correctamente (GOX:CAT 1:5).

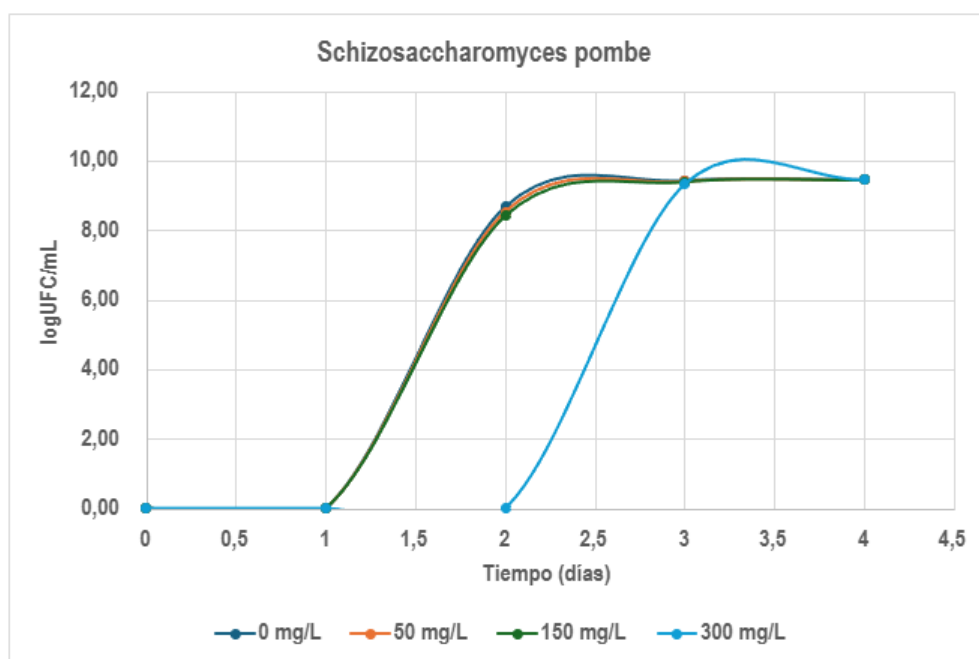
Dado que en ensayos previos ambas cepas demostraron su capacidad para finalizar la fermentación en condiciones enológicas normales (Del Bosque et al., 2025), se planteó como hipótesis principal que la presencia de  $H_2O_2$  residual generado durante el tratamiento enzimático podría estar afectando negativamente a las levaduras.

Para evaluar las causas de la parada fermentativa, se realizaron unos ensayos adicionales a las muestras tratadas con GOX:CAT 1:0, 1:1 y 1:2.

En primer lugar, para determinar la evaluación de la tolerancia al  $H_2O_2$  de las levaduras fermentativas, se realizaron unas curvas de crecimiento en medio YPD ajustado al pH del mosto, sometiendo las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (WAM) y *Schizosaccharomyces pombe* (Sp3) a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  (0, 50, 150 y 300 mg/l). Las figuras 1 y 2 muestran la evolución del crecimiento celular de cada cepa en función del tiempo y concentración de  $H_2O_2$ .



**Figura 1:** cinética de crecimiento de WAM a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .



**Figura 2:** cinética de crecimiento de Sp3 a diferentes concentraciones de  $H_2O_2$ .

Comparando las Figuras 1 y 2, los resultados revelan una clara diferencia en la fase de latencia entre ambas cepas. WAM mostró un crecimiento estable y rápido, alcanzando su máximo crecimiento a los 1,35 días en todas las concentraciones, lo que indica una elevada tolerancia al  $H_2O_2$  que puede estar relacionada con una mayor actividad catalasa. Por el contrario, la cepa Sp3 presentó una respuesta más lenta. Su máximo de crecimiento a las concentraciones de 0, 50 y 150 mg/L de  $H_2O_2$  fue a los 2,5 días desde el momento de la inoculación.

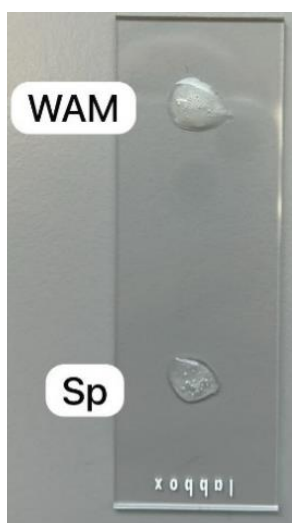
En la Imagen 6 se puede apreciar la diferencia en la turbidez de los ensayos tratados a las 48 horas: WAM (a la izquierda) presenta un crecimiento notable y con Sp3 (a la derecha), con una menor turbidez del medio por su menor velocidad de crecimiento.



**Imagen 6.** Diferencias en la turbidez de los medios de cultivo a las 48 horas de inoculación con WAM y Sp3 a distintas concentraciones de  $H_2O_2$ .

Por otro lado, en presencia de altas concentraciones de  $H_2O_2$  (300 mg/L), la fase de latencia se ve incrementada respecto al control y su máximo de crecimiento se obtuvo tras 3,25 días. Esta diferencia indica que Sp3 es más sensible al estrés oxidativo que WAM.

Complementariamente, la diferencia en la formación de burbujas visibles observada en la prueba de la catalasa (Imagen 7) apoya estos resultados. Se indica que WAM presenta una mayor actividad catalasa, es decir, posee una mayor capacidad de degradar el  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$ .



**Imagen 7.** Prueba de la catalasa.

La actividad catalasa en las levaduras está relacionada con su capacidad para defenderse del estrés oxidativo en algunas situaciones, como por ejemplo la presencia de  $H_2O_2$ . Por lo tanto, estos resultados sugieren que WAM tiene mecanismos antioxidantes más eficientes que la Sp3, lo que explicaría su mayor tolerancia al  $H_2O_2$ , y, por el contrario, Sp3 es más sensible al estrés oxidativo provocado por el  $H_2O_2$ , justificando su menor viabilidad en medios sin altas concentraciones de CAT (Quinn et al., 2002; Vivancos et al., 2006; Beckhouse et al., 2008).

Por lo tanto, en función de estos resultados obtenidos, se diseñó un ensayo con los mostos previamente tratados con las relaciones enzimáticas GOX:CAT 1:0, 1:1 y 1:2, mostos en los que se detectó parada fermentativa. En el siguiente ensayo se evaluó la adición conjunta de CAT y WAM en los mostos tratados, con el fin de reducir el  $H_2O_2$  residual y permitir la reactivación del proceso fermentativo.

Para ello, como se ha descrito anteriormente, se establecieron tres tratamientos para cada relación enzimática:

- Adición de 50 U/mL de CAT y  $10^6$  UFC/mL de WAM
- Adición exclusiva de CAT
- Sin adición de tratamiento (control).

De esta manera, se puede comprobar el efecto que tiene la CAT a los mostos y ver las diferencias cuando se aplica la WAM y con el control.

Los resultados mostraron que solo las muestras tratadas con la combinación de WAM y CAT lograron reducir significativamente los niveles de azúcares (Tabla 5) indicando una reactivación del proceso fermentativo. En cambio, las muestras con solo CAT o sin tratamiento los azúcares reductores permanecieron por encima de 28 g/L, indicando que no se produjo fermentación.

**Tabla 5.** Evaluación de azúcares reductores.

Muestras	Azúcares reductores (g/L)		
	GOX:CAT 1:0	GOX:CAT 1:1	GOX:CAT 1:2
CAT + WAM	1,22	1,37	1,57
CAT	>28	>28	>28
CONTROL	>28	>28	>28

Con estos resultados se comprueba que la adición de CAT por sí sola no fue suficiente para recuperar la fermentación, probablemente porque no hay células viables o son

insuficientes para que se pudiese desarrollar. Por otro lado, la adición conjunta de CAT y WAM permitió eliminar el  $H_2O_2$  residual e introducir células viables, lo que permitió la fermentación del mosto.

Este ensayo confirma que la inhibición inicial de la fermentación no se debió al ácido glucónico, sino a la acumulación de  $H_2O_2$  con efectos tóxicos sobre las levaduras (Quinn et al., 2002; Vivancos et al., 2006; Beckhouse et al., 2008,). Además, se comprueba la eficiencia de estrategias biotecnológicas basadas en la inoculación de levaduras junto a enzimas auxiliares como la CAT para superar condiciones de estrés oxidativo en mostos tratados enzimáticamente.

## CONCLUSIONES

Tras este estudio, se han podido determinar las siguientes conclusiones:

- La relación GOX:CAT 1:5 fue la única que permitió completar la fermentación, gracias a una mayor eliminación del  $H_2O_2$  generado, lo que evitó la inhibición de las levaduras fermentativas.
- La combinación de cápsulas enzimáticas con una proporción GOX:CAT de 1:5, junto la inoculación secuencial de las cepas Sp3 y WAM, demostró ser una estrategia biotecnológica eficaz para elaborar vinos blancos con menor contenido alcohólico y mayor acidez, sin provocar cambios apreciables en su color.
- WAM presentó una mayor tolerancia al  $H_2O_2$  que Sp3 gracias a una mayor actividad catalasa.
- La aplicación conjunta de CAT y WAM permitió reactivar la fermentación en mostos tratados con cápsulas que baja concentración de CAT.

En futuras líneas de investigación, se podría explorar nuevas proporciones de GOX:CAT, como 1:3 o 1:4, para encontrar el equilibrio óptimo entre la reducción de la glucosa, la eliminación del  $H_2O_2$  y la viabilidad fermentativa. También, se precisan más estudios para evaluar la sensibilidad de las cepas de WAM y Sp3 al estrés oxidativo inducido por el  $H_2O_2$  bajo distintas condiciones de inoculación. Además, se sugiere abordar el estudio de la selección de cepas de *S. cerevisiae* y *S. pombe* más resistentes al estrés oxidativo en este tipo de tratamientos.



## BIBLIOGRAFÍA

- Antonio, M. B. (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* | Archivo Digital UPM. <https://oa.upm.es/22769/>
- Barbe, J. C., De Revel, G., & Bertrand, A. (2002). Gluconic acid, its lactones, and SO<sub>2</sub> binding phenomena in musts from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6408–6412. <https://doi.org/10.1021/jf020412m>
- Barceló Compte, A. (2017). Contribución al proceso de industrialización de la tecnología de pertracción evaporativa para el ajuste del grado alcohólico de vinos blancos y tintos. <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/12113>
- Beckhouse, A. G., Grant, C. M., Rogers, P. J., Dawes, I. W., & Higgins, V. J. (2008). The adaptive response of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae* to hydrogen peroxide is mediated by the Yap1 and Skn7 transcription factors. *FEMS Yeast Research*, 8(8), 1214-1222. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00439.x>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2018). *Schizosaccharomyces pombe* biotechnological applications in winemaking. *Methods In Molecular Biology*, 217-226. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7546-4_19)
- Botezatu, A., Elizondo, C., Bajec, M., & Miller, R. (2021). Enzymatic management of pH in white wines. *Molecules*, 26(9), 2730. <https://doi.org/10.3390/molecules26092730>
- Catelen, M. J. (2024). Combinación de estrategias pre-fermentativas y fermentativas para reducir el contenido de alcohol y el pH en vinos Malbec. Tesis doctoral. Universidad Nacional De Cuyo. [https://librosffyl.bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/18934/tesis-final-catelen-corregida-.pdf](https://librosffyl.bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/18934/tesis-final-catelen-corregida-.pdf)
- Cretin, B. N., Dubourdieu, D., & Marchal, A. (2018). Influence of ethanol content on sweetness and bitterness perception in dry wines. *LWT*, 87, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.075>
- Dangles, O., & Fenger, J. (2018). The chemical reactivity of anthocyanins and its consequences in food science and nutrition. *Molecules*, 23(8), 1970. <https://doi.org/10.3390/molecules23081970>
- Del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023a). Silica-calcium-alginate hydrogels for the co-immobilization of

glucose oxidase and catalase to reduce the glucose in grape must. *Gels*, 9(4), 320. <https://doi.org/10.3390/gels9040320>

Del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023b). Entrapment of glucose oxidase and catalase in silica–calcium–alginate hydrogel reduces the release of gluconic acid in must. *Gels*, 9(8), 622. <https://doi.org/10.3390/gels9080622>

Del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., Benito, S., Calderón, F., Tesfaye, W., Rodríguez-Nogales, J. M., (2025). Use of *Schizosaccharomyces pombe* to Consume Gluconic Acid in Grape Must in Unique and Sequential Inoculations With *Saccharomyces cerevisiae*, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2025, 5569178, 14 pages,. <https://doi.org/10.1155/ajgw/5569178>

García-Barceló, J. (1990). *Técnicas analíticas para vinos*. Moja-Olèrdola, Barcelona, España. GAB Sistemática analítica S.L.

García-Roldán, A., Canalda-Sabaté, A., Gombau-Roigé, J., Bustamante-Quñones, M., Just-Borràs, A., Heras, J., Sieczkowski, N., Canals, J., & Zamora, F. (2024). Development of a model to study browning caused by tyrosinase in grape must. *Food chemistry*, 463, 4, 141457. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141457>

Grigoras, A. G. (2017). Catalase immobilization—A review. *Biochemical Engineering Journal*, 117, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.021>

Jones GV., Edwards EJ., Bonada M., Sadras V.O., Krstic M.P., Herderich M. J. (2022). Climate change and its consequences for viticulture. *Managing Wine Quality*, 727-778. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102067-8.00015-4>

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, 235-243. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.08.013>

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, 114975. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114975>

Martínez, A., Aleixandre Tudó, J. L., & Aleixandre, J. L. (2016). Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos: Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IIAD). Universidad Politécnica de Valencia. *Enoviticultura*, 42. <https://riunet.upv.es/server/api/core/bitstreams/44e32778-1325-46f0-b121-c62301a4be94/content>

Nicholas, K. A. (2015). ¿Cómo afecta el cambio climático a los vinos? *Investigación y Ciencia*, 40-49. <https://www.divulgameteo.es/fotos/lecturas/CC-vinos.pdf>

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

Obtención de un extracto enzimático de Glucosa oxidasa y Catalasa con potencial antioxidante en alimentos, un medio de cultivo no convencional. Ojeda L, Noguera N., Triana J.L., Triana-Alonso F. *Biotechnología*, Año 2011, Vol.15 No.2, pag 48-58.

Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A., & Toone, W. M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), 805-816. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-06-0288>

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>

Torrens Gonzalez, D., & Martín García, M. (2012). *Prueba de la catalasa - Sociedad Española de Microbiología*. Sociedad Española de Microbiología. <https://www.semicrobiologia.org/imagen-banco/prueba-de-la-catalasa>

Vivancos, A. P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., & Hidalgo, E. (2006). Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, different response pathways. *Molecular Genetics and Genomics*, 276(6), 495-502. <https://doi.org/10.1007/s00438-006-0175-z>

Wang, G., & Kumar, Y. (2024). Mechanisms of the initial stage of non-enzymatic oxidation of wine: A mini review. *Journal of Food Science*, 89(5), 2530-2545. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17038>

Yuste, J. (2017). Estrategias vitícolas frente al cambio climático: influencia en la maduración tecnológica y fenólica, en el aroma y la composición nitrogenada de la uva. Fundación para la cultura del vino. Próximos retos de la viticultura, 29. [https://culturadelvino.org/wp-content/uploads/encuentro\\_2017.pdf#page=22](https://culturadelvino.org/wp-content/uploads/encuentro_2017.pdf#page=22)

Zhao, R., Ke, Y., Sun, H., Quan, C., Xu, Q., Li, J., Guan, J., & Zhang, Y. (2025). Achievements and challenges in glucose oxidase-instructed multimodal synergistic

antibacterial applications. *Microbiological Research*, 128149.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2025.128149>

Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos.  
Madrid, España. AMV Ediciones.