



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍAS
AGRARIAS**

Grado en Enología

Estudio de la aplicación combinada de la enzima glucosa oxidasa y
Schizosaccharomyces pombe para la reducción del grado
alcohólico en vino Verdejo

Estudiante: Daniela Arroyo Rodríguez

Tutores: Violeta Ruipérez Prádanos
José Manuel Rodríguez Nogales

Diciembre 2025

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
1.1	El cambio climático y sus efectos en el contexto vitivinícola y enológico	3
1.2	El complejo enzimático GOX/CAT como estrategia biotecnológica	3
1.3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> como estrategia biotecnológica	5
2.	OBJETIVOS	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1.	Mosto inicial	8
3.2.	Medios de cultivo.....	8
3.2.1.	Medio YPD sólido.....	8
3.2.2.	Medio YPD líquido	8
3.3.	Tratamiento enzimático.....	9
3.3.1.	Preparación del tratamiento de enzimas GOX/CAT co-inmovilizadas.....	9
3.3.2.	Preparación del complejo enzimático GOX/CAT en estado libre	10
3.4.	Preparación de los inóculos de <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	10
3.5.	Microvinificaciones con <i>S. pombe</i> en mosto tratado con GOX/CAT.....	11
3.5.1.	Aplicación de las enzimas GOX/CAT al mosto Verdejo en T ₀	12
3.5.2.	Régimen de inoculación	12
3.6.	Toma de muestras	13
3.7.	Seguimiento analítico.....	13
3.8.	Seguimiento microbiológico.....	15
3.9.	Tratamiento estadístico de los datos	15
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	16
4.1.	Seguimiento microbiológico. Recuento de viables.....	16
4.2.	Acción de la enzima CAT en el consumo de H ₂ O ₂	18
4.3.	Seguimiento analítico. Características fisicoquímicas	19
4.3.1.	Glucosa y ácido glucónico.....	19
4.3.2.	pH y acidez total.....	22
4.3.3.	Grado alcohólico	25
4.3.4.	Acidez volátil	26
4.3.5.	Color	26
5.	CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN.....	28
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	29

RESUMEN

El aumento de las temperaturas globales debido al cambio climático está provocando diversos efectos sobre la calidad y las características fisicoquímicas de la uva, entre ellos un adelanto de la maduración y un aumento de los azúcares, produciéndose como consecuencia vinos de mayor grado alcohólico.

Actualmente, el sector vitivinícola se está centrando en estudiar diferentes estrategias biotecnológicas para lidiar con este problema, como el uso de las enzimas glucosa oxidasa (GOX), capaz de reducir el contenido inicial de glucosa en el mosto, y catalasa (CAT). Además, se están empleando levaduras no-*Saccharomyces*, como *Schizosaccharomyces pombe*, apta para llevar a cabo el proceso fermentativo del vino de manera individual, así como en inoculación secuencial con *Saccharomyces cerevisiae* para consumir los metabolitos no deseados, en este caso, el ácido glucónico.

Esta combinación prometedora es el objeto de estudio del presente trabajo, en el que se comparará el empleo del complejo GOX/CAT libre e inmovilizada para la reducción del grado alcohólico y se establecerá el régimen de inoculación más adecuado para la reducción del ácido glucónico y la finalización de la fermentación alcohólica. Los resultados obtenidos sugieren que cuando se inocula *S. pombe* de manera conjunta al complejo GOX/CAT en estado co-inmovilizado la eficacia es mucho mayor con respecto al resto de combinaciones llevadas a cabo.

Palabras clave: cambio climático, glucosa oxidasa, catalasa, *Schizosaccharomyces pombe*, ácido glucónico, grado alcohólico.

ABSTRACT

The rising global temperatures due to climate change are having various effects on the quality and physicochemical characteristics of grapes, including earlier ripening and increased sugars, resulting in wines with higher alcohol content.

Currently, the wine industry is focusing on studying different biotechnological strategies to fight this problem, such as the use of enzyme glucose oxidase (GOX), capable of reducing the initial glucose content in the must, and catalase (CAT). In addition, non-*Saccharomyces* yeasts, such as *Schizosaccharomyces pombe*, are being used, suitable for carrying out the wine

fermentation process individually, as well as co-inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* and consuming unwanted metabolites, in this case, gluconic acid.

This promising combination is the subject of this study, which compares the use of the free and immobilized GOX/CAT complex for reducing alcohol content and establish the most suitable inoculation regimen for reducing gluconic acid and ending of alcoholic fermentation. The results obtained suggest that when *S. pombe* is inoculated together with the co-immobilized GOX/CAT complex, the efficacy is significantly greater compared to the other combinations tested.

Keywords: climate change, glucose oxidase, catalase, *Schizosaccharomyces pombe*, gluconic acid, alcoholic degree.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cambio climático y sus efectos en el contexto vitivinícola y enológico

El cambio climático constituye un factor determinante en la transformación de los sistemas vitivinícolas a nivel global, evidenciando alteraciones en el desarrollo de la vid y en los patrones de maduración del fruto, lo que afecta directamente tanto a la producción de uva como a la calidad del vino (Alfonso et al., 2024). Estos cambios fisiológicos se asocian a un creciente desajuste entre la maduración fenólica y tecnológica de la uva (del-Bosque et al., 2023a), caracterizado por una disminución de la acidez y un aumento en la concentración de azúcares, lo que se traduce en vinos con mayores niveles de alcohol (Röcker et al., 2016). Además, el aumento de la concentración de azúcar en mosto puede inhibir el crecimiento de las levaduras. Esto, a su vez, puede provocar fermentaciones alcohólicas lentas y estancadas (Coulter et al., 2008).

Dichas modificaciones, junto con las variaciones en los compuestos fenólicos y aromáticos, repercuten de manera significativa en el equilibrio químico y en las propiedades sensoriales del vino, planteando importantes desafíos microbiológicos y tecnológicos para el sector vitivinícola (Mira de Orduña, 2010). Por ello, se están investigando diversas estrategias en bodega durante las etapas de pre fermentación, fermentación y posfermentación para lograr una reducción del azúcar en el mosto o del etanol en el vino con el menor impacto posible en su calidad organoléptica, convirtiendo la gestión del contenido alcohólico en un aspecto de creciente relevancia en la industria enológica (del-Bosque et al., 2023b; Röcker et al., 2016).

1.2 El complejo enzimático GOX/CAT como estrategia biotecnológica

Una estrategia biotecnológica alternativa para reducir el grado alcohólico del vino se basa en el tratamiento del mosto con las enzimas glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT) antes del inicio de la fermentación alcohólica. Este procedimiento permite una reducción simultánea de la concentración de glucosa disponible para las levaduras fermentativas y una acidificación del mosto, disminuyendo así la producción de etanol en el vino final (del-Bosque et al., 2023a; Mangas et al., 2023).

La **enzima GOX** es una flavoproteína producida naturalmente por el hongo *Aspergillus niger* (Botezatu et al., 2023) que emplea oxígeno molecular para catalizar la oxidación de la β -D-glucosa (Ruiz et al., 2018) a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que conlleva a la reducción del pH del mosto (Biyela et al., 2009; del-Bosque et al., 2023a). La conversión de la β -D-glucosa en ácido glucónico inmoviliza su capacidad para actuar como azúcar

fermentable y aumenta la acidez. De esta forma, se reduce el alcohol potencial al convertir la glucosa en ácido glucónico durante un tratamiento prefermentativo (Botezatu et al., 2023).

La GOX cataliza la reacción de la β -D-glucosa en D-glucono- δ -lactona y H_2O_2 . En la segunda reacción, la D-glucono- δ -lactona se hidroliza de forma espontánea en ácido glucónico (Botezatu et al., 2021; Ruiz et al., 2018), tal y como se muestra en la Figura 1.1. La velocidad de conversión depende principalmente de la aireación con oxígeno.

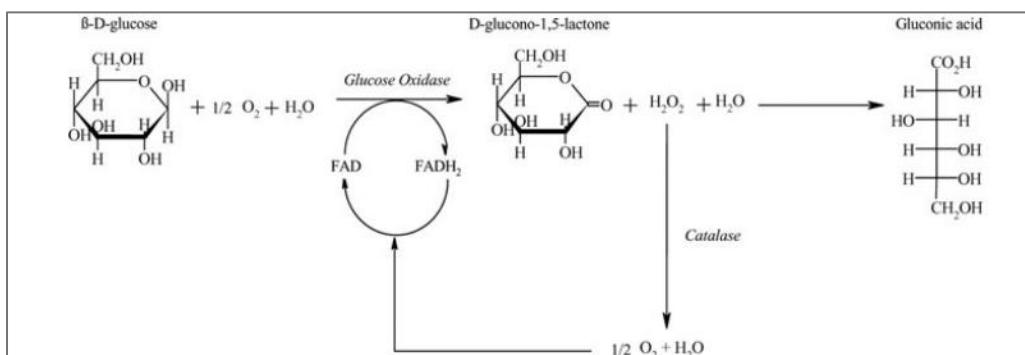


FIGURA 1.1 Mecanismo de reacción del sistema GOX/CAT (Schmidtke et al. 2012).

La **enzima CAT**, una enzima común presente en casi todos los organismos vivos expuestos al oxígeno descompone rápidamente el H_2O_2 (Botezatu et al., 2023). Debido a que el H_2O_2 puede causar oxidación de los pigmentos del mosto, la desactivación de la GOX e incluso problemas durante la fermentación alcohólica, la GOX se aplica junto con la CAT para descomponer el H_2O_2 , generando agua y oxígeno que pueden ser reutilizados por la GOX para llevar a cabo la oxidación de la glucosa en ciclos sucesivos (del-Bosque et al., 2023a; Mangas et al., 2023). En consecuencia, es evidente también el potencial del sistema enzimático de la GOX/CAT para la eliminación rápida de oxígeno del vino (Botezatu et al., 2021; Ough, 1975) y, por lo tanto, los indeseados pardeamientos, proporcionando estabilidad a los vinos resultantes.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas asociadas al uso del complejo enzimático GOX/CAT, diversos estudios han demostrado que la actividad de la GOX puede verse influenciada por múltiples factores, lo que puede limitar su eficiencia en determinadas condiciones de aplicación enológica. Los factores que limitan la conversión de glucosa por la acción catalítica de la GOX incluyen el pH bajo del mosto (Ruiz et al., 2018) y un riesgo de sobreacidificación del mosto debido al alto nivel de ácido glucónico generado durante la reacción de conversión de la glucosa (Valencia et al., 2017). El bajo pH del mosto (entre 3,0 y

4,0) limita la conversión de glucosa por la GOX. La actividad enzimática relativa de la GOX de *A. niger* a pH 5,3 es del 100 % (del-Bosque et al., 2023b).

Con el objetivo de conseguir una actividad enzimática eficiente, actualmente se realizan procedimientos de inmovilización enzimática en biocápsulas de geles de alginato. El alginato es una sustancia biocompatible, no tóxica y de bajo costo, resistente al ataque microbiano y de fácil formulación que se utiliza comúnmente en procesos de inmovilización. Se han diseñado perlas huecas, con una capa semipermeable que contiene una fase líquida, que pueden encapsular la enzima GOX a un pH adecuado para su actividad, que difiere del pH del mosto (Ruiz et al., 2018).

Asimismo, del-Bosque et al. (2023b) ha descrito las diferentes ventajas que puede proporcionar la inmovilización enzimática sobre el uso de enzimas libres:

- La matriz de inmovilización puede actuar como soporte protector para la integridad enzimática en condiciones adversas de pH y temperatura, ampliando así los rangos de actividad enzimática.
- La inmovilización conjunta de la GOX y la CAT, manteniéndolas cerca una de la otra, puede favorecer la cinética de reacción, de modo que el H₂O₂ generado por la GOX estará cerca de la CAT, y el oxígeno producido por la CAT estará inmediatamente disponible para la GOX.
- Permite un control total del tiempo de reacción, ya que se pueden introducir o retirar las cápsulas del mosto a voluntad.
- En ensayos con GOX/CAT co-inmovilizadas se ha logrado reducir entre un 75% y un 90% la liberación al mosto de ácido glucónico procedente de la transformación de la glucosa.

Además, la aplicación de enzimas inmovilizadas facilita la separación de los productos finales y las enzimas pueden reutilizarse o utilizarse en un proceso continuo (Ruiz et al., 2018).

1.3 *Schizosaccharomyces pombe* como estrategia biotecnológica

El uso de *S. pombe* ha despertado un creciente interés en la industria del vino en los últimos años. Durante la última década, esta levadura no convencional ha comenzado a emplearse por su singular capacidad para degradar el ácido málico sin generar ácido láctico, a diferencia de las bacterias lácticas (Figura 1.2) (Benito et al., 2018).

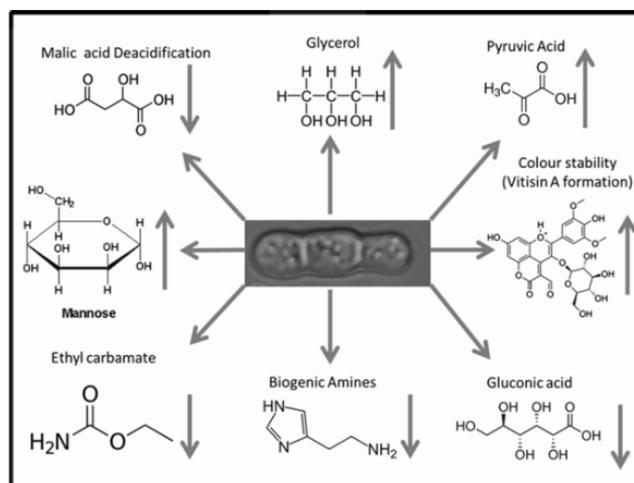


FIGURA 1.2 Resumen de las aplicaciones biotecnológicas en vinificación de *S. pombe* (Benito et al., 2018).

Durante el proceso de maduración, la uva está influenciada por diferentes factores climáticos, como la humedad y la temperatura, que pueden favorecer la proliferación de hongos como *Botrytis cinerea*, que induce cambios en la composición como alteraciones de color debido a la acción de la lacasa (enzima oxidasa), un aumento de la acidez volátil y una mayor producción de ácido glucónico (Peinado, et al., 2009).

Dado que el ácido glucónico no puede ser metabolizado por *Saccharomyces cerevisiae*, este compuesto suele permanecer en el vino tras el proceso fermentativo (Peinado et al., 2009). En este sentido, *S. pombe* destaca por su capacidad para crecer en medios que contienen ácido glucónico como única fuente de carbono, lo que evidencia su notable versatilidad metabólica y su potencial enológico en la mejora de la composición y estabilidad del vino. Gracias a estas propiedades, puede ser utilizada para la desacidificación biológica de mostos, permitiendo reducir la acidez y mejorar el equilibrio químico de los vinos elaborados a partir de uvas con altos niveles de ácido málico y ácido glucónico (Peinado, et al., 2004).

Según Benito et al. (2018), *S. pombe* presenta la ventaja de ser capaz de fermentar completamente mostos de uva con alto contenido de azúcar, de manera similar a *S. cerevisiae*, cuando se utiliza de forma individual. No obstante, diversos estudios (Alfonso et al., 2024; Loira et al., 2018; Mulyono et al., 2022) han señalado que la fermentación mixta de *S. pombe* con *S. cerevisiae* puede dar lugar a vinos con características diferenciadas, resultado de la interacción metabólica entre ambas especies y de la combinación de los compuestos formados durante el proceso fermentativo.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es encontrar la estrategia óptima para reducir el grado alcohólico en vino Verdejo, mediante el empleo del complejo enzimático GOX/CAT y de la levadura *S. pombe*.

Por ello, el propósito específico es comparar el empleo del complejo enzimático GOX/CAT en estado libre o co-inmovilizado y establecer el régimen de inoculación de *S. pombe* más adecuado para la reducción del ácido glucónico y la finalización de la fermentación alcohólica, en mosto Verdejo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Mosto inicial

Para los ensayos realizados en este estudio se utilizó mosto de uva Verdejo. Se mantuvo congelado en las cámaras frigoríficas de la ETSIIAA hasta su uso. Una vez descongelado, se realizaron las analíticas correspondientes, recogidas en la siguiente tabla, siguiendo los métodos de la OIV (OIV, 2020).

TABLA 3.1 Resultados de las analíticas del mosto inicial.

PARÁMETRO	VALORES
pH	3,72
° Brix	23,4 ° Brix
Grado Alcohólico Probable (GAP)	13,7 %vol.
Acidez total (g/L ácido tartárico)	4,0 g/L
IPT	1,60

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Medio YPD sólido

El medio YPD/YEPD (OIV/OENO 206/2010) sólido es el medio de cultivo en el que se sembraron las levaduras de partida, *S. pombe* (CETC 1378) y *S. cerevisiae* (UVAFERM WAM™, Lallemand, Montreal, Canadá) así como el medio donde se realizaron las siembras correspondientes 48 horas después de la inoculación de *S. pombe* en los ensayos. Los componentes del medio YPD/YEPD (OIV/OENO 206/2010) son los siguientes:

- Extracto de levadura: 10,0 g/L.
- Peptona: 20,0 g/L.
- Glucosa: 20,0 g/L.
- Agar: 15,0 g/L.
- pH: $6,5 \pm 0,2$.

El medio se esterilizó en el autoclave a 121°C durante 15 minutos antes de preparar las placas Petri, en las que se vertieron 20-25 ml del medio y se deja solidificar.

3.2.2. Medio YPD líquido

El medio YPD/YEPD (OIV/OENO 206/2010) líquido fue el medio empleado para cultivar las levaduras que posteriormente se inocularán en los ensayos. Su composición es la misma que el medio sólido, pero sin adicionar agar.

3.3. Tratamiento enzimático

Para evaluar y comparar la actividad del complejo enzimático GOX/CAT cuando se encuentran en estado libre (L) o co-inmovilizado (I), se realizaron los mismos ensayos de manera simultánea y bajo las mismas condiciones experimentales con el mosto de la variedad Verdejo:

- I: GOX y CAT co-inmovilizadas en biocápsulas de alginato-sílice (ALG-Si).
- L: Complejo enzimático GOX/CAT en estado libre.

Las enzimas GOX (EC 1.1.3.4, Gluzyme Mono 10.000 BG de *A. niger*, 10.000 U/g) y CAT (EC 1.11.1.6, Catazyme 25 L de *A. niger*, 25.000 U/ml) fueron proporcionadas por Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca).

3.3.1. Preparación del tratamiento de enzimas GOX/CAT co-inmovilizadas

Para realizar la preparación del tratamiento enzimático, se siguió el protocolo establecido por del-Bosque et al. (2023):

i) Extracción de la enzima GOX

Debido al contenido en harina de trigo de la GOX comercial, se comenzó preparando un extracto enzimático disolviendo 0,75 g de GOX Gluzyme Mono BG (10.000 U/g) en 25 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 6,5. Se mantuvo en agitación (agitador orbital SO1, Stuart Scientific, Stone, Reino Unido) a 225 rpm durante 30 minutos a 25°C. Tras esto, la suspensión se centrifugó (Sorvall ST 8R Centrífuga, Osterode am Harz, Alemania) a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante que actuará posteriormente como fuente de GOX se pasó a un Falcon estéril de 50 mL y se mantuvo hasta su uso refrigerado a 4°C (Figura 3.1).



FIGURA 3.1 Resultado de la extracción de la enzima GOX en tampón citrato.

ii) Preparación del complejo enzimático GOX/CAT co-inmovilizado en biocápsulas de alginato-sílice

Para la preparación del complejo enzimático GOX/CAT co-inmovilizado se pesaron 8,86 g de silicato coloidal (LUDOX, HS40) y, en agitación continua (agitador orbital SO1,

Stuart Scientific) a 700 rpm se fue añadiendo, 36,6 mL de agua desionizada a pH 6,6 y 588 µL de silicato de sodio.

A 60 mL de agua desionizada ajustada a pH 6,6 y calentada a 40°C, se añadió 1,80 g de alginato de sodio. Una vez que el alginato quedó completamente disuelto, se añadió la solución de silicatos y se mantuvo en agitación. A continuación, se añadieron 12 mL de la solución extraída de GOX y 144 µL de la preparación comercial de CAT y se mantuvo en agitación.

iii) Formación de las biocápsulas

La mezcla preparada se extruyó mediante una bomba peristáltica (BQ80S, Lead Fluid, Baoding, China) a flujo de 13,6 mL/minuto sobre 1 L de CaCl₂ 0,2 M a una altura de 20 cm para favorecer la simetría esférica de las biocápsulas. Se dejó en agitación orbital, durante 1 hora para completar el proceso de gelificación y endurecimiento de las biocápsulas de alginato-sílice. Tras este tiempo, se dejaron en refrigeración a 8°C hasta su utilización. Finalmente, las biocápsulas se filtraron, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar durante 3 minutos sobre papel de filtro antes de su utilización (Figura 3.2).



FIGURA 3.2 Biocápsulas de alginato-sílice tras el proceso de preparación.

3.3.2. Preparación del complejo enzimático GOX/CAT en estado libre

Para llevar a cabo los ensayos con tratamiento enzimático en estado libre, se realizó la extracción de GOX en tampón citrato 0,1 M a pH 6,5 cumpliendo con el protocolo establecido anteriormente. La enzima CAT se añadió directamente del preparado comercial.

3.4. Preparación de los inóculos de *S. pombe* y *S. cerevisiae*

Los inóculos de *S. pombe* (CECT 1378) y *S. cerevisiae* (UVAFERM WAMTM), inicialmente en medio YPD/YEPD sólido, se sembraron en medio de cultivo líquido y se incubaron durante 48-72 horas. Seguidamente, 48 horas antes de inocular los mostos, se tomó 1 mL de levadura y se transfirió a un nuevo medio líquido (Figura 3.3) y se incubó a 28°C.

Teniendo en cuenta el régimen de inoculación de cada ensayo, se inocularon los matraces a una concentración de 10^6 UFC/mL, estimando la concentración mediante la Escala McFarland, en la cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones y se cerraron con algodón y papel de aluminio.



FIGURA 3.3 Preparación de los inóculos de levadura en medio YPD/YEPD (OIV/OENO 206/2010) en cabina de flujo laminar.

3.5. Microvinificaciones con *S. pombe* en mosto tratado con GOX/CAT

Para desarrollar este estudio, se realizaron 8 vinificaciones diferentes a escala de laboratorio, todas ellas con una característica en común: el inicio del ensayo (T_0) coincide con la aplicación del tratamiento enzimático, tal y como se muestra en el Figura 3.4.

Cada ensayo se hizo por duplicado, teniendo un total de 18 matraces de mosto Verdejo, al que se adicionó ACTIMAX NATURA (Agrovin, Ciudad Real, España), a una dosis de 20 g/hL, activador orgánico de la fermentación. Una vez suplementado, el mosto se dividió en matraces de 250 mL (previamente esterilizados) en cantidades de 100 mL, en la cabina de flujo laminar.

Las levaduras empleadas fueron *S. cerevisiae* (*WAM*) y *S. pombe* (*Sp*) y los ensayos consistieron en lo siguiente:

- Control: *W*: inoculación de *WAM* a T_0 . No se trató con GOX/CAT.
- Ensayo 1: *GOX_SP*: inoculación conjunta de *Sp* al tratamiento enzimático (T_0).
- Ensayo 2: *GOX_SP/W*: inoculación conjunta de *Sp* al tratamiento enzimático (T_0) e inoculación secuencial con *WAM* a las 48 horas (T_2).
- Ensayo 3: *GOX48_SP*: inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático (T_2).
- Ensayo 4: *GOX48_SP/W*: inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático (T_2) e inoculación secuencial con *WAM* a las 96 horas (T_4).

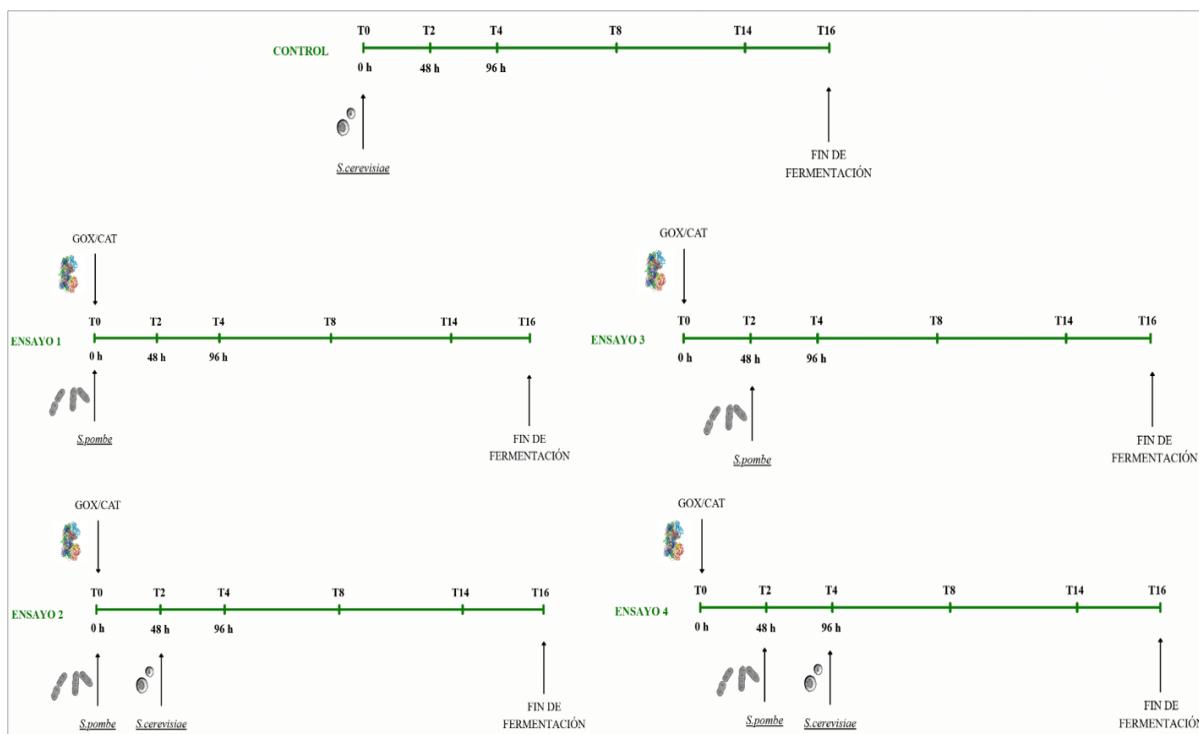


FIGURA 3.4 Líneas del tiempo de los ensayos llevados a cabo en el presente estudio.

3.5.1. Aplicación de las enzimas GOX/CAT al mosto Verdejo en T₀

El tratamiento con GOX/CAT co-inmovilizadas se realizó añadiendo 6 g de biocápsulas de ALG-Si a cada 100 mL de mosto Verdejo, en la cabina de flujo laminar. Durante las primeras 48 horas de tratamiento los ensayos se conservaron en diferentes condiciones y, una vez pasado este tiempo, las biocápsulas se retiraron y el ensayo continuó:

- Ensayos 1 y 2: 21°C sin agitación, para el correcto desarrollo de *S. pombe*.
- Ensayos 3 y 4: 15°C con agitación, para favorecer el intercambio de sustratos del mosto con las biocápsulas.

En el caso de las enzimas GOX/CAT en estado libre, se añadieron 1,15 mL de GOX y 13,8 µL de CAT. Las condiciones de conservación durante las primeras 48 horas fueron las mismas que las aplicadas en los ensayos tratados con GOX/CAT co-inmovilizadas.

3.5.2. Régimen de inoculación

Los ensayos 1 y 2 se inocularon con *Sp* en T₀ y los ensayos 3 y 4 se inocularon con *Sp* en T₂. Asimismo, el ensayo 2 se inoculó con *WAM* en T₂ y el ensayo 4 se inoculó con *WAM* en T₄.

Como se ha descrito, durante las primeras 48 horas los ensayos inoculados con *Sp* en T₀ (ensayos 1 y 2) se conservaron a 21°C y los ensayos que se inocularon con *Sp* en T₂ (ensayos 3 y 4) se mantuvieron a 15°C en agitación, hasta su inoculación.

Se consideró el fin de la fermentación a los 16 días (T₁₆) del inicio del tratamiento y para controlar el proceso fermentativo se mantuvieron los matraces en la estufa a 21°C una vez inoculada la cepa de *S. pombe*.

3.6. Toma de muestras

Para realizar el seguimiento fermentativo, se tomaron muestras de los diferentes ensayos en los tiempos establecidos: T₀, T₂, T₈, T₁₄ y T₁₆. Todos los muestreos se realizaron antes de llevar a cabo las operaciones pertinentes en los tiempos establecidos en cabina de flujo laminar y por duplicado. Las muestras recogidas se centrifugaron y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis al final del proceso de vinificación, con el objetivo de determinar el contenido de glucosa y de ácido glucónico a lo largo de la microvinificación experimental.

Del mismo modo, se tomó muestra del mosto inicial para la determinación de °Brix, pH, acidez total y color, así como del vino final para la determinación de grado alcohólico, pH, acidez total, acidez volátil y color. Se tomaron muestras de los ensayos en T₂ y T₈ para la determinación de H₂O₂.



FIGURA 3.5 Toma de muestras en tubos Eppendorf y en tubos Falcon estériles, en cabina de flujo laminar.

3.7. Seguimiento analítico

- pH

Para determinar el pH de las muestras se utilizó el método potenciométrico (OIV-MA-AS313-15). Este se basa en la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de medida. Para ello se empleó un pH-metro de sobremesa (BASIC 20, CRISON, Barcelona, España).

- **Grado alcohólico probable**

Para la determinación del grado alcohólico probable (GAP) se empleó el refractómetro (ATAGO, Hand refractometer ATC-1, Tokio, Japón). Este instrumento mide la concentración de azúcar de la muestra basándose en la refracción de la luz, cumpliendo con la Ley de Snell y empleando el índice de refracción. Los resultados se expresaron en °Brix y se interpolaron en la tabla de correspondencia °Brix-GAP.

- **H₂O₂**

La determinación de la concentración de H₂O₂ en los ensayos se realizó haciendo uso de un método semi-cuantitativo con tiras reactivas (kit Quantofix peroxide 100, Macherey-Nagel, Düren, Alemania).

- **Glucosa**

Para llevar a cabo el análisis de la glucosa en las muestras se utilizó un kit enzimático de D-Fructose and D-Glucose (K-FRGLQR, Megazyme Bray Co., Wicklow, Ireland). La lectura se realizó con un espectrofotómetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) del laboratorio de técnicas instrumentales (LTI) de la ETSIIAA. Los resultados se expresaron en g/L de glucosa.

- **Ácido glucónico**

Para analizar el ácido glucónico en las muestras se utilizó un kit enzimático de D-Gluconic (K-GATE) de Megazyme. La lectura se realizó con un espectrofotómetro Multiskan GO del LTI de la ETSIIAA. Los resultados se expresaron en g/L de ácido glucónico.

- **Acidez total**

La determinación de la acidez total de las muestras se realizó utilizando el método potenciométrico, utilizando un pH-metro (BASIC 20, CRISON). Este método aplicado para la determinación de la acidez total consiste en llevar la muestra hasta pH 7,0 adicionando una solución de NaOH 0,1 N. Los resultados fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

- **Grado alcohólico**

El grado alcohólico de las muestras se determinó mediante el equipo analizador (OENOFOSS 2, Barcelona, España) que emplea tecnología de análisis de infrarrojo por transformada de fourier (espectroscopía FTIR) en el Instituto Tecnológico Agrario (ITAGRA). Los resultados se expresaron en (%, v/v).

- **Acidez volátil**

Para la determinación de la acidez volátil de las muestras se empleó el método de García Tena (OIV, 2020). Este método se basa en la separación del ácido acético del vino mediante una

destilación simple (directa y parcial) y posterior valoración del destilado con una disolución de NaOH 0.01N de factor conocido. Los resultados se expresaron en g/L de ácido acético.

- **Color**

La determinación del color de las muestras se llevó a cabo utilizando el método CIELab, que se basa en un espacio de color que utiliza tres coordenadas, L*, a* y b*, correlacionadas con los atributos del color: claridad, croma y tono. Se midieron diferentes absorbancias en el espectrofotómetro (GenesysTM 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, Spain) y se introdujeron en el programa MCSV (Universidad de la Rioja) (OIV-MA-AS2-11). Se realizó la conversión a coordenadas RGB para realizar el análisis visual usando el software de libre acceso ColorDesigner.

3.8. Seguimiento microbiológico

Para conocer la implantación de los microorganismos en las microvinificaciones, se realizó una siembra en placa de cada uno de los ensayos en medio YPD/YEPD sólido. El método empleado fue la siembra en superficie por extensión haciendo uso de asas Drigalski estériles para la correcta distribución por toda la placa, dentro de la cabina de flujo laminar.

Esto se realizó 48 horas después de la inoculación de *S. pombe*, con el objetivo de conocer la capacidad de implantación de estas levaduras bajo las diferentes condiciones de cada ensayo.

De cada ensayo, se realizaron dos siembras por duplicado, de 10 µL y 100 µL. Las placas sembradas se mantuvieron en la estufa hasta la aparición de colonias y su correspondiente recuento de viables.

3.9. Tratamiento estadístico de los datos

Una vez recogidos todos los datos necesarios resultantes de las analíticas realizadas, se realizó el análisis estadístico empleando el programa Statgraphics Centurion XIX (versión 19.2.01, The Plains, VA, Estados Unidos). Se usaron las herramientas de análisis de varianza univariante (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de las diferentes muestras ($p<0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Seguimiento microbiológico. Recuento de viables

Se realizaron siembras en placa a las 48 horas de inocular *S. pombe* en el mosto Verdejo, para comprobar la implantación de la cepa bajo las condiciones de cada ensayo verificando su presencia en el medio.

El recuento de viables en placa se realizó tras la incubación de una muestra procedente de cada uno de los ensayos realizados, calculando posteriormente las unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

TABLA 4.1 Población de microorganismos (log UFC/mL) en cada ensayo a las 48 horas de la inoculación de *S. pombe*.

log UFC/mL			
INOCULACIÓN	ENSAYO	L	I
CONJUNTA	<i>GOX_SP</i>	4,48 ± 0,0	4,29 ± 0,27
	<i>GOX_SP/W</i>	4,43 ± 0,07	3,31 ± 0,08
POSTERIOR	<i>GOX48_SP</i>	4,34 ± 0,08	Contaminación
	<i>GOX48_SP/W</i>	4,38 ± 0,13	Contaminación

Como se puede observar en la Tabla 4.1, a las 48 horas de la inoculación de *Sp* en el mosto Verdejo, el menor crecimiento microbiológico se observó en los ensayos en los que se inoculó *Sp* de manera conjunta al tratamiento enzimático co-inmovilizado (*GOX_SP/W I*). Es destacable que a las 48 horas de inocular *Sp* en los ensayos con inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático en estado co-inmovilizado (*GOX48_SP I* y *GOX48_SP/W I*) se observaron contaminaciones.

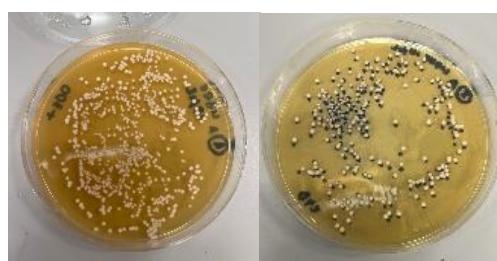


FIGURA 4.1 Placas sembradas con muestra de ensayo de inoculación de *Sp* conjunta al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado libre (*GOX_SP* y *GOX_SP/WL*).

La Figura 4.1 presenta las colonias desarrolladas en las placas inoculadas procedentes del ensayo en que *Sp* fue añadido de manera conjunta al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado libre. Las colonias observadas presentan en su mayoría un tamaño intermedio, pero

también hay presencia de colonias de menor tamaño, lo que sugiere la presencia de distintas cepas de levaduras.

En las placas sembradas con mosto de los ensayos con inoculación de *Sp* posterior al tratamiento con enzimas en estado libre se observaron colonias de gran tamaño que, al ser analizadas mediante microscopía, presentaron una morfología característica del género *Saccharomyces*. Asimismo, se evidenció el desarrollo de colonias de menor tamaño, cuya observación microscópica reveló estructuras alargadas, compatibles con *S. pombe* (Figura 4.2).



FIGURA 4.2 Placas sembradas con muestra de ensayo de inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado libre (*GOX48_SP* y *GOX48_SP/WL*). Colonias de mayor tamaño vistas al microscopio, con morfología propia del género *Saccharomyces*. Colonias de menor tamaño vistas al microscopio, con morfología propia de *S. pombe*.

En condiciones de co-inmovilización enzimática con inoculación conjunta de *Sp* los valores de UFC/mL disminuyen, lo cual podría indicar que los microorganismos tienen una capacidad de reproducción menor cuando el tratamiento enzimático se realiza con el complejo GOX/CAT co-inmovilizado. En las placas se observaron colonias de diferente tamaño, lo que sugiere la presencia de varias cepas de levaduras.

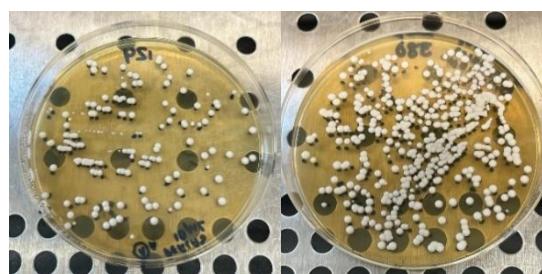


FIGURA 4.3 Placas sembradas con muestra de ensayo de inoculación de *Sp* conjunta al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado co-inmovilizado (*GOX_SP* y *GOX_SP/WI*).

En las placas sembradas con muestra de los ensayos de inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático co-inmovilizado se observaron colonias aisladas, de aspecto opaco y borde irregular, con textura aparentemente rugosa o plegada, alejada de la morfología propia de levadura. Al realizar la observación microscópica, se observaron cadenas de cocos y bacilos, lo

cual indicaría la presencia de bacterias en estos ensayos. También se observaron colonias de mayor tamaño, aisladas, con apariencia y textura viscosa. Al examinarlas al microscopio, se identificaron estructuras características de hifas formando micelio, lo que confirma la presencia de hongos, tal y como se muestra en la Figura 4.4. Esto sugiere posibles problemas de control biológico y paradas en la fermentación. Las causas de esta ausencia de crecimiento de las levaduras se analizarán en detalle en el apartado 4.2.



FIGURA 4.4 Placa sembrada con muestra de inoculación de *Sp* posterior al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado co-inmovilizado (*GOX_SP* y *GOX_SP/WI*). Estructuras vistas al microscopio con morfología característica de bacterias (cocos y bacilos). Estructuras vistas al microscopio con morfología característica de hongos (hifas formando micelio).

Por lo tanto, los ensayos que presentaron un mejor desarrollo microbiológico y, por lo tanto, una capacidad de implantación mayor, fueron aquellos en los que se realizó la inoculación de *S. pombe* a la vez que el tratamiento enzimático con complejo GOX/CAT en estado libre (*GOX_SP L* y *GOX_SP/WL*). Asimismo, según los resultados obtenidos, se puede confirmar la presencia de *Sp* a las 48 horas de su inoculación únicamente en los ensayos *GOX48_SP L* y *GOX48_SP/WL*.

4.2. Acción de la enzima CAT en el consumo de H₂O₂

En todos los ensayos se tomó muestra de H₂O₂ en T₂ para determinar el contenido en H₂O₂, procedente de la acción de GOX. Días más tarde, en T₈, se volvió a hacer la medición, observando que los ensayos con mayor contenido de H₂O₂, en torno a 10 mg/L, eran aquellos que tuvieron problemas para fermentar, los ensayos con inoculación de *Sp* posterior al con tratamiento enzimático co-inmovilizado (*GOX48_SP I* y *GOX48_SP/WI*), como indica la Tabla 4.2. Este resultado nos puede llevar a la siguiente hipótesis: como las biocápsulas de ALG-Si con el tratamiento de GOX/CAT co-inmovilizadas se retiraron antes de llevar a cabo la inoculación de *S. pombe* en los ensayos con inoculación posterior de *Sp*, no hubo enzima CAT para degradar la cantidad de H₂O₂ remanente. Esto explicaría las contaminaciones explicadas en el apartado 4.1. De esta forma, se confirma la eliminación eficiente de H₂O₂ por la enzima CAT que, como autores confirman, no se ve afectada por la alta acidez del mosto de uva

(Schmidtke et al., 2012). Asimismo, en estado libre tiene una mayor capacidad para consumir el H₂O₂ producida por GOX.

TABLA 4.2 Determinación del agua oxigenada (H₂O₂) de los ensayos a T₂ y a T₈.

INOCULACIÓN	ENSAYO	mg/L H ₂ O ₂			
		T ₂		T ₈	
		L	I	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	100	30	<1	<1
	GOX_SP/W	100	30	<1	<1
POSTERIOR	GOX48_SP	100	100	<3	10
	GOX48_SP/W	100	100	<3	10

4.3. Seguimiento analítico. Características fisicoquímicas

4.3.1. Glucosa y ácido glucónico

Se realizó el seguimiento del proceso fermentativo mediante la determinación de la concentración de glucosa de los diferentes ensayos. El contenido inicial de glucosa fue de 124,24 g/L.

Como se muestra en las gráficas de la Figura 4.5, en T₂ los ensayos tratados con el complejo enzimático GOX/CAT en estado libre (L) mostraron una caída más pronunciada del contenido de glucosa que los tratados con las enzimas co-inmovilizadas, con una diferencia aproximada de 20 g/L de glucosa.

Del mismo modo, en este momento del estudio, los ensayos con inoculación posterior de *Sp* mostraron un consumo de glucosa mayor que los inoculados de manera conjunta, tal y como se muestra en la Tabla 4.3. Es decir, en T₂, los ensayos que no habían sido inoculados aún con *Sp* mostraron un consumo mayor de glucosa, atribuido a la acción de GOX. Además, todos los ensayos comenzaron el consumo de glucosa en presencia o ausencia de *S. pombe*.

TABLA 4.3 Determinación de la concentración de glucosa (g/L) en los ensayos en T₂.

Concentración de glucosa (g/L) en T ₂			
INOCULACIÓN	ENSAYOS	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	94,3 ± 18,84 ^{ab}	114,9 ± 16,28 ^b
	GOX_SP/W	98,8 ± 16,99 ^{ab}	116,2 ± 4,81 ^b
POSTERIOR	GOX48_SP	94,1 ± 7,38 ^{ab}	110,5 ± 24,33 ^b
	GOX48_SP/W	90,1 ± 11,34 ^{ab}	89,2 ± 11,22 ^{ab}
CONTROL		63,1 ± 15,51 ^a	

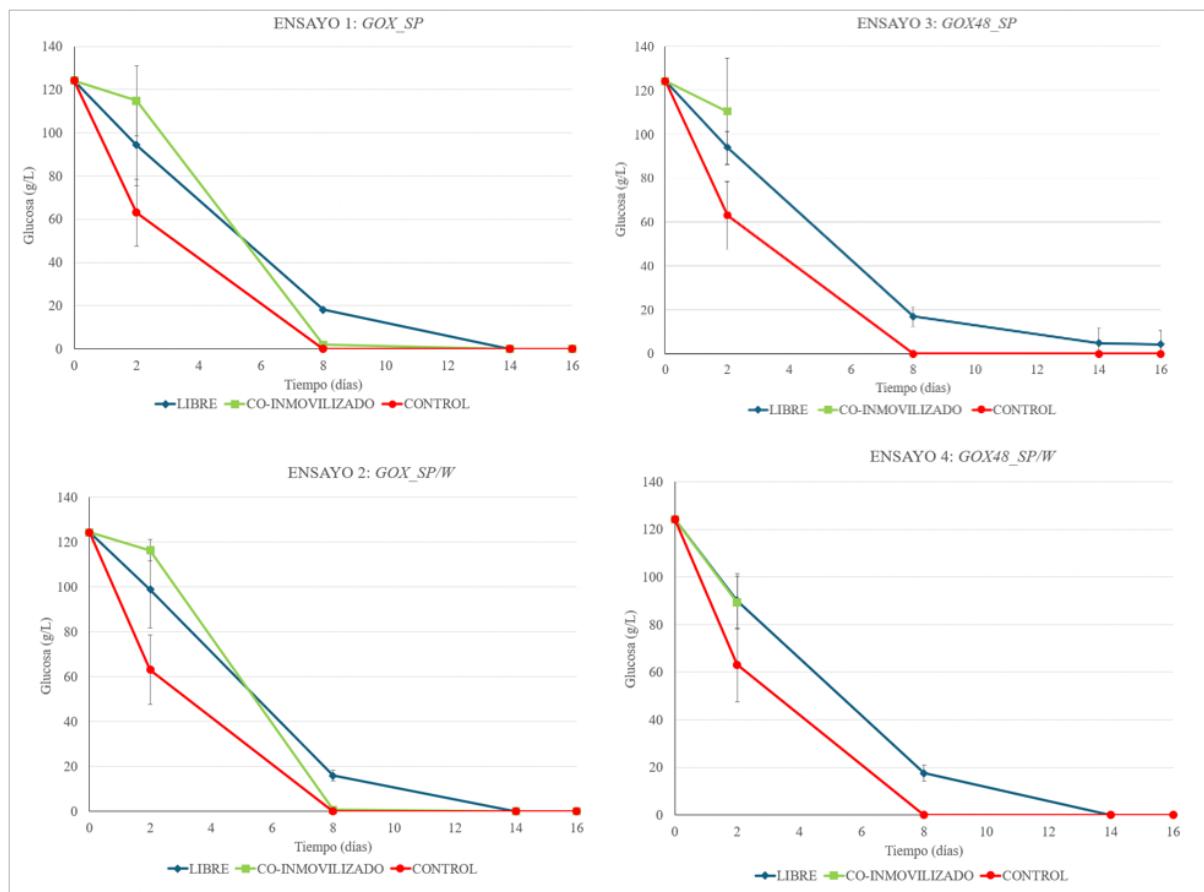


FIGURA 4.5 Evolución de la concentración de glucosa (g/L) de los ensayos en T₀, T₂, T₈, T₁₄ y T₁₆. Los ensayos GOX48_SP I y GOX48_SP/W I se dieron por finalizados en T₂ debido a la contaminación y parada fermentativa.

En T₈, el ensayo control ya había agotado el contenido en glucosa. En ese tiempo, los mostos tratados con GOX/CAT co-inmovilizadas y con inoculación conjunta de *Sp* mostraron una concentración de glucosa prácticamente agotada, tras la retirada de las biocápsulas de ALG-Si. En este momento del estudio el contenido de ácido glucónico de los ensayos tratados con enzima libre superaba a los ensayos tratados con enzimas co-inmovilizadas en más de 15 g/L (Figura 4.6), cantidad muy superior que causó la bajada de pH (véase en el apartado 4.3.2) y consecuente ralentización de la fermentación.

Sin embargo, debido a la contaminación registrada en los ensayos GOX48_SP I y GOX48_SP/W I en T₂, no es posible establecer una comparación confiable entre los diferentes regímenes de inoculación. El resto de los ensayos terminaron la fermentación.

Por lo tanto, los ensayos tratados con GOX/CAT en estado libre presentaron un consumo mayor de glucosa al inicio del tratamiento. No obstante, tras la retirada de las biocápsulas en T₂ de los mostos pertinentes, estos mostraron un consumo de glucosa mayor.

La determinación del ácido glucónico consumido por *S. pombe* se representa en la Figura 4.6, donde se muestra que en T₂ la cantidad de ácido glucónico encontrado en el mosto es mayor en los ensayos tratados con GOX/CAT en estado libre, coincidiendo con la caída pronunciada de glucosa explicada anteriormente. Esto explicaría, una vez más, que la acción de la enzima GOX es mayor cuando se encuentra en estado libre en el medio y la capacidad de las biocápsulas de ALG-Si para retener ácido glucónico que, como se ha descrito en estudios anteriores, pueden llegar a tener una capacidad de retención de hasta el 72% (del-Bosque et al., 2023a).

Asimismo, en el tiempo T₂ se observó una mayor concentración de ácido glucónico en los ensayos *GOX48_SP* y *GOX48_SP/W*, lo que probablemente se deba a la ausencia de *S. pombe* en el medio en ese punto experimental.

La inoculación de *Sp* de manera conjunta al tratamiento enzimático permitió que el contenido máximo de ácido glucónico en el mosto no superase los $17,87 \pm 0,79$ g/L mientras que, los mostos con inoculación posterior de *Sp* alcanzaron unos valores máximos de $37,00 \pm 0,75$ g/L de ácido glucónico.

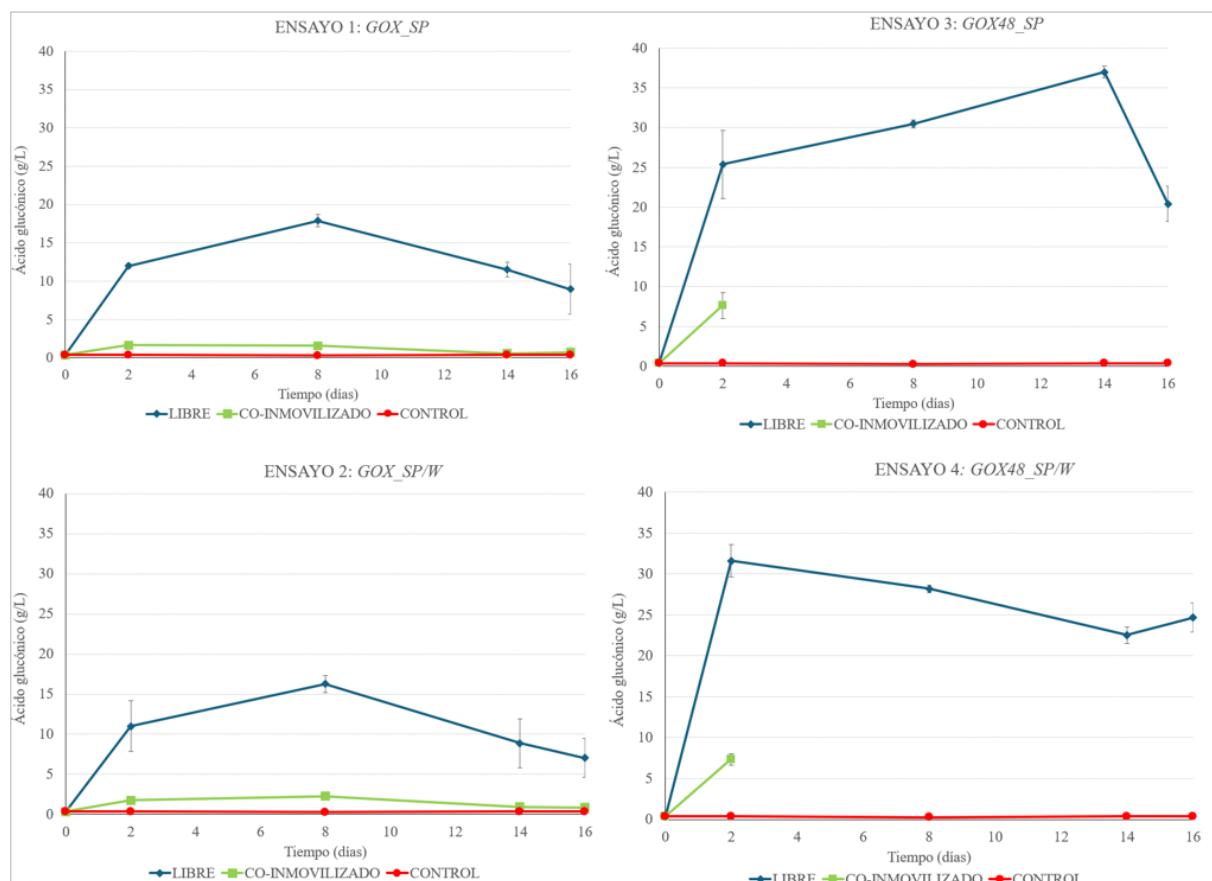


FIGURA 4.6 Evolución de la concentración de ácido glucónico (g/L) de los ensayos en T₀, T₂, T₈, T₁₄ y T₁₆. Los ensayos *GOX48_SP* I y *GOX48_SP/W* I se dieron por finalizados en T₂ debido a la contaminación y parada fermentativa.

Atendiendo a los valores de la Tabla 4.4, los ensayos tratados con GOX/CAT en estado libre que finalizan el estudio con un contenido menor de **ácido glucónico** son los inoculados con *Sp* de manera conjunta, sin mostrar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos.

TABLA 4.4 Determinación de la concentración de ácido glucónico de los ensayos en T_{16} *GOX48_SP I* y *GOX48_SP/W I* se retiraron del estudio por contaminación.

Concentración de ácido glucónico (g/L) en T_{16}			
INOCULACIÓN	ENSAYOS	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	$8,95 \pm 3,29^b$	$0,73 \pm 0,31^a$
	GOX_SP/W	$7,06 \pm 2,40^{ab}$	$0,88 \pm 0,08^a$
POSTERIOR	GOX48_SP	$20,42 \pm 2,23^c$	-
	GOX48_SP/W	$24,67 \pm 1,78^c$	-
CONTROL		$0,36 \pm 0,01^a$	

Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas entre los ensayos con inoculación de *Sp* conjunta al tratamiento enzimático en estado co-inmovilizado con el ensayo control, mostrando los valores más bajos de ácido glucónico. Por el contrario, los ensayos con inoculación posterior de *Sp* al tratamiento enzimático en estado libre, *GOX48_SP L* y *GOX48_SP/W L*, finalizaron el estudio con $20,42 \pm 2,23$ y $24,67 \pm 1,78$ g/L de ácido glucónico respectivamente, mostrando diferencias significativas con el ensayo control y representando los valores más elevados de ácido glucónico, pudiendo suponer un problema importante para la composición y estabilidad final del vino al encontrarse en concentraciones superiores a 1 g/L (Mulyono et al., 2022; Schmidtke et al., 2012).

Sin embargo, debido a las contaminaciones a las que se hace mención en puntos anteriores, no se puede llegar a una conclusión real sobre cuál es la mejor combinación de estrategias para reducir la concentración de ácido glucónico. Por lo tanto, se concluye en que, cuando el tratamiento enzimático es libre, se obtienen valores más bajos de ácido glucónico cuando la inoculación de *Sp* se realiza a la vez que el tratamiento enzimático con GOX/CAT y con *WAM*. Si la tendencia fuese igual cuando el tratamiento enzimático se realiza con las enzimas GOX/CAT co-inmovilizadas, se podría concluir en que los valores más bajos de ácido glucónico se obtienen en los ensayos inoculados a la vez que el tratamiento enzimático con GOX/CAT co-inmovilizadas.

4.3.2. pH y acidez total

Se realizó la medida de pH a diferentes tiempos (T_0 , T_2 y T_{16}) a lo largo del proceso fermentativo de los diferentes ensayos. Todos los ensayos se iniciaron con un pH de 3,72 que experimentó una caída tras la aplicación del tratamiento enzimático de GOX/CAT en estado

libre y co-inmovilizado, como indica la Figura 4.7, coincidiendo con lo descrito en estudios anteriores (Pickering et al., 1999). Sin embargo, los mostos tratados con enzima libre presentaron una caída de pH mayor que aquellos tratados con enzima co-inmovilizada, como consecuencia de la transformación de la glucosa a ácido glucónico debido a la acción de GOX (Pickering et al., 1998).

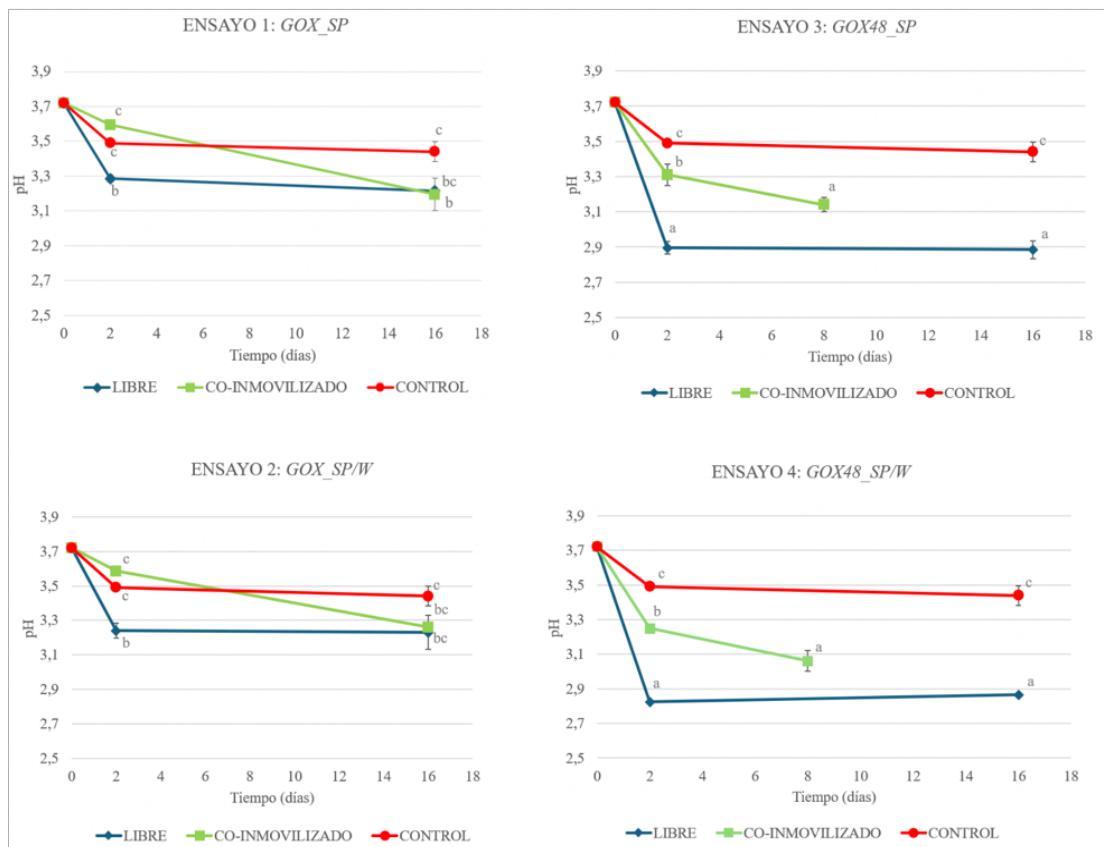


FIGURA 4.7 Evolución del pH de los ensayos en T₀, T₂ y T₁₆. Los ensayos GOX48_SP y GOX48_SP/W se dieron por finalizados en T₈ debido a la contaminación y parada fermentativa.

Debido a la contaminación de los matraces con tratamiento enzimático co-inmovilizado e inoculación en T₂, se midió el pH a T₈ como medida final.

Asimismo, esta caída de pH fue más pronunciada cuando la levadura *S. pombe* se inoculó posterior al tratamiento enzimático. Es decir, a T₂, la bajada de pH fue mayor en ausencia de *S. pombe*. De esta forma, se explicaría la capacidad desacidificante de *S. pombe* (Mulyono et al., 2022).

En la Tabla 4.5 se muestra que los vinos procedentes de los mostos con inoculación posterior de *Sp* y tratados con enzimas en estado libre presentaron los valores más bajos de pH a T₁₆. Aunque los valores de pH de los vinos con inoculación conjunta, tanto con las enzimas libres como co-inmovilizadas, fueron algo menores a los del control, no se observaron

diferencias estadísticamente significativas entre estas medias, a excepción del vino procedente del ensayo *GOX_SP I*.

TABLA 4.5 Determinación de pH de los ensayos a T₁₆. Los ensayos *GOX48_SP I* y *GOX48_SP/W I* se retiraron del estudio por contaminación.

pH en T ₁₆			
INOCULACIÓN	ENSAYO	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	3,22 ± 0,01 ^{bc}	3,20 ± 0,09 ^b
	GOX_SP/W	3,23 ± 0,10 ^{bc}	3,26 ± 0,03 ^{bc}
POSTERIOR	GOX48_SP	2,89 ± 0,05 ^a	-
	GOX48_SP/W	2,87 ± 0,01 ^a	-
CONTROL		3,44 ± 0,06 ^c	

Atendiendo a los resultados obtenidos en el análisis de acidez total de los ensayos al final del estudio, se observa que los vinos procedentes de los mostos con inoculación de *Sp* posterior al tratamiento con enzima en estado libre (*GOX48_SP* y *GOX_SP/W L*) presentaron unos niveles de acidez de 14,56 ± 0,95 y 14,63 ± 0,64 g/L respectivamente, 9 g/L por encima del tratamiento control. Siendo los ensayos con mayor acidez total y menor pH. Tal y como se muestra en la Tabla 4.6, los únicos ensayos que no presentaron diferencias significativas en el valor de acidez total con el ensayo control fueron los tratados con las enzimas co-inmovilizadas.

TABLA 4.6 Determinación de acidez total de los ensayos a T₁₆. Los ensayos *GOX48_SP I* y *GOX48_SP/W I* se retiraron del estudio por contaminación.

Acidez total (g/L ác. tartárico) en T ₁₆			
INOCULACIÓN	ENSAYO	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	9,0 ± 0,53 ^b	5,6 ± 0,11 ^a
	GOX_SP/W	8,9 ± 1,27 ^b	5,9 ± 0,06 ^a
POSTERIOR	GOX48_SP	14,6 ± 0,95 ^c	-
	GOX48_SP/W	14,6 ± 0,64 ^c	-
CONTROL		5,5 ± 0,16 ^a	

El comportamiento de los ensayos inoculados a la vez que el tratamiento enzimático podría deberse a la disponibilidad de oxígeno y su impacto sobre la actividad de la GOX. *S. pombe* consume activamente oxígeno durante las primeras fases de su crecimiento, aunque es una levadura facultativamente anaerobia (Peinado, et al., 2009), para la síntesis de esteroles y ácidos grasos insaturados, compuestos esenciales para la multiplicación celular, limitando la actividad oxidativa de la GOX.

Por ello, el resultado es que en estos ensayos se forma menos ácido glucónico, lo que se traduce en una acidez total menor y un pH más elevado. En cambio, en los ensayos con

inoculación posterior de *Sp*, la enzima actúa libremente antes de la fermentación, favoreciendo la oxidación de la glucosa a ácido glucónico y, por tanto, un incremento de la acidez y una disminución del pH.

4.3.3. Grado alcohólico

La determinación del grado alcohólico, representado en la Figura 4.8, muestra que todos los ensayos presentaron un grado alcohólico inferior al del ensayo control, que terminó el estudio con $11,55 \pm 0,09$ % (v/v). Existen dos grupos de significancia, “a” y “b”, donde el ensayo *GOX_SP/W L* perteneciente al grupo “b”, no presenta diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% con el ensayo control, que también se incluye en el grupo “b”. Los ensayos *GOX_SP/W I*, *GOX48_SP L* y *GOX48_SP/W L*, que terminaron el estudio con $10,34 \pm 0,20$ % (v/v), $10,35 \pm 0,13$ % (v/v) y $10,25 \pm 0,04$ % (v/v) respectivamente, se encuentran en el grupo “a” y se diferencian de manera significativa del ensayo control. Los ensayos restantes, pertenecientes al grupo “ab” no presentan diferencias significativas ni entre ellas ni entre las anteriores. De esta manera, se llegaría a la conclusión de que el tratamiento enzimático con GOX/CAT co-inmovilizadas y con inoculación conjunta de *Sp* y con inoculación secuencial de *S. cerevisiae* reduce de manera significativa el nivel de alcohol, pero también el tratamiento con GOX/CAT en estado libre cuando *Sp* se inocula de manera secuencial de manera individual y junto con *WAM*.

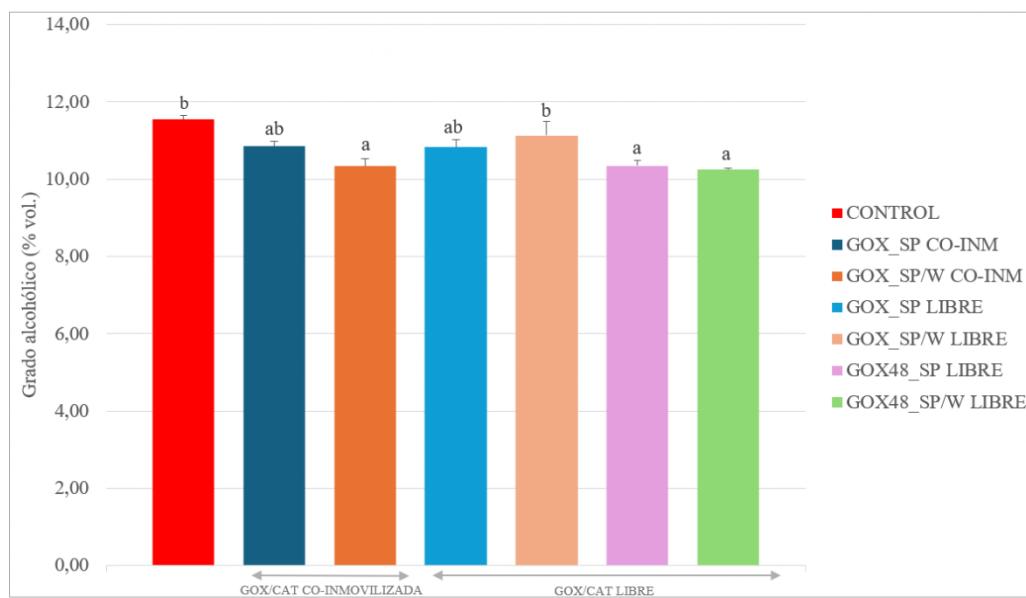


FIGURA 4.8 Determinación del grado alcohólico (% vol.) de los ensayos en T₁₆. Los ensayos *GOX48_SP I* y *GOX48_SP/W I* se retiraron del estudio por contaminación.

Debido a las contaminaciones en los ensayos con tratamiento de GOX/CAT co-inmovilizadas con inoculación posterior (*GOX48_SP* y *GOX48_SP/W I*), no se puede hacer una

comparativa real entre la inoculación posterior cuando el tratamiento de enzimas es co-inmovilizado o libre. Sin embargo, atendiendo a los resultados que se obtuvieron, se puede concluir que, cuando *Sp* se inocula de manera conjunta al tratamiento enzimático, es capaz de producir una cantidad significativamente menor de alcohol cuando el tratamiento enzimático se realiza con GOX/CAT en estado de co-inmovilización que cuando se encuentra en estado libre.

4.3.4. Acidez volátil

Aunque *S. pombe* se caracterice por presentar distintas ventajas en el proceso de vinificación, esta levadura es capaz de producir compuestos indeseados como el ácido acético, considerado tradicionalmente como el principal efecto secundario de su uso (Benito et al., 2018). Por ello, actualmente se están estudiando cepas seleccionadas de *S. pombe* capaces de producir cantidades inferiores a 1 g/L de ácido acético (Mulyono et al., 2022).

TABLA 4.7 Determinación de la acidez volátil (g/L ác. acético) de los ensayos en T₁₆.

Acidez volátil (g/L ác. acético)			
INOCULACIÓN	ENSAYO	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	0,12 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,04 ^{bc}
	GOX_SP/W	0,21 ± 0,06 ^{ab}	0,34 ± 0,00 ^c
POSTERIOR	GOX48_SP	0,28 ± 0,00 ^{bc}	-
	GOX48_SP/W	0,33 ± 0,03 ^c	-
CONTROL		0,31 ± 0,01 ^{bc}	

Sin embargo, tal y como se muestra en la Tabla 4.7, los valores de acidez volátil fueron bajos. De entre ellos, los más bajos fueron los de los ensayos inoculados con *Sp* de manera conjunta al tratamiento con GOX/CAT en estado libre, siendo GOX_SP L el único ensayo que mostró diferencias estadísticamente significativas con el ensayo control, terminando el estudio con unos valores de acidez volátil de 0,12 ± 0,01 g/L.

4.3.5. Color

Tras el análisis visual de los ensayos finales, se obtuvo un resultado de color como el mostrado en la Figura 4.9. A simple vista, no se observaron diferencias entre el color del ensayo control y el de los ensayos tratados con la enzima GOX y *S. pombe*. Estos resultados no coinciden con lo descrito en estudios previos, donde se informó que los vinos tratados con la

enzima GOX adquirieron un color amarillo/dorado más pronunciado que el control (Pickering et al., 1999).

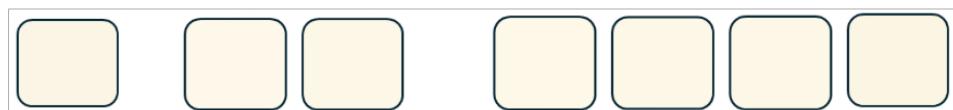


FIGURA 4.9 Resultado del color de los ensayos en vino final (T_{16}). De izquierda a derecha: control *W*; *GOX_SP I* y *GOX_SP/W I*; *GOX_SP L*, *GOX_SP/W L*, *GOX48_SP L* y *GOX48_SP/W L*.

Por último, se realizó la determinación del color de los diferentes ensayos en T_{16} , correspondiente al final de la fermentación y, según se indica en la Tabla 4.8, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de las coordenadas L^* , a^* y b^* entre distintos ensayos y el ensayo control. No obstante, no hubo diferencias significativas en la coordenada L^* entre el ensayo control y *GOX_SP L*, *GOX48_SP L*, *GOX48_SP/W L* y *GOX_SP/W I*. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en la coordenada a^* entre el ensayo control y los ensayos con tratamiento de enzimas co-inmovilizadas (*GOX_SP* y *GOX_SP/W I*) y en la coordenada b^* entre el ensayo control y los ensayos tratados con GOX/CAT co-inmovilizada y *GOX_SP/W L* y *GOX48_SP L*.

TABLA 4.8 Determinación de las coordenadas L^* , a^* y b^* de los ensayos a T_{16} .

INOCULACIÓN	ENSAYO	COLOR					
		L^*		a^*		b^*	
		L	I	L	I	L	I
CONJUNTA	GOX_SP	97,55 ± 0,07 ^{abc}	97,65 ± 0,21 ^{bc}	-1,25 ± 0,04 ^a	-0,71 ± 0,04 ^b	8,92 ± 0,51 ^c	7,23 ± 0,28 ^a
	GOX_SP/W	98,15 ± 0,07 ^c	97,25 ± 0,07 ^{abc}	-1,30 ± 0,13 ^a	-1,25 ± 0,02 ^b	8,67 ± 0,09 ^{bc}	8,92 ± 0,12 ^a
POSTERIOR	GOX48_SP	97,30 ± 0,14 ^{abc}	-	-1,14 ± 0,11 ^a	-	8,39 ± 0,38 ^{bc}	-
	GOX48_SP/W	96,80 ± 0,57 ^{ab}	-	-1,20 ± 0,13 ^a	-	9,16 ± 0,07 ^c	-
CONTROL		96,70 ± 0,00 ^a		- 0,71 ± 0,04 ^b		7,83 ± 0,05 ^{ab}	

5. CONCLUSIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Considerando que la mejor estrategia es aquella con la que se consigue reducir el grado alcohólico de manera considerable y con la menor concentración de ácido glucónico en el vino final, en este caso sería el ensayo *GOX_SP/W* con tratamiento de GOX/CAT co-inmovilizadas. Esta combinación consiguió reducir el grado alcohólico un 1,2%, obteniendo un vino con tan solo 0,88 g/L de ácido glucónico, y un pH de 3,26 y una acidez total de 5,9 g/L, valores apropiados para un vino blanco.

Además, según los resultados obtenidos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- Los mostos inoculados con *S. pombe* de manera conjunta al tratamiento enzimático con GOX/CAT en estado libre presentaron un mayor desarrollo microbiológico.
- El uso de la enzima CAT en estado libre permite un mayor consumo de H₂O₂ durante el proceso fermentativo, y es capaz de actuar en condiciones de elevada acidez.
- Cuando *Sp* se inocula de manera conjunta al tratamiento enzimático, junto con *WAM* en T₂, es capaz de producir una cantidad significativamente menor de alcohol cuando el tratamiento enzimático se realiza con GOX/CAT en estado de co-inmovilización que cuando se encuentra en estado libre.
- La presencia de GOX/CAT en estado libre ralentiza la velocidad de consumo de glucosa por parte de *S. pombe*.
- El mayor consumo de ácido glucónico se obtiene cuando *Sp* se inocula de manera conjunta al tratamiento enzimático con GOX/CAT y cuando la enzima se encuentra en estado de co-inmovilización.
- Cuando el complejo enzimático GOX/CAT se emplea en estado libre produce una mayor disminución de pH y mayor acidez total que en estado co-inmovilizado, y cuando *Sp* se inocula de manera posterior al tratamiento con GOX/CAT.

Estas estrategias biotecnológicas para la reducción del grado alcohólico constituyen una de las principales herramientas para mitigar los efectos del cambio climático en la vitivinicultura. Por ello, resulta de gran interés continuar investigando el uso de *S. pombe* y su combinación con las enzimas GOX y CAT, especialmente en la eliminación del H₂O₂ del medio ya que se ha visto que puede interferir en el desarrollo de las levaduras, con el objetivo de optimizar el proceso y evaluar su aplicación en diferentes variedades de uva y elaboraciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Afonso, S. M., Inês, A., & Vilela, A. (2024). Bio-dealcoholization of wines: can yeast make lighter wines? *Fermentation*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010036>
- 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
- Biyela, B. N. E., Du Toit, W. J., Divol, B., Malherbe, D. F., & Van Rensburg, P. (2009). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono ® 10.000 BG-treated grape juice. *South Africa Journal of Enology and Viticulture*, 30(2).
- 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). <https://doi.org/10.5344/ajev.2022.22001c>
- Coulter, A. D., Henschke, P. A., Simos, C. A., & Pretorius, I. S. (2008). When the heat is on, yeast fermentation runs out of puff. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 23, 26–30.
- del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernández, E., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023a). 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., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2023b). 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>
- 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, 119475. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.119475>
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Mulyono, R., Tania, V., Heryson, R., Felix, K. R., Rizqia, N., & Ratnasari, P. (2022). Comparative study between mixed culture of *Schizosaccharomyces pombe* with

- Saccharomyces* and single culture *Saccharomyces* on wine product: a systematic review. *Indonesian journal of life sciences*, 4(1).
- Loira, I., Morata, A., Palomero, F., González, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Schizosaccharomyces pombe*: A promising biotechnology for modulating wine composition. *Fermentation*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation4030070>
- Ough, C. S. (1975). Further investigations with glucose oxidase-catalase enzyme systems for use with wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 26(1), 31-36.
- 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.
- Peinado, R. A., Mauricio, J. C., Medina, M., & Moreno, J. J. (2004). Effect of *Schizosaccharomyces pombe* on aromatic compounds in dry sherry wines containing high levels of gluconic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(14), 4529–4534.
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1998). Optimising glucose conversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase. *Food Research International*, 31(10), 685-692. www.elsevier.com/locate/foodres
- Pickering, G. J., Pickering ~, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999). The production of reduced-alcohol wine using glucose oxidase treated juice. Part I. Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 291-298. <https://www.researchgate.net/publication/299165201>
- 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., Bustos, M. D., Ramos-Gómez, S., Palacios, D., Pilar-Izquierdo, M. C., & Ortega, N. (2018). Encapsulation of glucose oxidase in alginate hollow beads to reduce the fermentable sugars in simulated musts. *Food Bioscience*, 24, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.06.004>
- Schmidtke, L. M., Blackman, J. W., & Agboola, S. O. (2012). Production technologies for reduced alcoholic wines. *Journal of Food Science* 77(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02448.x>
- 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>