



---

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

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

Desarrollo de biocompuestos de  
alginato-sílice para reducir el ácido  
glucónico generado durante el  
tratamiento enzimático del mosto

CURSO 2024/2025

ALUMNA: ANA M<sup>a</sup> ORTEGA VELICIA

TUTORES: JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ NOGALES Y VIOLETA RUIPÉREZ PRÁDANOS

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>2. OBJETIVO</b>	5
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	5
3.1 MOSTO	5
3.2 ENZIMAS	6
3.3 PLAN DE TRABAJO	6
3.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO DE LAS BIOCÁPSULAS	6
3.3.2 EVALUACIÓN DE LA RETENCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (CAT)	8
3.3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAT	8
3.4 ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS EN EL MOSTO	8
3.4.1 CONTENIDO DE AZÚCARES Y ALCOHOL PROBABLE	8
3.4.3 CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES	9
3.4.4 ANÁLISIS DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9
3.4.5 ANÁLISIS DEL COLOR	9
3.4.6 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA	9
3.4.7 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO	10
3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA MATRIZ DE INMOVILIZACIÓN	10
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	10
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	10
4.1 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE GOX Y LA RETENCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO	10
4.2 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	13
4.3 EVALUACIÓN DE LA RETENCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CAT	16
4.4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS BIOCÁPSULAS	18
4.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LAS BIOCÁPSULAS	20
<b>5. CONCLUSIONES</b>	23
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	24

## RESUMEN

Este trabajo se centra en optimizar un tratamiento pre-fermentativo basado en la co-inmovilización de glucosa oxidasa (GOX) y catalasa (CAT) en biocápsulas de alginato-sílice para reducir la glucosa presente en el mosto y disminuir la acidificación excesiva generada por el ácido glucónico. Todo esto se ha llevado a cabo mediante un diseño experimental factorial variando las concentraciones de alginato (1,0 %, 1,5 % y 2,0 %) y las disoluciones de  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M, 0,2 M y 0,5 M) en el que se obtuvieron un total de 9 biocápsulas diferentes. Se determinó el consumo de glucosa, la cantidad de ácido glucónico en el mosto después del tratamiento, el ácido glucónico retenido, así como el porcentaje de CAT retenida. Posteriormente se evaluó la estructura interna de la biocápsulas y su composición elemental (C, O, Na, Si, Cl y Ca) por ESEM y EDS, utilizando siempre diagramas de Pareto y gráficos de efectos principales para identificar las condiciones óptimas. Los resultados indican que condiciones altas de alginato (2,0 %) y medias de  $\text{CaCl}_2$  (0,2-0,3 M) ofrecen una mejor relación entre actividad enzimática, retención de producto y eficiencia de encapsulación. Mientras que la caracterización estructural corrobora cómo una mayor densidad de red y rigidez de la matriz influyen en la porosidad de las biocápsulas, favoreciendo una mayor retención y limitando la difusión del ácido glucónico hacia el medio externo.

## ABSTRACT

This study focuses on developing and refining a co-immobilization system for glucose oxidase (GOX) and catalase (CAT) within alginate-silica capsules to pre-fermentatively reduce glucose in must while preventing excessive acidification from gluconic acid. A factorial experiment design was applied, varying alginate concentrations (1,0 %, 1,5 % y 2,0 %) and  $\text{CaCl}_2$  solutions (0,1 M, 0,2 M y 0,5 M) resulting in a total of nine different biocapsule formulations. Glucose consumption, gluconic acid concentration in the must after treatment, retained gluconic acid, and CAT retention percentage were determined. The internal structure of the biocapsules and their elemental composition (C, O, Na, Si, Cl y Ca) were subsequently analyzed by SEM-EDS and EDAX, using Pareto charts and main effects plots to identify optimal conditions. Results indicate that high alginate concentrations (2.0 %) combined with intermediate  $\text{CaCl}_2$  levels (0.2-0.3 M) provide the best balance between enzymatic activity, product retention, and encapsulation efficiency. Whereas structural characterization confirms that increased network density and matrix rigidity influence the porosity of the biocapsules, enhancing retention capacity and restricting the diffusion of gluconic acid into the external medium.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cambio climático está afectando de manera creciente y cada vez más profunda a la fenología de la vid y a la composición de la uva, lo que de manera consecuente afecta también a la microbiología y la química del vino, así como sus aspectos sensoriales. Entre los aspectos más importantes relacionados con el cambio climático se encuentran el adelanto de las fechas de vendimia, una mayor concentración de azúcar, una menor acidez y la modificación de los compuestos aromáticos fenólicos presentes en la uva. Estas alteraciones en la composición afectan no solo al grado alcohólico y la acidez del vino, sino también a su perfil aromático y color (De Orduña, 2010).

En relación con la fermentación alcohólica, la elevada concentración de azúcares en la uva produce una elevada presión osmótica sobre las levaduras, dificultando su proceso metabólico. Además, se produce una mayor cantidad de etanol, que, al ser un compuesto tóxico en altas concentraciones, puede impedir la finalización de la fermentación y provocar paradas fermentativas (Betlej et al., 2020).

Otro problema asociado a mostos con alto contenido en azúcar es la necesidad de un mayor aporte de nitrógeno asimilable para fermentar, por lo que el nitrógeno se convierte en un factor limitante pudiendo ocasionar fermentaciones lentas o interrumpidas. Asimismo, en este tipo de mostos se incrementan la producción de subproductos como el glicerol y el ácido acético, generados por las levaduras en respuesta al estrés osmótico. Otro de los procesos que se puede ver afectado es la fermentación maloláctica, ya que el etanol reduce la capacidad de las bacterias lácticas para crecer y sobrevivir cuando el contenido de alcohol es superior al 10 % (v/v) (Martínez et al., 2016).

Como último aspecto a destacar sobre el aumento del contenido alcohólico, cabe mencionar la carga fiscal sobre las bebidas alcohólicas. Aunque en España el vino está exento de impuestos especiales por su graduación, en otros países sí se aplica una tasa que varía en función del contenido alcohólico. Esto tendría un impacto negativo en las exportaciones a países en los que un mayor grado alcohólico aumenta los costes fiscales (Díaz-Delgado et al., 2016).

Los cambios en los patrones climáticos pueden amenazar la actividad económica del sector vitivinícola, afectando tanto a la agricultura como a la producción de vino especialmente en países mediterráneos como España, Francia e Italia. Esto destaca la importancia de proporcionar a los viticultores y productores herramientas que les permitan adaptarse a estos cambios y preservar la calidad e identidad de sus productos (Mozell y Thach, 2014).

En la actualidad se investigan múltiples estrategias en bodega durante las etapas de pre-fermentación, fermentación y post-fermentación, con el objetivo de reducir el contenido de azúcar en el mosto o el etanol en el vino procurando afectar lo menos posible su calidad organoléptica (Kumar et al., 2024; Akhtar et al., 2025; Chiarini et al., 2025).

Una de las alternativas biotecnológicas para reducir la concentración de glucosa antes de la fermentación y producir así vinos con menor graduación alcohólica es un tratamiento pre-fermentativo del mosto con la enzima glucosa oxidasa (GOX). La GOX

es una flavoproteína que cataliza la oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa a D-glucono- $\delta$ -lactona y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , usando  $\text{O}_2$  molecular como aceptor de electrones. La D-glucono- $\delta$ -lactona es hidrolizada químicamente a ácido glucónico, mientras que el cofactor flavina adenina dinucleótido (FAD) unido a la enzima es reducido a  $\text{FADH}_2$ . Posteriormente, el cofactor  $\text{FADH}_2$  se reoxida a FAD mediante el  $\text{O}_2$  presente, lo que genera  $\text{H}_2\text{O}_2$  como subproducto. Generalmente, la reacción enzimática de la GOX suele complementarse con la adición de la enzima catalasa (CAT), cuya función es descomponer el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado, que es altamente oxidante, en agua y  $\text{O}_2$ . Gracias a esta reacción acoplada, la GOX se utiliza ampliamente en procesos donde se requiere la eliminación controlada de glucosa o la producción de ácido glucónico (Bankar et al., 2009; Ozyilmaz, 2019).

Diversos estudios han abordado el uso de la GOX para reducir la concentración de glucosa en mosto de uva, permitiendo elaborar vinos con un menor contenido en etanol (Pickering et al., 1999a, 2001; Biyela et al., 2009; Röcker et al., 2016; Valencia et al., 2017). En mosto, se ha demostrado que el uso combinado de GOX con CAT mejora el consumo de glucosa (Biyela et al., 2009; Röcker et al., 2016; Valencia et al., 2017). Además, la actividad de la GOX depende de múltiples factores como el pH y la temperatura del mosto, el  $\text{O}_2$  disuelto en el mosto, la concentración de la enzima y la duración del tratamiento (Pickering et al., 1999a,b).

Aunque se ha demostrado que las enzimas libres GOX y CAT pueden reducir la concentración de D-glucosa en mostos, existen ciertos inconvenientes para su aplicación en condiciones reales de vinificación. El principal problema, es que se libera una gran cantidad de ácido glucónico, lo que baja excesivamente el pH del mosto. Esta caída del pH puede inactivar enzimas, alterar el equilibrio ácido-base de diversos compuestos y afectar al color y a el perfil sensorial del vino (Röcker et al., 2016).

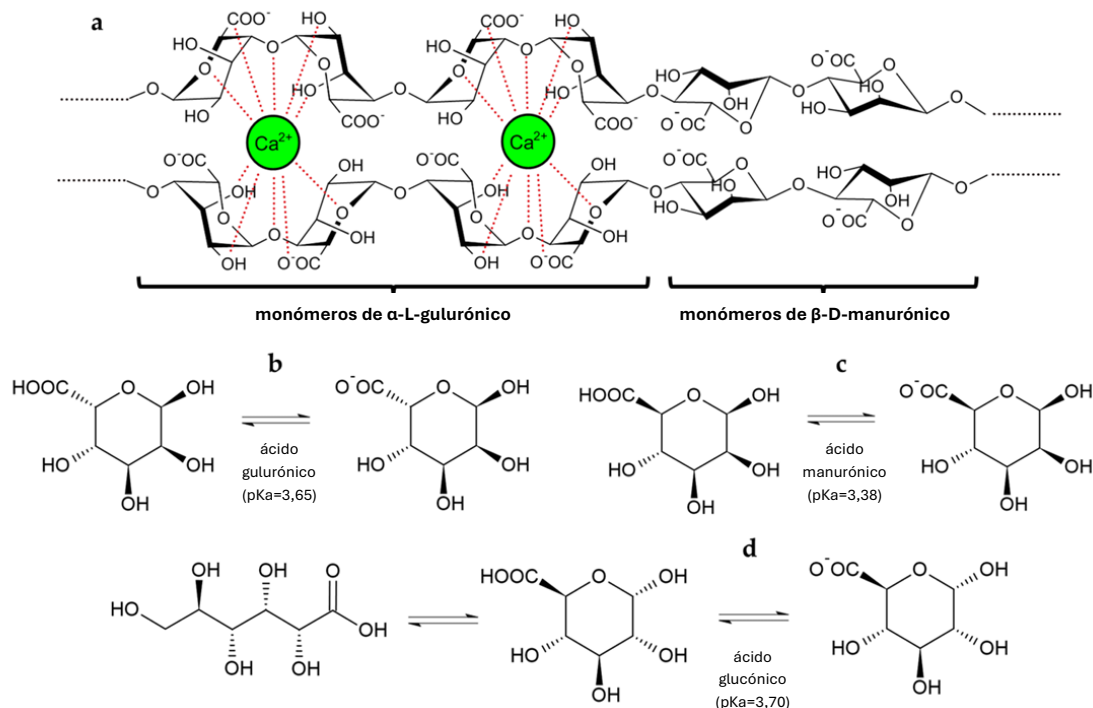
Recientemente el equipo de investigación ENOBIOTEC ha desarrollado un soporte de inmovilización basado en geles de alginato-sílice capaz de inmovilizar conjuntamente a las enzimas GOX y CAT (del-Bosque et al., 2023a), además de permitir la retención de hasta un 75 % del ácido glucónico generado por la enzima GOX. La estrategia empleada ha sido el atrapamiento, una de las técnicas más utilizadas en la inmovilización enzimática debido a su simplicidad, bajo costo y condiciones de trabajo suaves (del-Bosque et al., 2023b).

El alginato es uno de los polímeros más utilizados en esta técnica debido a su bajo costo, buenas características de manejo, biocompatibilidad, flexibilidad y elasticidad. Este polímero puede formar hidrogeles al reaccionar con iones calcio, permitiendo el atrapamiento de las enzimas. Sin embargo, este material presenta problemas de estabilidad química y baja resistencia mecánica. Con el objetivo de mejorar estas propiedades, se ha desarrollado un material híbrido mediante la incorporación de silicato de sodio y nanopartículas de sílice (LUDOX) a través de un proceso sol-gel que permite formar redes poliméricas resistentes, mejorando así la estabilidad química y mecánica, haciéndolo apto para procesos enológicos (del-Bosque et al., 2023a).

En esta matriz híbrida, se ha planteado la posible interacción del ácido glucónico con el alginato, dado que este ácido posee la capacidad de quelar iones  $\text{Ca}^{2+}$  presentes en la estructura del gel (Singh y Kumar, 2007) (Figura 1). Además, el ácido glucónico presenta

Desarrollo de biocompuestos de alginato-sílice para reducir el ácido glucónico generado durante el tratamiento enzimático del mosto.

un pKa y una configuración química muy similares a los de los ácidos manurónico y gulurónico, componentes del alginato (Wu et al., 2010; Ma et al., 2022).



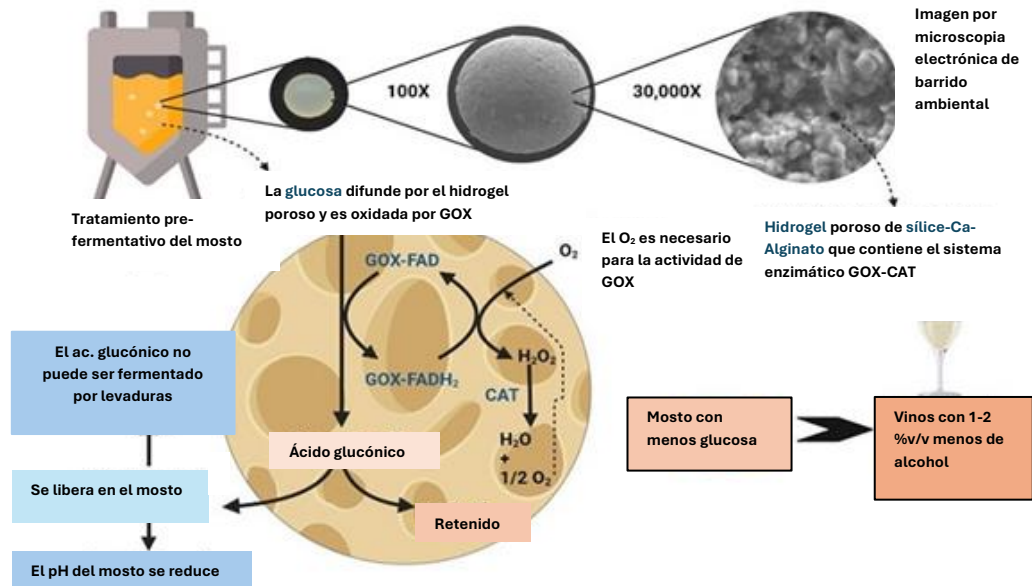
**Figura 1.** Fragmento de dos cadenas de la estructura polimérica del alginato, compuesto por monómeros de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico y  $\beta$ -D-manurónico, y sus interacciones con iones de calcio según el modelo “caja de huevo”. Proyecciones estereoquímicas y valores de pKa del ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (b) y del ácido  $\beta$ -D-manurónico (c), presentes en el alginato de sodio, así como del ácido glucónico (d) (Adaptado de del-Bosque et al., 2023b).

La matriz de inmovilización actúa como soporte protector para preservar la integridad de las enzimas frente a condiciones adversas de temperatura y pH, lo que permite ampliar su rango de actividad. Además, la co-inmovilización de GOX y CAT, al mantener ambas enzimas en proximidad, favorece la cinética de reacción, de modo que el peróxido de hidrógeno generado por GOX se encuentra cerca de la CAT, y el oxígeno liberado por esta última está inmediatamente disponible para GOX. Por otro lado, la encapsulación enzimática in situ impide la difusión de las enzimas al mosto, pero permite el paso de reactivos y productos. La actividad enzimática dependerá de la capacidad de los sustratos y productos para difundirse a través del hidrogel, del posible efecto de la acumulación interna de compuestos y del nivel de penetración de oxígeno necesario para el funcionamiento óptimo de la GOX (del-Bosque et al., 2023b).

Este TFM presenta un estudio orientado a optimizar el sistema de co-inmovilización de las enzimas GOX y CAT en cápsulas de sílice-alginato, con el objetivo de maximizar la retención de ácido glucónico generado por la actividad de GOX, permitiendo así una reducción significativa de la glucosa sin provocar una acidificación excesiva del mosto (Figura 2). Esto se llevó a cabo mediante la preparación de cápsulas con diferentes concentraciones de alginato de sodio (1,0 %, 1,5 % y 2,0 %) y  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M, 0,2 M y 0,5 M). Esta estrategia, permite un control total sobre el tiempo de reacción, ya que las

Desarrollo de biocompuestos de alginato-sílice para reducir el ácido glucónico generado durante el tratamiento enzimático del mosto.

cápsulas pueden introducirse o retirarse del mosto según se requiera. Además, se evaluó el efecto de ambos parámetros sobre la estructura de la matriz de inmovilización y su capacidad de retención de las enzimas.



**Figura 2.** Reducción del contenido de glucosa en mostos tratados con las enzimas GOX-CAT inmovilizadas (Adaptado de del-Bosque et al., 2023b).

## 2. OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es optimizar el diseño de las biocápsulas de alginato-sílice para maximizar la retención del ácido glucónico generado por la oxidación enzimática de la glucosa en mosto.

Además, se plantea como objetivo secundario analizar la capacidad de las biocápsulas para retener de forma eficiente las enzimas, así como estudiar su estructura interna.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 MOSTO

El mosto empleado en los distintos ensayos proviene de la variedad Verdejo, perteneciente a la Denominación de Origen Rueda. La composición básica del mosto se encuentra recogida en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Caracterización del mosto inicial.

Parámetros	Mosto
Grado Brix (°)	21,0 ± 0,00
GAP (% vol.)	12,11 ± 0,00
pH	3,72 ± 0,01
IPT	6,87 ± 0,02
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ND
Parámetros de color (CIELab)	{L*=83,60 ± 0,14 ; a*= -0,05 ± 0,00; b*=21,56 ± 0,04}

Los datos representan la media de las réplicas ± la desviación estándar (SD). GAP= Grado alcohólico probable; ND= No detectado.

### 3.2 ENZIMAS

El tratamiento enzimático del mosto se realizó con los preparados enzimáticos comerciales Gluzyme Mono 10.000 BG (10.000 U/g), como fuente de GOX y Catazyme 25 L (25.000 U/g), como fuente de CAT, ambos obtenidos a partir de *Aspergillus niger*. Estos preparados enzimáticos fueron suministrados por Novozyme®, (Bagsvaerd, Dinamarca) y han sido previamente validados por el equipo ENOBIOTEC en mosto de la variedad Verdejo (del-Bosque et al., 2023a,b).

### 3.3 PLAN DE TRABAJO

La co-inmovilización de las enzimas se llevó a cabo mediante atrapamiento en una red polimérica interpenetrada (IPN), empleando derivados de sílice, alginato de sodio y Ca<sup>2+</sup> como agentes estructurales (Coradin y Livage, 2003).

#### 3.3.1 OPTIMIZACIÓN DEL DISEÑO DE LAS BIOCÁPSULAS

Para el diseño y optimización de las biocápsulas, se siguió un protocolo validado de coinmovilización de las enzimas GOX y CAT en una matriz híbrida de alginato-sílice (del-Bosque et al., 2023a,b). Se optimizaron las concentraciones de alginato de sodio y CaCl<sub>2</sub> con el objetivo de maximizar la retención de ácido glucónico en las biocápsulas formadas. Para ello, se empleó un diseño de superficie de respuesta, en concreto, un diseño factorial de 3 niveles (3<sup>2</sup>) que permite evaluar la interacción entre dos factores experimentales (concentraciones de alginato de sodio y de CaCl<sub>2</sub>) a tres concentraciones diferentes (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentraciones de alginato de sodio y CaCl<sub>2</sub> estudiadas.

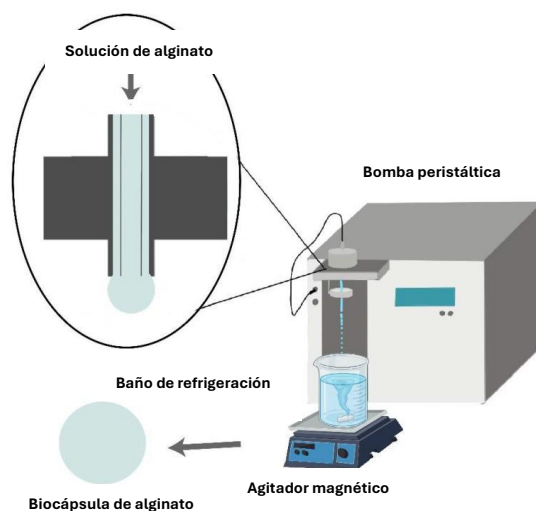
Alginato de sodio (%)	CaCl <sub>2</sub> (M)
1,0	0,1
1,5	0,3
2,0	0,5



Este diseño factorial implicó un total de 12 ejecuciones experimentales, realizadas por duplicado, incluyendo 3 puntos centrales para evaluar la reproducibilidad y curvatura de la respuesta.

La concentración enzimática empleada para la coinmovilización fue de 30 U/mL tanto para la GOX como para la CAT. La enzima GOX se preparó disolviendo 0,54 g del preparado enzimático (Gluzyme Mono 10000 BG) en 18 mL de tampón citrato 0,1 M a pH 6,5, agitando a 225 rpm durante 30 minutos a 30 °C, y posteriormente centrifugando a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante resultante fue utilizado como extracto enzimático. Por su parte, la CAT (Catzyme 25 L) se añadió directamente a la mezcla final en un volumen de 72 µL.

La formulación total para 60 mL de mezcla contenía 0,294 mL de silicato de sodio 6,13 M, 4,43 g de silicato coloidal, 6 mL de la solución de GOX, 0,072 mL de la solución de CAT y una cantidad variable de alginato de sodio (0,6 g para la concentración del 1,0 % (p/v), 0,9 g para el 1,5 % y 1,2 g para el 2,0 %), completando con agua desionizada ajustada a pH 6,6. La mezcla se extruyó mediante una bomba peristáltica a un flujo de 13,6 mL/min (BQ80S, Lead Fluid, Baoding, China) con tres sondas de silicona (diámetro interno de 2,0 mm) sobre 150 mL de soluciones diferentes de cloruro de calcio, con concentraciones de 0,1 M, 0,3 M y 0,5 M, desde una altura de 20 cm para favorecer la formación de las biocápsulas esféricas (Figura 3). El proceso de gelificación y endurecimiento se completó tras 1 hora en agitación orbital a 150 rpm (Orbital Shaker SO1, Stuart Scientific, Stone, Reino Unido) en cada una de las condiciones. Posteriormente, las perlas se mantuvieron a 8 °C durante 24 horas, tras lo cual fueron filtradas, lavadas con 50 mL de agua destilada y secadas sobre papel de laboratorio antes de ser empleadas en el tratamiento del mosto.



**Figura 3.** Síntesis de biocápsulas mediante extrusión controlada por bomba peristáltica (Adaptación de Bennacef et al., 2023).

El tratamiento enzimático del mosto con las distintas formulaciones de biocápsulas alginato-sílice se llevó a cabo en un total de 12 tubos Falcon, cada uno por duplicado, junto con dos muestras control también por duplicado. En cada experimento se utilizaron aproximadamente 0,6 g de biocápsulas, en un volumen de 10 mL de mosto. Las

muestras control se prepararon sin añadir biocápsulas. Todas las muestras se mantuvieron en agitación orbital a 150 rpm durante 48 horas a 15 °C.

Tras el tratamiento del mosto, se evaluó la concentración de glucosa y el ácido glucónico, el pH, el IPT, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los parámetros de color del mosto. Estos indicadores permitieron determinar la eficiencia del sistema enzimático inmovilizado GOX-CAT dentro del hidrogel poroso de alginato-sílice en la conversión de glucosa en ácido glucónico, así como su impacto en otros parámetros de la composición del mosto.

### 3.3.2 EVALUACIÓN DE LA RETENCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (CAT)

La capacidad de retención de la actividad de CAT en las cápsulas se evaluó determinando la actividad de la enzima en la solución de Ca<sup>2+</sup> tras 24 horas de endurecimiento de las biocápsulas y en sus aguas de lavado, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.2.1.

El porcentaje de retención de CAT se calculó mediante la siguiente ecuación (1).

$$\% \text{ Retención CAT} = 100 - \left( \frac{UCAT_{\text{aguas}} + UCAT_{Ca^{2+}}}{UCAT_{\text{Cápsulas}}} \times 100 \right) \quad (1)$$

Donde:

- $UCAT_{\text{Aguas}}$ : Actividad catalasa detectada en el agua de los lavados.
- $UCAT_{Ca^{2+}}$ : Actividad catalasa detectada en las soluciones de CaCl<sub>2</sub>.
- $UCAT_{\text{Cápsulas}}$ : Actividad catalasa empleada en el proceso de co-inmovilización.

#### 3.3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CAT

La actividad CAT se determinó midiendo la descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la reacción enzimática. Para ello, se incubaron 10 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,05 %, v/v) en tampón fosfato (0,07 M, pH 7,0) con 345 µL de la solución de CAT durante 2 min a 25°C en agitación orbital (150 rpm). La concentración inicial y final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fueron medidas a una absorbancia de 240 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, España) (Del Bosque et al., 2023a).

## 3.4 ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS EN EL MOSTO

Todas las mediciones de las muestras se realizaron por duplicado. Los resultados se presentan como la media aritmética de ambas mediciones, acompañada de su correspondiente desviación estándar.

### 3.4.1 CONTENIDO DE AZÚCARES Y ALCOHOL PROBABLE

La concentración de azúcares en el mosto se estimó mediante un refractómetro (ATC-1, Atago, Tokyo, Japón), que determina el índice de refracción de la muestra. A partir de esta medida en °Brix, se calculó el contenido de alcohol probable usando la fórmula empírica (2) (García et al., 2000).

$$\text{GAP} = (0.6757 \times \text{°Brix a } 20 \text{ °C}) - 2.0839 \quad (2)$$

#### 3.4.2 pH

Para evaluar el pH y la acidez total del mosto, se utilizó un pH-metro (Sension™ + HACH LANGE®, Barcelona, España). Este instrumento mide la diferencia de potencial eléctrico entre dos electrodos (uno de referencia y otro sensible al pH), una relación que se explica mediante la ecuación de Nernst (OIV, 2009).

#### 3.4.3 CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

El contenido total de compuestos polifenólicos se cuantificó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, España). Esta longitud de onda coincide con el máximo de absorción de los anillos aromáticos presentes en los polifenoles (Carretero, 2017).

#### 3.4.4 ANÁLISIS DE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el mosto se determinó mediante un kit comercial de tiras reactivas de lectura rápida (QUANTOFIX™ Peroxide 100, Macherey-Nagel, Alemania), diseñado para la detección semicuantitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.4.5 ANÁLISIS DEL COLOR

El color del mosto se caracterizó usando el sistema CIELab, el cual define un espacio tridimensional mediante las coordenadas L\* (luminosidad), a\* (rojo/verde) y b\* (azul/amarillo).

Para calcular los valores, se midieron las absorbancias del mosto 450, 520, 570 y 630 nm mediante espectrofotometría (Genesys™ 150 Vis/UV-Vis, Thermo Fisher, Madrid, España). Posteriormente, las coordenadas cromáticas se calcularon utilizando el software MSCV® desarrollado por la Universidad de la Rioja.

#### 3.4.6 DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

La cuantificación de D-glucosa se realizó utilizando el kit enzimático D-Fructosa/D-Glucosa (Megazyme, Wicklow, Irlanda).

El procedimiento se fundamenta en una serie de reacciones enzimáticas, en primer lugar, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) mediante la acción de una hexoquinasa, con la conversión simultánea de ATP a ADP. A continuación, el G-6-P es oxidado por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en presencia de NADP<sup>+</sup>, generando gluconato-6-fosfato y NADPH.

La producción de NADPH es directamente proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra y se cuantifica midiendo la absorbancia a 340 nm con un espectrofotómetro de microplaca (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, Denver, EE. UU.) del Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) del Campus de Palencia (Universidad de Valladolid, UVa).

### 3.4.7 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO

La concentración de ácido glucónico se determinó utilizando el kit enzimático D-Gluconic acid/D-Glucono- $\delta$ -lactona (Megazyme, Wicklow, Irlanda). Este método se basa en una reacción enzimática específica en la que el ácido glucónico es oxidado por la enzima gluconato deshidrogenasa, en presencia de la coenzima NAD<sup>+</sup>, generando NADH como producto.

La formación de NADH es directamente proporcional a la cantidad de ácido glucónico presente en la muestra y se cuantifica mediante la medición de la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro de microplaca (Multiskan™ GO, Thermo Scientific, Denver, EE. UU.) del LTI del Campus de Palencia (UVa).

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA MATRIZ DE INMOVILIZACIÓN

La estructura interna de las biocápsulas se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM Quanta™ 200 FEG, FEI Company, Hillsboro, EE. UU.). Además, la composición elemental se ha confirmado mediante espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), ambos análisis realizados en la Unidad de Microscopía del LTI de la UVA.

### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El diseño de los experimentos y el tratamiento estadístico de los datos se ha llevado a cabo utilizando el Software Statgraphics Centurion, versión 19.2.01 (Rockville, EE. UU.).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados de este trabajo organizados en dos bloques principales.

### 4.1 INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE INMOVILIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD DE GOX Y LA RETENCIÓN DE ÁCIDO GLUCÓNICO

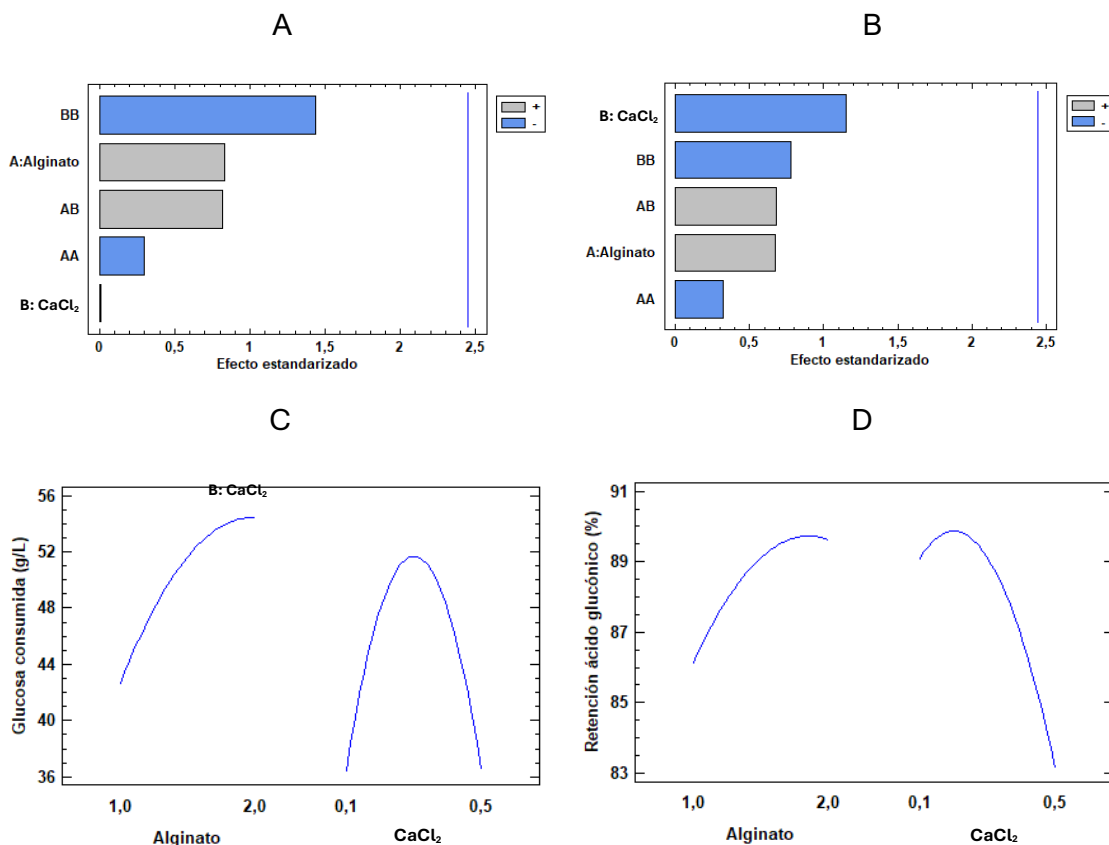
El primer experimento, se centra en evaluar el efecto de diferentes concentraciones de alginato y CaCl<sub>2</sub> sobre dos parámetros fundamentales, el consumo de glucosa y la retención de ácido glucónico. El primero se utiliza como parámetro indirecto para estimar la actividad enzimática de la GOX y el segundo, permite evaluar la eficacia de las biocápsulas para retener el producto generado durante la reacción.

En la tabla 3 se presentan los valores obtenidos tras el análisis, respectivos al consumo de glucosa y la concentración de ácido glucónico (g/L), así como el porcentaje de retención de ácido glucónico presente en las biocápsulas (%).

**Tabla 3.** Datos del consumo de glucosa y de la concentración y retención de ácido glucónico (g/L) y su correspondiente retención de ácido glucónico (%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Tipo cápsula (% de alginato y M de CaCl <sub>2</sub> )	Glucosa consumida (g/L)	Ácido glucónico mosto (g/L)	Ácido glucónico retenido (g/L)	Ácido glucónico retenido (%)
1,0 %-0,1 M	35,48 $\pm$ 2,06	3,84 $\pm$ 0,38	34,79 $\pm$ 1,86	90,07 $\pm$ 0,41
1,0 %-0,3 M	35,48 $\pm$ 5,81	3,52 $\pm$ 0,83	35,11 $\pm$ 9,82	79,24 $\pm$ 3,10
1,0 %-0,5 M	26,54 $\pm$ 8,27	3,86 $\pm$ 0,38	25,04 $\pm$ 9,51	83,09 $\pm$ 0,32
1,5 %-0,1 M	27,50 $\pm$ 2,60	3,99 $\pm$ 0,9	25,95 $\pm$ 2,92	86,61 $\pm$ 1,57
1,5 %-0,3 M	64,83 $\pm$ 0,00	5,04 $\pm$ 0,00	59,79 $\pm$ 0,00	92,23 $\pm$ 0,00
1,5 %-0,3 M	71,15 $\pm$ 0,00	4,77 $\pm$ 0,00	72,70 $\pm$ 0,00	93,84 $\pm$ 0,00
1,5 %-0,3 M	53,47 $\pm$ 0,00	5,04 $\pm$ 0,00	48,43 $\pm$ 0,00	90,57 $\pm$ 0,00
1,5 %-0,3 M	45,34 $\pm$ 0,00	4,27 $\pm$ 0,00	45,10 $\pm$ 0,00	91,35 $\pm$ 0,00
1,5 %-0,5 M	17,31 $\pm$ 1,18	4,87 $\pm$ 0,04	13,98 $\pm$ 1,32	74,11 $\pm$ 1,95
2,0 %-0,1 M	39,97 $\pm$ 3,27	5,14 $\pm$ 0,35	38,37 $\pm$ 3,92	88,11 $\pm$ 1,79
2,0 %-0,3 M	33,50 $\pm$ 3,58	4,96 $\pm$ 0,28	31,52 $\pm$ 5,07	85,01 $\pm$ 6,85
2,0 %-0,5 M	59,33 $\pm$ 3,54	5,88 $\pm$ 0,62	58,72 $\pm$ 3,73	89,70 $\pm$ 4,52

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó un diseño de experimentos factorial completo 3<sup>2</sup>, lo que ha permitido estudiar tanto los efectos principales como sus posibles interacciones. Las gráficas obtenidas (Figura 4) muestran el efecto de cada tratamiento sobre las variables de interés, facilitando la identificación de las condiciones que favorecen un mayor consumo de glucosa por la enzima GOX y una retención más eficiente de ácido glucónico.



**Figura 4.** Diagrama de Pareto del efecto estandarizado (A) y gráfico de efectos principales (C) para el consumo de glucosa con el sistema GOX-CAT inmovilizado en los diferentes tipos de cápsulas. Diagrama de Pareto del efecto estandarizado (B) y gráfico de efectos principales (D) para el porcentaje de retención de ácido glucónico en con el sistema GOX-CAT inmovilizado en los diferentes tipos de cápsulas. El alginato está expresado en % y el  $\text{CaCl}_2$  en M.

Como muestran los diagramas de Pareto (Figura 4A y 4B), a pesar de que los efectos principales y sus interacciones no son estadísticamente significativas, sí pueden identificarse ciertas tendencias relevantes entre los tratamientos.

Respecto a el consumo de glucosa, la concentración de alginato presenta un efecto positivo, al igual que para la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , si bien este último con un efecto muy pequeño (Figura 4A). De este modo, una mayor concentración de alginato en la matriz de inmovilización mejora el consumo de glucosa por la GOX en unos 12 g/L (Figura 4C). Estos datos sugieren que una mayor densidad de reticulación en la biocápsula, por una mayor concentración de alginato, podría mejorar la eficiencia enzimática, al proteger la estructura activa de la GOX y facilitar la difusión del sustrato hacia el interior de la matriz (Labus et al., 2020). Por otro lado, el factor cuadrático del  $\text{CaCl}_2$  tiene un efecto estimado alto, lo que indica un comportamiento no lineal, con un consumo máximo de glucosa a concentraciones intermedias de  $\text{CaCl}_2$ . Es posible que el aumento inicial en la concentración de este reactivo reticulante favorezca la formación de una matriz de inmovilización más densa, mejorando así la actividad de GOX. Sin embargo, a concentraciones más altas, la actividad enzimática podría disminuir, posiblemente por una menor difusión del sustrato hacia el centro de la cápsula (McEntee et al., 2008).

La gráfica 4B analiza los mismos factores (alginato,  $\text{CaCl}_2$  y sus respectivas interacciones) sobre el porcentaje de retención del ácido glucónico, el principal producto de la oxidación de la glucosa catalizada por la GOX. Como se observa, en este caso el factor que más influye es la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , evidenciándose una disminución de la retención de ácido glucónico a concentraciones elevadas de este compuesto. Esto podría ser debido a que altas concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  producen una gelificación rápida y heterogénea, lo que genera microcanales en la matriz. Estos canales facilitan la difusión y pérdida de compuestos solubles como el ácido glucónico (Chan et al., 2005). En cambio, al aumentar la concentración de alginato, se plantea la formación de una red polimérica con mayor capacidad de interacción química con el ácido glucónico, lo que se podría traducir en un incremento de su retención (Colin et al., 2024). Esto es esencial para evitar la pérdida de ácido glucónico y su liberación al mosto. Cabe destacar que la alta retención del ácido glucónico está en consonancia con los resultados obtenidos por Del-Bosque et al. (2023b), quienes también observaron una eficacia elevada en la contención del producto dentro de la biocápsula. Estos autores postulan además que la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  podría favorecer la retención del ácido glucónico por formación de complejos con la red de alginato, lo cual ya ha sido sugerido en estudios previos (George & Abraham, 2006; Bouzouaid et al., 2021) y podría explicar la baja liberación del producto observada. A ello, se suman posibles efectos de la estructura de gel sobre la difusión del ácido glucónico, que pueden verse alterados en función del grado de reticulación, ya que una mayor compactación reduce la velocidad de difusión (Coradin y Livage, 2003; Del-Bosque et al., 2023b).

En relación con los efectos principales del consumo de glucosa y la retención de ácido glucónico, representados en las gráficas 4C y 4D respectivamente, se observa en la gráfica C un comportamiento parabólico que sugiere la existencia de concentraciones óptimas de  $\text{CaCl}_2$  que favorecen la actividad enzimática del sistema GOX-CAT. En ambas gráficas se identifica un valor máximo de respuesta cuando se utilizan concentraciones altas de alginato y concentraciones medias de  $\text{CaCl}_2$  aproximadamente de 2,0 % y 0,3 M respectivamente, lo que indica que bajo estas condiciones la biocápsula alcanza un equilibrio estructural que permite una actividad enzimática eficiente y una adecuada retención del producto. Por debajo de estos niveles, la biocápsula puede resultar demasiado débil para mantener la integridad del sistema inmovilizado, mientras que, a concentraciones superiores la red formada puede ser excesivamente compacta, lo que dificulta la difusión de glucosa hacia el interior (Geethanjali & Subash, 2013). Esto refleja que la eficiencia del sistema enzimático no solo está relacionada con la presencia de la enzima, sino también con las características físicas de la estructura de la biocápsula y su interacción con los productos generados, como es el caso del ácido glucónico y su retención dentro del sistema.

## 4.2 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

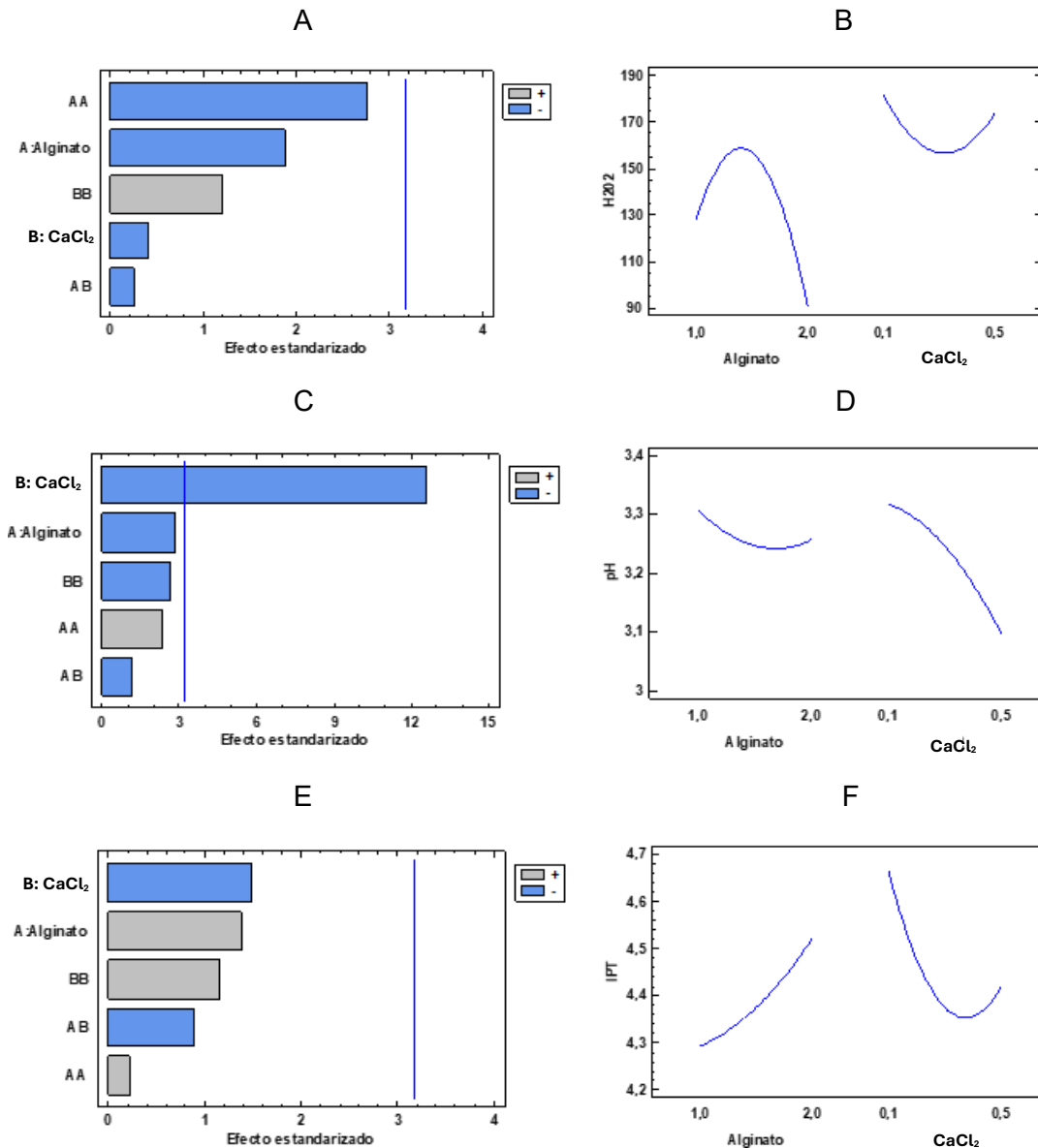
Para valorar el impacto de las biocápsulas sobre el mosto, se analizaron parámetros fisicoquímicos clave como es la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el pH y el contenido de IPT (Figura 5). Estos indicadores permiten relacionar la actividad de CAT y GOX, la estructura de las biocápsulas y la posible interacción de los compuestos fenólicos con la matriz, aportando una visión integral de los efectos del alginato y del  $\text{CaCl}_2$  en el sistema.

En la tabla 4 se muestran los valores de  $H_2O_2$ , pH, e IPT de los mostos después de las 48 horas de tratamiento enzimático con las 9 biocápsulas preparadas con diferentes concentraciones de alginato y  $CaCl_2$ .

**Tabla 4.** Datos de la concentración de  $H_2O_2$  (mg/L), pH e IPT de los mostos tratados enzimáticamente con los distintos tipos de cápsulas. Los valores se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Tipo cápsula (% de alginato y M de $CaCl_2$ )	$H_2O_2$ (mg/L)	pH	IPT ( $A_{280\text{ nm}}$ )
Control	0,00 $\pm$ 0,00	3,72 $\pm$ 0,01	6,87 $\pm$ 0,02
1,0 %-0,1 M	150,00 $\pm$ 0,00	3,38 $\pm$ 0,02	4,49 $\pm$ 0,01
1,0 %-0,3 M	112,50 $\pm$ 17,68	3,29 $\pm$ 0,02	4,29 $\pm$ 0,04
1,0 %-0,5 M	162,50 $\pm$ 17,68	3,17 $\pm$ 0,01	4,43 $\pm$ 0,05
1,5 %-0,1 M	200,00 $\pm$ 0,00	3,30 $\pm$ 0,01	4,57 $\pm$ 0,05
1,5 %-0,3 M	150,00 $\pm$ 0,00	3,25 $\pm$ 0,01	4,58 $\pm$ 0,04
1,5 %-0,5 M	162,50 $\pm$ 17,68	3,11 $\pm$ 0,04	4,31 $\pm$ 0,14
2,0 %-0,1 M	100,00 $\pm$ 0,00	3,34 $\pm$ 0,01	5,00 $\pm$ 0,83
2,0 %-0,3 M	112,50 $\pm$ 17,68	3,27 $\pm$ 0,01	4,32 $\pm$ 0,12
2,0 %-0,5 M	100,00 $\pm$ 0,00	3,08 $\pm$ 0,04	4,58 $\pm$ 0,12





**Figura 5.** Diagrama de Pareto del efecto estandarizado (A) y gráfico de efectos principales (B) sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diagrama de Pareto del efecto estandarizado (C) y gráfico de efectos principales (D) para el pH y diagrama de Pareto del efecto estandarizado (E) y gráfico de efectos principales (F) para los IPT en los diferentes tipos de cápsulas respectivamente. El alginato está expresado en % y el CaCl<sub>2</sub> en M.

En primer lugar, como se puede ver en el gráfico de Pareto 5A, estadísticamente no hay efecto significativo de la concentración de alginato y de CaCl<sub>2</sub> sobre la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aunque sí tienen cierto efecto sobre ella. En el gráfico de efectos principales 5B, se observa una tendencia a valores más bajos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cuando aumentan las concentraciones de alginato. Este comportamiento puede explicarse por la mayor retención de CAT, ya que, al aumentar la concentración de alginato aumenta la densidad de entrecruzamiento en la red polimérica lo que favorece la retención de CAT dentro de la cápsula. Una mayor cantidad de CAT disponible implica mayor descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua y oxígeno, lo que contribuye a la tendencia descendente observada en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kornecki et al., 2020).

Como se observa en el gráfico de Pareto 5C, el único efecto que supera el umbral de significación es la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , lo que se confirma con el gráfico de efectos principales 5D. Ya que al incrementar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 0,1 M a 0,5 M el pH descende de forma clara, mientras que el efecto del alginato es más débil, con pequeñas variaciones y un mínimo alrededor de 1,5 %. Esta tendencia puede deberse a la formación de ácido glucónico por acción de la GOX, ya que la oxidación de la glucosa genera glucono- $\delta$ -lactona que se hidroliza a ácido glucónico liberando  $\text{H}^+$ , lo que reduce el pH (Bauer et al., 2022). A mayores concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  la red iónica  $\text{Ca}^{2+}$ -alginato es más densa y rígida lo que facilita la conversión de glucosa a ácido glucónico y favorece la difusión del ácido hacia el mosto, permitiendo que el descenso de pH sea medible (Golmohamadi & Wilkinson, 2013).

El diagrama de Pareto 5E indica que ninguno de los factores supera el umbral de significación estadística con respecto a los IPT, lo que significa que variaciones en la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  no alteran la capacidad de retención de compuestos fenólicos ni la extracción/liberación de polifenoles totales (Toprakci et al., 2025). El gráfico de efectos principales 5F refuerza esta conclusión, ya que no hay una tendencia clara ni un patrón definido. Sin embargo, al comparar el mosto inicial con los mostos tratados con biocápsulas, se aprecia una reducción general de los niveles de IPT. Esto se podría explicar mediante interacciones fisicoquímicas de retención. Algunas moléculas fenólicas establecen enlaces de hidrógeno e interacciones iónicas con los grupos carboxilato del alginato, quedando “atrapadas” en la red antes de que puedan liberarse completamente al medio, disminuyendo significativamente los IPT en el mosto tratado (Machado et al., 2022). Los compuestos fenólicos presentan variada polaridad, peso molecular y capacidad de formar enlaces hidrógeno o interacciones moleculares, lo que podría explicar por qué algunos quedan retenidos en la estructura y otros difunden libremente, manteniendo valores de IPT relativamente estables (Corkovic et al., 2021).

#### 4.3 EVALUACIÓN DE LA RETENCIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CAT

Para evaluar la retención de actividad enzimática, se optó por emplear la CAT como enzima modelo. Esta elección se justifica por varias razones, en primer lugar, tanto la CAT como la GOX presentan un tamaño molecular comparable (240 kDa frente a 160 kDa respectivamente) (Bhatti et al., 2006; Pakhomova et al., 2009), lo que resulta relevante dado que el mecanismo de inmovilización utilizado se basa en el atrapamiento físico en los poros de un gel. Dado que este mecanismo depende en gran medida del tamaño de las moléculas, utilizar una enzima de dimensiones similares permite obtener resultados representativos.

Por otro lado, la determinación de la actividad enzimática de la CAT es considerablemente más sencilla y directa que en el caso de la GOX, lo que permite llevar a cabo mediciones más rápidas, con menos interferencias y mayor reproducibilidad. Por ello, se consideró adecuado utilizar la CAT en esta fase del estudio, con el objetivo de valorar de forma fiable el grado de retención de la enzima tras el proceso de inmovilización.

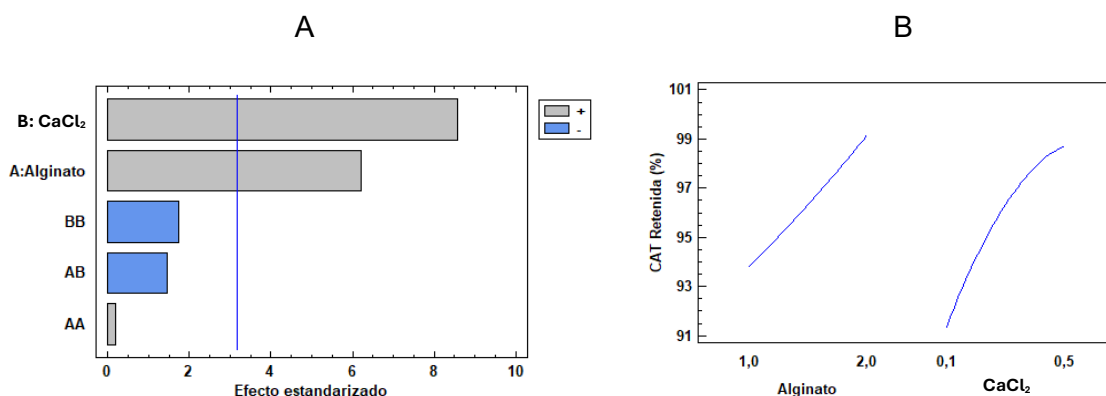
En la tabla 5 se presentan los valores de actividad de CAT medidos tanto en las disoluciones de  $\text{CaCl}_2$  como en las aguas de lavado de las biocápsulas, expresadas en

unidades (U), junto con el porcentaje de retención correspondiente para cada condición de encapsulación (%).

**Tabla 5.** Datos de la actividad CAT en las disoluciones de  $\text{CaCl}_2$  y en las aguas de lavado de las biocápsulas expresadas en unidades (U), según las condiciones de encapsulación y su respectiva retención en porcentaje (%). Los valores se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Muestra (% de alginato y M de $\text{CaCl}_2$ )	Actividad CAT $\text{Ca}^{2+}$ (U)	Actividad CAT aguas de lavado (U)	Retención CAT (%)
1,0 %-0,1 M	36,32 $\pm$ 0,21	31,68 $\pm$ 0,25	88,67 $\pm$ 0,08
1,0 %-0,3 M	22,90 $\pm$ 0,18	1,81 $\pm$ 0,24	93,22 $\pm$ 0,05
1,0 %-0,5 M	13,52 $\pm$ 0,13	4,92 $\pm$ 0,13	96,93 $\pm$ 0,02
1,5 %-0,1 M	47,83 $\pm$ 0,41	7,75 $\pm$ 0,21	90,70 $\pm$ 0,07
1,5 %-0,3 M	13,37 $\pm$ 0,20	9,74 $\pm$ 0,17	96,15 $\pm$ 0,03
1,5 %-0,5 M	0,00 $\pm$ 0,15	2,16 $\pm$ 0,00	99,64 $\pm$ 0,00
2,0 %-0,1 M	30,63 $\pm$ 0,26	0,00 $\pm$ 0,00	94,90 $\pm$ 0,04
2,0 %-0,3 M	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00
2,0 %-0,5 M	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	100,00 $\pm$ 0,00

Para evaluar el comportamiento del sistema de inmovilización de CAT, se cuantificó la actividad de CAT retenida en el interior de las distintas biocápsulas. Esto se realizó mediante el análisis de la actividad residual de sus respectivas aguas de lavado y sus soluciones de gelificación, obteniendo un gráfico de Pareto y uno de efectos principales (Figura 6) que permiten identificar cuáles son los factores experimentales que influyen de manera más significativa.



**Figura 6.** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (A) y gráfico de los efectos principales (B) para el porcentaje de retención de CAT en las cápsulas de alginato-sílice. El alginato está expresado en % y el  $\text{CaCl}_2$  en M.

El diagrama de Pareto para la retención de CAT (A) muestra que ambos efectos principales (concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$ ) son positivos y estadísticamente significativos. Entre ellos, la concentración de  $\text{CaCl}_2$  tiene un mayor efecto seguido de la concentración de alginato, que tiene un efecto menor, mientras que las interacciones cruzadas y los términos cuadráticos quedan por debajo del umbral de significación. Esto podría indicar que, a medida que aumentan las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y alginato, la

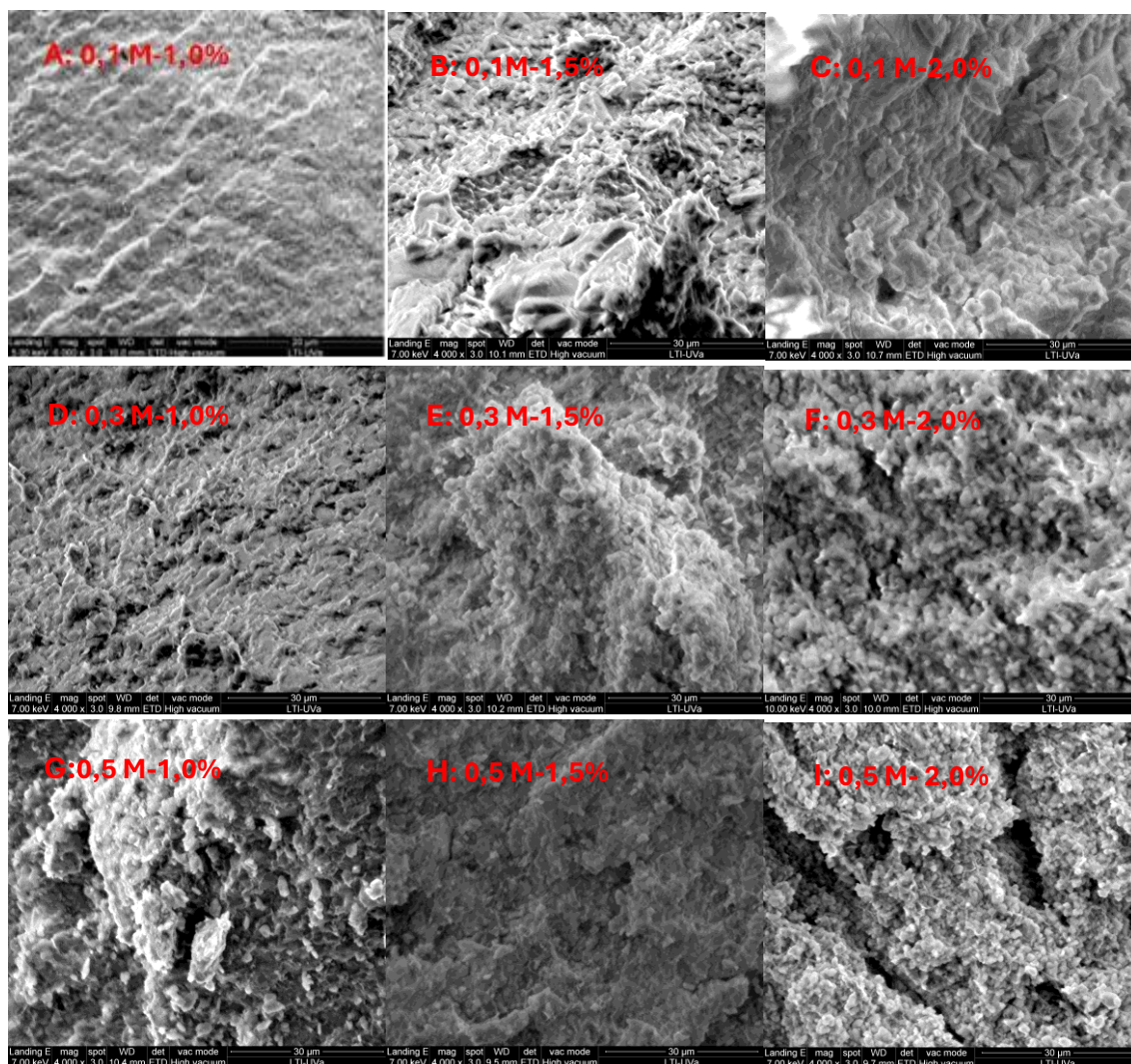
red del gel se vuelve más densa y compacta, con tamaños de poro menores, lo que favorece un mayor atrapamiento de la enzima en el interior de las cápsulas (Costa et al., 2024). Además, es posible que se establezcan interacciones iónicas entre los grupos cargados del soporte y la enzima, así como enlaces de tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y carbonilo del gel con determinados aminoácidos de la enzima (Zhang et al., 2024).

En el gráfico de efectos principales (B), al incrementar la concentración de alginato de 1 % a 2 %, la curva muestra un aumento casi proporcional a la retención, reduciéndose consecuentemente la fuga de CAT a las disoluciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y durante los lavados. Bennacef et al. (2023) señalan que concentraciones bajas de alginato generan geles con gran tamaño de poro y alta pérdida de enzima, mientras que elevar el alginato hasta un 2 %-3 % compacta la red lo suficiente como para mejorar la retención sin impedir la difusión de sustrato. A su vez, podemos observar que al aumentar las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de 0,1 M a 0,5 M aumenta también la retención de CAT, esto puede deberse a que se incrementa el llenado de las celdas tipo “egg-box” y con ello la densidad de los puentes iónicos entre el  $\text{Ca}^{2+}$  y el alginato, al tiempo que se potencia la red de puentes de hidrógeno adyacentes, reforzando la estructura del hidrogel y, por tanto, su capacidad para retener moléculas como la CAT (Makarova et al., 2023).

Para los intervalos de alginato y  $\text{CaCl}_2$  seleccionados, se identificó un máximo local al 2% de alginato y al 0,5 M de  $\text{CaCl}_2$ , indicando los puntos en los que la retención de la actividad de CAT es óptima. Por otra parte, el efecto la interacción alginato- $\text{CaCl}_2$  (AB) no es significativa, lo que sugiere que ambos reactivos aportan su beneficio de forma independiente, aumentando ambos la retención de CAT al aumentar su concentración.

#### 4.4 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS BIOCÁPSULAS

Para entender cómo afectan las condiciones de inmovilización a la estructura interna de las diferentes biocápsulas, se realizó un análisis estructural utilizando técnicas de microscopia electrónica de barrido ambiental, herramienta que permite visualizar la superficie del material sin alterar significativamente su estado original (Figura 7).



**Figura 7.** Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) que muestran las superficies internas de las biocápsulas seccionadas. Cada imagen representa una formulación distinta, variando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y alginato: A)  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y 1 % de alginato; B)  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y 1,5 % alginato; C)  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y 2 % alginato; D)  $\text{CaCl}_2$  0,3 M y 1 % alginato; E)  $\text{CaCl}_2$  0,3 M y 1,5 % alginato; F)  $\text{CaCl}_2$  0,3 M y 2 % alginato; G)  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 1 % alginato; H)  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 1,5 % alginato e I)  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 2 % alginato. Todas las micrografías fueron tomadas con un aumento x 4000, excepto la micrografía A, que se obtuvo a x 6000.

En estas 9 micrografías se puede observar cómo varía la morfología superficial de las biocápsulas al modificar las concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$ . En las micrografías 7A, 7B y 7C, que tienen la concentración de  $\text{CaCl}_2$  más baja (0,1 M), se aprecia como al aumentar la concentración de alginato de 1% a 2% se produce una progresiva compactación y organización de la estructura. Las redes poliméricas resultantes son más densas y rígidas ya que a mayor cantidad de alginato, como en la micrografía 7C, la estructura interna se vuelve más densa, en comparación con la estructura más laxa y heterogénea observada en la micrografía 7A (Letocha et al., 2022).

Sin embargo, cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es baja como en las micrografías 7A y 7B, no todo el polímero logra reticularse por completo, lo que da lugar a una red de gel menos compacta y con una estructura interna más heterogénea, en contraste con lo observado en las micrografías 7H y 7I donde hay un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  (Girón-Hernández

et al., 2021). Varios estudios han observado que al aumentar la concentración de alginato puede aumentar la porosidad aparente de a microesfera, probablemente porque la matriz polimérica más espesa genera vacíos más grandes entre cadenas (Lei et al., 2008; Wan et al., 2008).

Por el contrario, en las micrografías 7G, 7H y 7I que tienen la concentración de  $\text{CaCl}_2$  más alta (0,5 M), el  $\text{Ca}^{2+}$  en exceso reticula prácticamente todo el alginato disponible, produciendo una red muy compacta y menos porosa. Al aumentar el alginato de 1 % a 2 %, se añade más polímero a la estructura, reforzando el gel resultante, siendo el efecto principal un incremento de rigidez mecánica (Letocha et al., 2022). Diversos estudios coinciden en que concentraciones altas de  $\text{Ca}^{2+}$  provocan una estructura comprimida con menor porosidad interna. Wan et al. (2008) observaron que al cuadruplicar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , la porosidad de un gel con alginato se reduce notablemente debido al aumento de la densidad de reticulación y al aumentar la cantidad de enlaces iónicos formados. Es decir, a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  las microesferas son muy rígidas y compactas y conforme aumentan las concentraciones de alginato, se reforzará la rigidez, pero ya no cambiará la porosidad (Wan et al., 2008; Letocha et al., 2022).

#### 4.5 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE LAS BIOCÁPSULAS

Para verificar la incorporación de alginato y  $\text{Ca}^{2+}$  en la estructura de las biocápsulas, se realizó un análisis elemental mediante espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS) de su zona interna, lo que permitió conformar la presencia y distribución de elementos clave como: C, O, Na, Si, Cl y Ca en la red de atrapamiento (Figura 8) (Rimal et al., 2024).

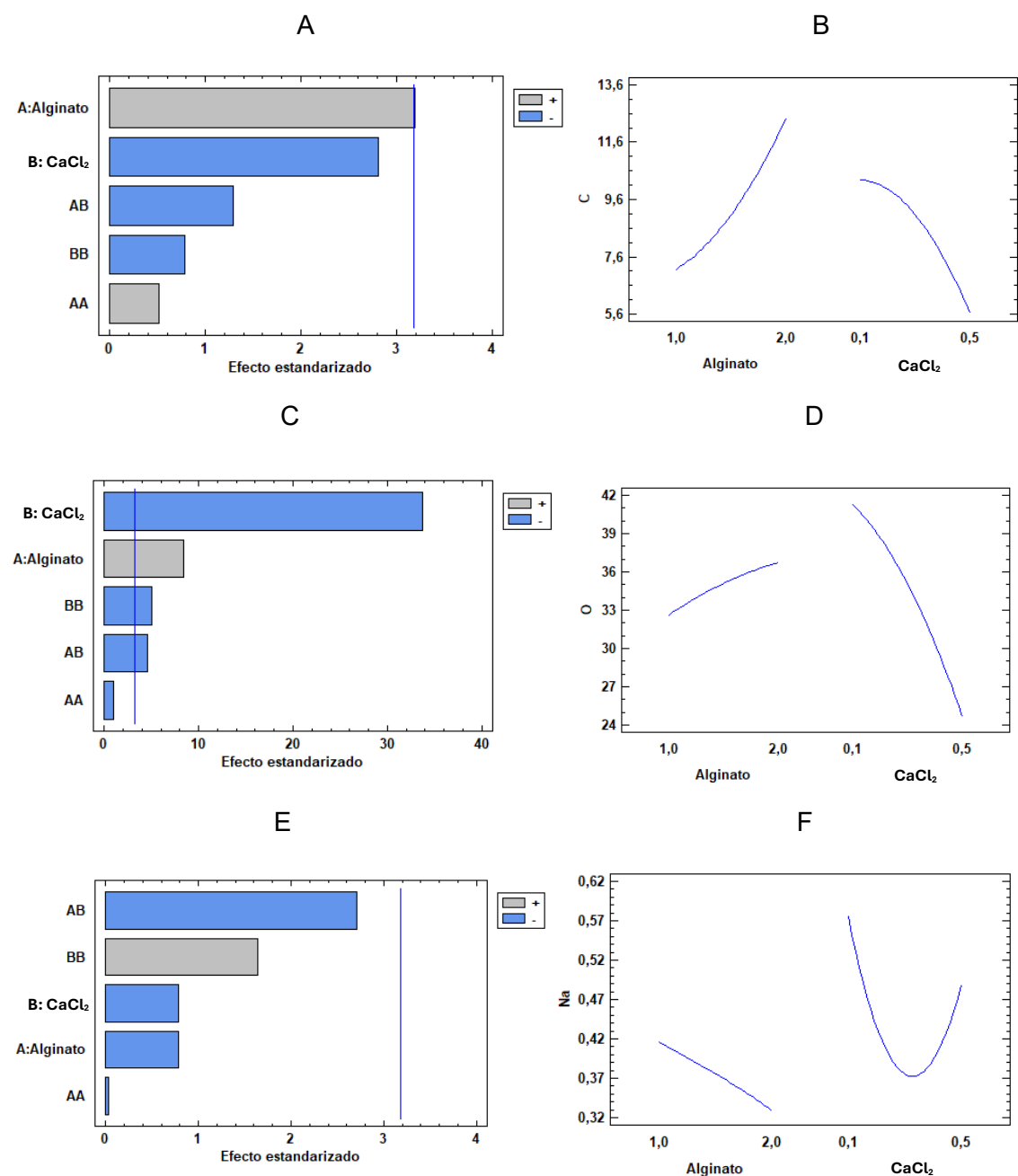
En la tabla 6 se presentan los valores correspondientes a la composición de carbono (C), oxígeno (O), sodio (Na), silicio (Si), cloro (Cl) y calcio (Ca), expresados en porcentaje (%), obtenidos para las distintas biocápsulas en función de las concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$  empleadas durante el proceso de encapsulación.

**Tabla 6.** Valores de la composición elemental de C, O, Na, Si, Cl y Ca en porcentaje (%) en función de la concentración de alginato y  $\text{CaCl}_2$  de las biocápsulas.

Muestra (% de alginato y M de $\text{CaCl}_2$ )	C (%)	O (%)	Na (%)	Si (%)	Cl (%)	Ca (%)
1,0 %-0,1 M	6,87	37,18	0,44	39,88	7,81	7,81
1,0 %-0,3 M	12,01	41,66	0,66	33,4	5,8	6,47
1,0 %-0,5 M	13,45	44,13	0,62	27,34	7,44	7,03
1,5 %-0,1 M	6,42	32,51	0,31	33,6	15,22	11,94
1,5 %-0,3 M	7,88	35,41	0,39	31,32	14,66	10,34
1,5 %-0,3 M	14,4	36,54	0,42	21,77	15,56	11,32
1,5 %-0,3 M	5,95	23,82	0,81	24,91	27,35	17,16
1,5 %-0,3 M	5,1	23,93	0,39	27,33	16,2	17,02
1,5 %-0,5 M	7,29	25,27	0,26	27,46	23,22	16,5

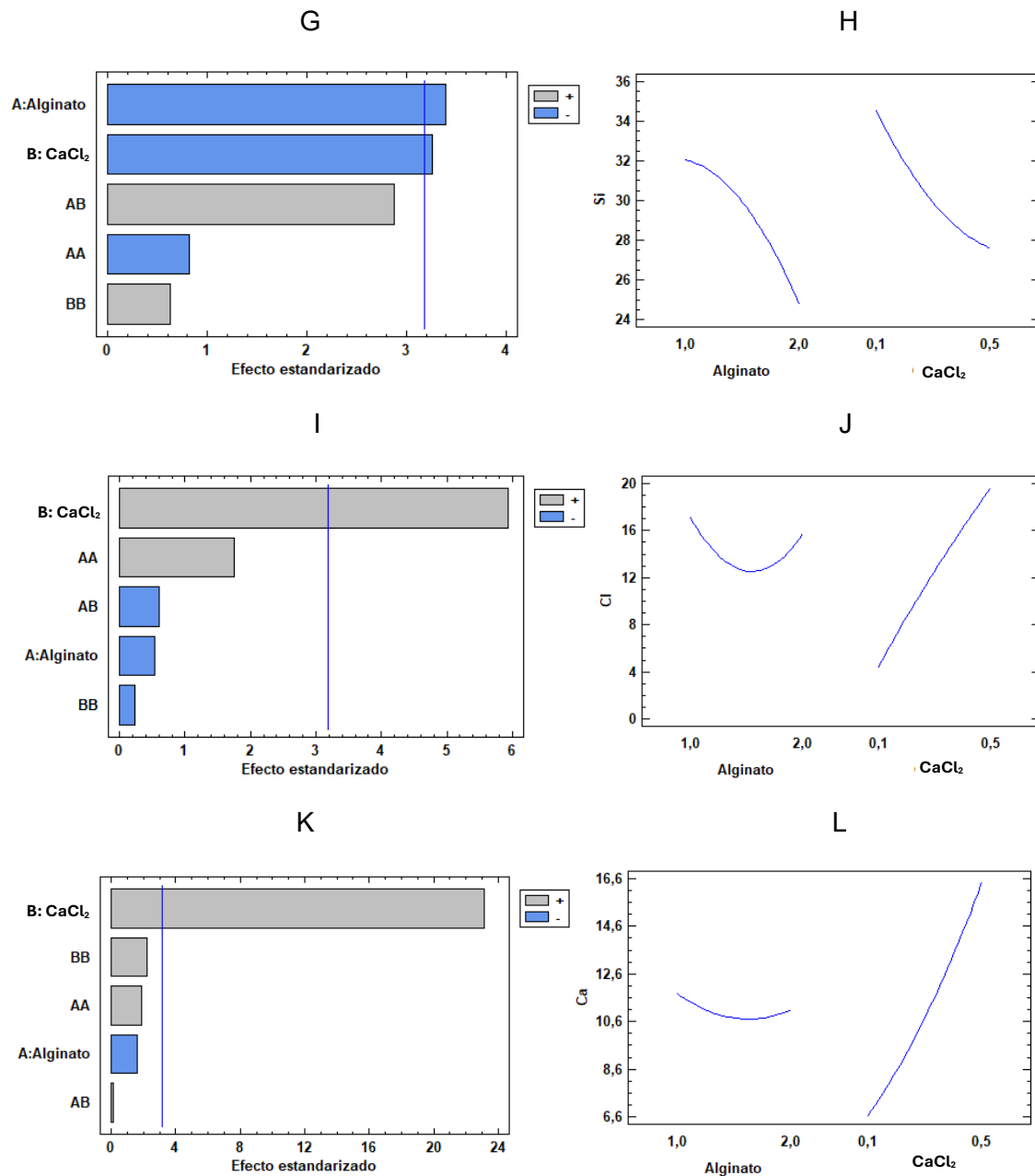


Desarrollo de biocompuestos de alginato-sílice para reducir el ácido glucónico generado durante el tratamiento enzimático del mosto.



**Figura 8.** Gráficos de Pareto (A, C y E) y de efectos principales (B, D y F) de la composición elemental de C, O y Na de las biocápsulas respectivamente.

Desarrollo de biocompuestos de alginato-sílice para reducir el ácido glucónico generado durante el tratamiento enzimático del mosto.



**Figura 9.** Gráficos de Pareto (G, I y K) y de efectos principales (H, J y L) de la composición elemental de Si, Cl y Ca de las biocápsulas respectivamente.

En las figuras 8 y 9 se observa que, al aumentar la concentración de alginato, incrementan significativamente los porcentajes de C y O, mientras que los de Si disminuyen significativamente. Esto es coherente con el hecho de que el alginato de sodio aporta fundamentalmente C y O en su estructura ( $C_6H_7O_6Na$ ), y un mayor contenido de polímero incrementa la fracción orgánica del gel a costa de la red de sílice, (la cuál es la principal fuente de Si en estos sistemas y por tanto disminuiría) (Jin et al., 2024). Por el contrario, los cambios observados en el Na, Cl y Ca no resultan estadísticamente significativos al variar el porcentaje de alginato, puesto que estos elementos dependen más del agente reticulante (Da silva et al., 2018). En relación con



el  $\text{CaCl}_2$ , un incremento de este compuesto en la solución de entrecruzamiento provoca un incremento de Ca y Cl en el interior de las cápsulas. Esto es lógico, dada la incorporación de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cápsula debido al entrecruzamiento con el alginato en los “puentes iónicos” y a una posible retención del anión  $\text{Cl}^-$  asociado (Augst et al., 2006).

Por otro lado, se observa que al aumentar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  disminuye significativamente el porcentaje de Si, probablemente relacionado con un incremento de alginato entrecruzado con  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que disminuye la componente inorgánica del gel y por lo tanto disminuye a su vez el porcentaje de Si. También, se observa un descenso significativo en el porcentaje de O al incrementarse la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , que podría deberse de la misma manera a un descenso del componente inorgánico, ya que la sílice tiene enlaces tipo O-Si-O, a pesar de que a mayores concentraciones de alginato se observe un incremento del O por la composición propia de este polímero (se incrementa la componente orgánica) (Lee & Mooney, 2011).

## 5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación sugieren que la composición de la matriz de inmovilización, en particular las concentraciones de alginato y  $\text{CaCl}_2$ , podrían influir en el rendimiento del sistema enzimático GOX-CAT y en la retención del ácido glucónico. Estos efectos no fueron estadísticamente significativos, por lo que deben considerarse con cautela.

Se observó una tendencia creciente del consumo de glucosa al aumentar la concentración de alginato del 1 % al 2 %. En el caso del  $\text{CaCl}_2$  la tendencia no fue lineal, ya que alcanzó un mayor consumo a concentraciones intermedias (0,3 M).

Respecto a la retención del ácido glucónico, el  $\text{CaCl}_2$  mostró una tendencia a disminuir ese parámetro al elevar su concentración del 0,1 M al 0,5 M. A su vez, la concentración de alginato pareció tener un efecto positivo leve, mejorando ligeramente la retención del ácido.

El aumento de alginato tiende a reducir la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , coherente con una mayor retención de catalasa y actividad de GOX. En el caso del pH, se observó una reducción significativa principalmente asociada a la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , lo que puede estar relacionado con la formación de ácido glucónico y la liberación de protones. Por último, los IPT mostraron un ligero descenso en comparación con el mosto sin tratar, lo que podría estar relacionado con la retención de compuestos fenólicos en la estructura de las biocápsulas.

En el caso de la CAT los ensayos mostraron porcentajes elevados de retención superiores al 90 % en la mayoría de los tratamientos. Al incrementar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  y en menor medida la de alginato, se observó un aumento progresivo en el porcentaje de enzima retenida dentro de las biocápsulas.

La caracterización estructural por microscopia ESEM respalda estas observaciones, ya que las matrices diseñadas con un mayor contenido de  $\text{CaCl}_2$  y alginato presentan estructuras más densas y compactas, asociadas a una mejor retención, aunque un

exceso podría limitar la difusión del sustrato. El análisis por EDS permitió verificar la incorporación de alginato y Ca en la estructura de la biocápsulas.

De cara al futuro, sería interesante profundizar en el estudio de la difusión de los sustratos y productos de las enzimas en el interior de las biocápsulas, así como en la retención de la enzima GOX. Además, resultaría útil investigar la resistencia mecánica y la estabilidad de las biocápsulas frente a diferentes condiciones ambientales, como variaciones de pH, temperatura o agitación. Finalmente, se podría seguir investigando en la aplicación de este sistema de biocápsulas a distintos tipos mostos con diferentes características fisicoquímicas. Estas líneas podrían aportar una comprensión de la viabilidad técnica y funcional del sistema encapsulado en aplicaciones biotecnológicas e industriales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular bioscience*, 6(8), 623-633. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600069>

Akhtar, W., Ceci, A. T., Longo, E., Marconi, M. A., Lonardi, F., & Boselli, E. (2025). Dealcoholized wine: techniques, sensory impacts, stability, and perspectives of a growing industry. *Comprehensive Reviews in Food Science And Food Safety*, 24 (3). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.70171>

Bhatti, H. N., Madeeha, M., Asgher., & Batool, N. (2006). Purification and thermodynamic characterization of glucose oxidase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(6), 519-524. <https://doi.org/10.1139/w05-158>

Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase. An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489-501. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003>

Biyela, B., Du Toit, W., Divol, B., Malhere, D., F., & Van Rensburg, P. (2016). The production of reduced-alcohol wines using Gluzyme Mono® 10.000 BG-treated grape juice. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30, 124-132. <https://doi.org/10.21548/30-2-1432>

Betlej, G., Bator, E., Oklejewicz, B., Potocki, L., Górka, A., Slowik-Borowiec, M., Czarny, W., Domka, W., & Kwiatkowska, A. (2020). Long-term adaption to high osmotic stress as a tool for improving enological characteristics in industrial wine yeast. *Genes*, 11(5), 567. <https://doi.org/10.3390/genes11050576>

Bouzouaid, L., Lothenbach, B., Fernandez-Martinez, A., & Labbez, C. (2021). Portlandite solubility and Ca<sup>2+</sup> activity in presence of gluconate and hexitols. *Cement and Concrete Research*, 149, 106563. <https://doi.org/10.1016/j.cemconres.2021.106563>

Bauer, J. A., Zámocká, M., Majtán, J., & Bauerová-Hlinková, V. (2022). Glucose oxidase, an enzyme “Ferrari”: its structure, function, production and properties in the light of various industrial and biotechnological applications. *Biomolecules*, 12(3), 472. <https://doi.org/10.3390/biom12030472>

- Bennacef, C., Desobry, S., Jasniewski, J., Leclerc, S., Probst, L., & Desobry-Banon, S. (2023a). Influence of alginate properties and calcium chloride concentration on alginate bead reticulation and size: a phenomenological approach. *Polymers*, 15(20), 4163. <https://doi.org/10.3390/polym15204163>
- Coradin, T. & Livage, J. (2003). Synthesis and characterization of alginate/silica biocomposites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26, 1165-1168. <https://doi.org/10.1023/A:1020787514512>
- Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. (2005). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.033>
- Corkovic, I., Pichler, A., Simunovic, J., & Kopjar, M. (2021). Hydrogels: characteristics and applications as delivery systems of phenolic and aroma compounds. *Foods*, 10(6), 1252. <https://doi.org/10.3390/foods10061252>
- Colin, C., Akpo, E., Perrin, A., Cornu, D., & Cambedouzou, J. (2024). Encapsulation in alginates hydrogels and controlled release: an overview. *Molecules*, 29(11), 2515. <https://doi.org/10.3390/molecules29112515>
- Costa, J. B., Nascimento, L. G. L., Martins, E., & De Carvalho, A. F. (2024). Immobilization of the  $\alpha$ -galactosidase enzyme by encapsulation in polymeric matrices for application in the dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 107(11), 9100-9109. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24892>
- Chiarini, M., Calabrese, F. M., Canfora, I., De Boni, A., Tricarino, G., & De Angelis, M. (2025): Exploring the multifaced potential of dealcoholized wine: a focus on techniques, legislation compliances, and microbiological aspects. *Food Reviews International*, 1-33. <https://doi.org/10.1080/87559129.2025.2503473>
- Da Silva, R., De Moura, M. R., Glenn, G. M., & Aouada, F. A. (2018). Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  alginate/clay nanocomposite hydrogel beads. *Journal of Molecular Liquids*, 265, 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.005>
- De Orduña, R. M. (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>
- Díaz-Delgado, E. L., González, M. A., & Fellingner, E. (2016). La demanda regional de bebidas alcohólicas en España. Impacto de un incremento de los impuestos especiales. *Economía Agraria y Recursos Naturales*, 3(1), 123. <https://doi.org/10.7201/earn.2003.01.06>
- Del-Bosque, D., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., Fernández-Fernandez, 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-Fernandez, E., & Rodríguez-Nogales J. M. (2023b). Entrapment of glucose oxidase and catalase in silica-calcium-

alginate hydrogel reduces of gluconic acid in must. *Gels*, 9(8), 622. <https://doi.org/10.3390/gels9080622>

García, J., Xirau, M., & Azorín, R. (2000). Técnicas usuales de análisis en enología. *Panreac*, 1-64.

Golmohamadi, M., & Wilkinson, K. J. (2013). Diffusion of ions in a calcium alginate hidrogel-structure is the primary factor controlling difusión. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 82-87. <https://doi.org/10.3390/foods10061252>

George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. *Journal of Controlled Release*, 114(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.017>

Geethanjali, S., & Subash, A. (2013). Optimization and immobilization of puried Labeo Rohita visceral protease by entrapment method. *Enzyme Research*, 2013, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2013/874050>

Jin, Q., Diao, X., Fan, Y., Hao, L., Chen, Z., & Guo, Z. (2024). Silica-reinforced AMP-calcium alginate beads for efficient and selective removal of cesium from a strong acidic medium. *ACS Omega*, 9(29), 32011-32020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c03806>

Kornecki, J. F., Carballares, D., Tardioli, P. W., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Enzyme production of d-gluconic acid and glucose oxidase: successful tales cascade reactions. *Catalysis Science & Tecnology*, 10(7), 5740-5771. <https://doi.org/10.1039/d0cy00819b>

Kumar, Y., Cassano, A., Conici, C., Gottardi, D., Ricci, A., Parpinello, G. P., & Versari, A. (2024). White wine dealcoholization by osmotic distillation: an experimental study and impact on key quality parameters. *Journal of Food Engineering*, 112456. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2024.112456>.

Lei, J., Kim, J., & Jeon, Y. S. (2008). Preparation and properties of alginate/polyaspartate composite hydrogels. *Macromolecular Research*, 16(1), 45-50. <https://doi.org/10.1007/bf03218959>

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2011). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Labus, K., Wolanin., & Radosinski, L. (2020). Comparative study on enzyme immobilization using natural hydrogel matrices-experimental studies supported by molecular models analysis. *Catalysts*, 10(5), 489. <https://doi.org/10.3390/catal10050489>

Letocha, A., Miastkowka, M., & Sikora, E. (2022). Preparation and characteristics os alginate microparticles for food, pharmaceutical and cosmetic applications. *Polymers*, 14(18), 3834. <https://doi.org/10.3390/polym14183834>

McEntee, M., Bhatia, S., Tao, L., Roberts, S., & Bhatia, S. (2007).Tunable transport of glucose through ionically-crosslinked alginate gels: effect of alginate and calcium concentration. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(5), 2956-2962. <https://doi.org/10.1002/APP.27478>

- Mozell, M. R., & Thach, L. (2014). The impact of climate change on the global wine industry: Challenges & solutions. *Wine Economics and Policy*, 3(2), 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.wep.2014.08.001>
- Martínez, A., Tudó, A. J. L., & Aleixandre, J. L. (2016). Efectos de los fenómenos producidos por el cambio climático sobre la calidad de los vinos. *Enovicultura*, nº 42, 4-26.
- Machado, A. R., Silva, P. M. P., Vicente, A. A., Souza-Soares, L. A., Pinheiro, A. C., & Cerqueira, M. A. (2022). Alginate particles for encapsulation of phenolic extract from *Spirulina* sp. LEB-18: physicochemical characterization and assessment of in vitro gastrointestinal behavior. *Polymers*, 14(21), 4759. <https://doi.org/10.3390/polym14214759>
- Makarova, A. O., Derkach, S. R., Khair, T., Kazantseva, M. A., Zuev, Y. F., & Zueva, O. S. (2023). Ion-induced polysaccharide gelation: peculiarities of alginate egg-box association with different divalent cations. *Polymers*, 15(5), 1243. <https://doi.org/10.3390/polym15051243>
- Naeimipour, S., Boroojeni, F. R., Selegard, R., & Aili, D. (2022). Enzymatically triggered deprotection and cross-linking of thiolated alginated-based bioinks. *Chemistry of Materials*, 34(21), 9536-9545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c02037>
- OIV. (2009). *Determination of pH Type I method OIV-MA-BS-13*. 1-7.
- Ozyilmaz, G. (2019). Glucose oxidase applications and comparison of the activity assays. Review article. *Natural and Engineering Sciences*, 4(3), 253-367. <https://doi.org/10.28978/nesciences.646213>
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999a). The production of reduced-alcohol wine using Glucose Oxidase-treated Juice. Part III. Sensory. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(3), 291-298. <https://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.3.307>
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (1999b). 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://doi.org/10.5344/ajev.1999.50.3.291>
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A., & Barnes, M. F. (2001). GC-MS analysis of reduced-alcohol Müller-Thurgau wine produced using glucose oxidase-treated juice. *LWT-Food Science and Technology*, 34, 89-94. <https://doi.org/10.1006/fstl.2000.0744>
- Pakhomova, S., Gao, B., Boeglin, W. E., Brash, A. R., & Newcomer, M. E. (2009). The structure and peroxidase activity of a 33-kDa catalase-related protein from *Mycoacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *Protein Science*, 18(12), 2559-2568. <https://doi.org/10.1002/pro.265>
- 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>

Rimal, B., Chang, J. D., Liu, C., Kim, H., Aderotoye, O., Zechmann, B., & Kim, S. J. (2024). Scanning electron microscopy and energy-dispersive x-ray spectroscopy of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *ACS Omega*, 9(36), 37610-37620. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c01168>

Toprakci, G., Toprakci, İ., & Sahin, S. (2025). Alginate microbeads for trapping phenolic antioxidants in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): multivariate optimization based on bioactive properties and morphological measurements. *Gels*, 11(3), 172. <https://doi.org/10.3390/gels11030172>

Valencia, P., Espinosa, 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>

Wang, L. Q., Jiang, J., Arnold, D. E., Guo, X. E., Lu, H. H., & Mow, V. C. (2008). Calcium concentration effects on the mechanical and biochemical properties of chondrocyte-alginate constructs. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 1(1), 93-102. <https://doi.org/10.1007/s12195-008-0014-x>

Wang, X., Zhu, K., & Zhou, H. (2011). Immobilization of glucose oxidase in alginate-chitosan microcapsules. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3042-3054. <https://doi.org/10.3390/ijms12053042>

Zhang H., Zhang, X., Wang, L., Wang, B., Zeng, X., & Ren, B. (2024). Functionalized chitosan and alginate composite hydrogel-immobilized laccase with sustainable biocatalysts for the effective removal of organic pollutant bisphenol A. *Catalysts*, 14(5), 304. <https://doi.org/10.3390/catal14050304>