



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERIAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**ESTUDIO DEL MOMENTO DE INOCULACIÓN
DE BACTERIAS LÁCTICAS ENCAPSULADAS
EN BIOCOMPOSITOS DE ALGINATO-SÍLICE
PARA DESARROLLAR LA FERMENTACIÓN
MALOLÁCTICA EN VINO TINTO**

Alumno: Álvaro Damián Cortejoso

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor: Encarnación Fernández Fernández

Cotutor: Josefina Vila Crespo

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Antecedentes	2
3	Objetivo	6
4	Material y métodos	7
4.1	Inmovilización de las bacterias lácticas en cápsulas de alginato-sílice	7
4.2	Protocolos de vinificación	7
4.3	Seguimiento del desarrollo de la fermentación alcohólica y maloláctica	9
4.3.1	Fermentación alcohólica	9
4.3.2	Fermentación maloláctica	9
4.4	Análisis microbiológico de las bacterias lácticas durante la vinificación	9
4.5	Análisis químico del mosto y vino	10
4.6	Análisis sensorial de los vinos	11
4.7	Tratamiento estadístico	11
5	Resultados y discusión	12
5.1	Evolución de la fermentación alcohólica	12
5.2	Evolución de la fermentación maloláctica	14
5.3	Seguimiento microbiológico de las BAL	17
5.4	Efecto del tiempo de inoculación y tipo de inóculo en la composición fisico-química del vino	19
5.5	Efecto del tiempo de inoculación y tipo de inóculo en las características sensoriales del vino	23
6	Conclusiones	25
7	Bibliografía	26

1 Resumen

La fermentación maloláctica (FML) es una etapa importante en la elaboración del vino tinto. La vinificación en esta etapa se ha visto comprometida ya que las condiciones de vinificación son más exigentes debido, entre otros factores, al cambio climático.

En este trabajo se han estudiado algunas técnicas para combatir esta problemática existente, como es la inmovilización de las bacterias lácticas (BAL) en geles de ALG-Si y la inoculación de las BAL en diferentes momentos (coinoculación e inoculación secuencial). En el régimen de coinoculación, levaduras y BAL se han sembrado e inoculado al inicio de la fermentación alcohólica (FA), y en la inoculación secuencial se han inoculado las levaduras una vez finalizada la FA. Paralelamente a la inoculación de BAL inmovilizadas, se ha realizado una inoculación con BAL libres y BAL inmovilizadas con lisozima en el medio, para estudiar y realizar una comparación de la técnica utilizada. Para elaborar este estudio se ha realizado un seguimiento de las cinéticas fermentativas alcohólica y maloláctica, un control microbiológico de las BAL y un análisis químico y sensorial del vino elaborado.

Las BAL inmovilizadas realizaron satisfactoriamente la FML en ambos tiempos de inoculación, incluso en presencia de lisozima. Este sistema de inoculación no alteró ni las características sensoriales ni la composición físico-química de los vinos.

Abstract

Malolactic fermentation is an important stage in the production of red wine. Winemaking at this stage has been compromised due to winemaking conditions, such as climate change.

In this study some techniques have been developed to combat the existing problem, such as the immobilization of lactic bacteria in ALG-Si gels. In addition, LAB have been inoculated at different times: coinoculation and sequential inoculation. The first of them, yeasts and LAB have been inoculated at the beginning of alcoholic fermentation (AF), and the second of them, yeasts have been inoculated once AF is finished. Parallel to the inoculation of immobilized LAB, an inoculation with free LAB and immobilized BAL with lysozyme in the medium has been carried out to study and make a comparison of the technique used. In order to carry out this study, the degradation of malic acid, fermentative kinetics, microbiological monitoring and chemical analysis of the wines produced have been monitored. The study was completed with a tasting to corroborate the conclusions obtained.

The immobilized LAB have successfully performed MLF, and the use of lysozyme helps to control the fermentation of native LABs. This inoculation does not alter either the sensory characteristics or the physical-chemical composition of the wines.

2 Antecedentes

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso complicado, que generalmente sigue después de finalizar la fermentación alcohólica (FA) por las levaduras que se encuentran en el vino (Lerm, Engelbrecht and du Toit, 2010). La reacción de la FML se define como la conversión del ácido L-málico, ácido dicarboxílico, en ácido L-láctico, ácido monocarboxílico, con la producción de CO₂. La reacción es catalizada por las bacterias lácticas (BAL), principalmente de los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Wibowo *et al.*, 1985). La transformación es producida por la acción de tres posibles rutas enzimáticas que poseen las BAL, en especial la especie *Oenococcus oeni* (Bauer and Dicks, 2017). Estas rutas son: a) transformación directa del ácido málico en ácido láctico por la enzima maloláctica, b) oxidación del ácido málico en ácido oxalacético por la enzima malato deshidrogenasa y c) oxidación del ácido málico, con pérdida de CO₂, en ácido pirúvico y reducción por la enzima L-lactato deshidrogenasa (Lerm, Engelbrecht and du Toit, 2010). De estas, la principal que tiene lugar en el vino es la llevada a cabo por la enzima maloláctica. Como consecuencia de la FML, el vino sufre una serie de transformaciones que inciden en la calidad y estabilidad del vino, principalmente, un aumento del pH y una caída de la acidez total del vino, la formación de compuestos secundarios que aportan complejidad organoléptica al vino y el aumento de su estabilidad microbiológica, entre otros (Hidalgo, 2011).

La población de BAL antes del inicio de la FA suele oscilar entre 10² y 10⁴ UFC/mL, cayendo a valores inferiores a 10 UFC/mL cuando las levaduras comienzan a producir etanol. Posteriormente la FML comienza al finalizar la FA, y las poblaciones de BAL superan las 10⁶ UFC/mL. La duración es variable, pero si se desarrolla correctamente puede finalizar después de unos 15-20 días (Suárez and Morata, 2015).

El progreso de la FML es difícil de controlar, ya que el vino puede ser un medio hostil para el crecimiento y metabolismo de las BAL. Su desarrollo va a depender principalmente de los parámetros fisicoquímicos del vino como son: pH (Bauer and Dicks, 2017), concentración en etanol (Davis *et al.*, 1985), concentración de sulfuroso (Guzzo, Jobin and Diviès, 1998), temperatura (Henick-Kling, 1993) y presencia de inhibidores para las BAL, por ejemplo, ácidos grasos de cadena larga (Johnsson *et al.*, 1995). En los últimos años, la problemática del cambio climático afecta aún más su desarrollo. En nuestras latitudes y zonas de producción el cambio climático está provocando una subida de las temperaturas, y con ello un aumento de los azúcares del mosto de uva (Mira, 2010). Esto provoca unos desequilibrios en el vino con una mayor graduación alcohólica (Vila-Crespo *et al.*, 2010), una subida del pH, un déficit de nutrientes y un menor contenido en ácido málico. Todo ello provoca la dificultad de realizar la FML por parte de las BAL de manera espontánea (Reguant *et al.*, 2010).

Actualmente, se están implantando una serie de estrategias para mejorar el desarrollo de la FML. Una de ellas es la inducción de la FML con cultivos comerciales de BAL. Los cultivos iniciadores de la FML son preparados con una o varias cepas de *O. oeni*, principalmente, debido a su correcta adaptación a pH bajos y altas concentraciones de etanol (Wibowo *et al.*, 1985). Se seleccionan en base a tres criterios (Torriani, Felis and Fracchetti, 2011):

- Criterios de primer orden: pH, etanol, temperatura...
- Criterios de segundo orden: viabilidad, cinéticas de supervivencia y propagación...
- Criterios de tercer orden: producción de características organolépticas deseadas y metabolitos indeseables, seguridad alimentaria...

Sin embargo, la inoculación de cepas comerciales de *O. oeni* no es siempre efectiva, a pesar del esfuerzo realizado en la selección de las BAL basado en métodos moleculares y bioquímicos. Además, aunque la población de inóculo inicial es elevada (10^6 - 10^8 UFC/mL) esto no garantiza su implantación en el medio, por el cambio climático y por el desarrollo de nuevas prácticas agronómicas y enológicas que interfieren en el metabolismo habitual de las BAL (Lerm, Engelbrecht and du Toit, 2010). Existen otras posibilidades para mejorar la gestión de la FML como son la inoculación de levaduras capaces de degradar también el ácido málico, añadir la enzima maloláctica o bien emplear bacterias inmovilizadas, entre otras (Hidalgo, 2011).

Otra de las estrategias que se sigue estudiando en la actualidad es la modificación genética de los genes de las BAL o de las levaduras capaces de degradar el ácido málico. En el año 2005, se consiguió la secuenciación completa del genoma de *O. oeni*. (Mills *et al.*, 2005), información que está permitiendo adaptar su código genético a las características enológicas deseadas. Recientemente se ha descubierto el locus responsable de la tolerancia al etanol en *O. oeni* (Betteridge *et al.*, 2018), resultados que abren nuevos caminos para mejorar su adaptación al vino. Aunque la investigación en este campo de la ingeniería genética está avanzando de manera notoria, muchas instituciones y los propios consumidores de vino, no aceptan aun el uso de organismos genéticamente modificados, por lo que se siguen buscando otras alternativas no moleculares.

Una técnica con gran interés es la coinoculación de levaduras y BAL al inicio de la FA. Se ha observado que al añadir de forma simultánea las levaduras y las BAL se reducen los tiempos de las fermentaciones, además de reducir la acidez volátil en los vinos (Tristezza *et al.*, 2016), sin cambiar su calidad sensorial (Homich *et al.*, 2016). Es interesante ya que las bacterias pueden aclimatarse a la concentración de etanol que se vaya generando con la FA, incluso potenciando su desarrollo por el incremento de la temperatura en esta fase. La única desventaja de esta estrategia, según algunos autores, es el efecto inhibitorio de las levaduras durante la FA sobre las BAL, por los metabolitos que producen (Alexandre *et al.*, 2004). Para realizar esta técnica, hay que elegir adecuadamente las cepas de levaduras y bacterias que se van a utilizar para evitar incompatibilidades.

Tal como se mencionó anteriormente, una de las alternativas a la inoculación de BAL libres es la inoculación de BAL inmovilizadas, como herramienta para mejorar la FML en condiciones difíciles. Se ha descrito que favorece el rendimiento en la degradación de ácido málico, que es más elevado que el de las BAL libres (Rossi, 1984). Además, al posibilitar añadir altas concentraciones del inóculo inmovilizado, se elimina o reduce la fase de latencia de las bacterias, con lo que conlleva a reducir la duración de FML y los riesgos de alteraciones microbianas (Hidalgo, 2011). También, otorga la posibilidad de reutilizar ese mismo inóculo en varios ciclos (Simó *et al.*, 2019) y posibilita desarrollar un proceso de manera continua (Simó *et al.*, 2018).

La inmovilización de las BAL para su uso en bebidas alcohólicas se ha ido desarrollando a lo largo de la última década (Maicas, 2001; Kourkoutas, Manojlović and Nedović, 2010; Simó *et al.*, 2019) y se define como “el confinamiento físico o la localización de células intactas en una cierta región del espacio con la preservación de alguna actividad catalítica deseada” (Karel, Libicki and Robertson, 1985; Kourkoutas *et al.*, 2004).

Existen una serie de técnicas de inmovilización celular aplicadas a la elaboración de bebidas alcohólicas entre las que se encuentran: a) inmovilización en la superficie de un soporte sólido por adsorción física de fuerzas electroestáticas o por la unión covalente entre la membrana celular y la del soporte; b) atrapamiento dentro de una matriz porosa; c) autoagregación por floculación (natural) o con agentes reticulantes (inducidos artificialmente) y d) contención celular con ayuda de membranas, lo que también se denomina biorreactores de membrana (Pilkington *et al.*, 1998; Kourkoutas, Manojlović and Nedović, 2010).

Las técnicas de inmovilización celular más utilizadas, para aplicarlas en la inmovilización de BAL, son el atrapamiento en geles e inmovilización en la superficie de un soporte sólido (Simó *et al.*, 2017a). Como soporte sólido, generalmente, se utiliza matrices orgánicas con diferentes materiales: alginato cálcico, carragenato, quitosano, material celulósico deslignificado, virutas de madera, etc. El más popular para la inmovilización de células es el gel de alginato (ALG).

Los geles de ALG se forman a partir del ácido algínico e iones multivalentes como el Ca^{2+} (Yabur, Bashan and Hernández-Carmona, 2007). El ácido algínico es un biopolímero que se encuentra en la pared celular de las algas marinas pardas (feofíceas). Los ALG son una familia de polisacáridos lineales de ácido β -D-manurónico (M) y de α -L-gulurónico (G). Su composición y secuencian varían dependiendo de la fuente de la cual proviene el polisacárido. La extensión y la composición de las secuencias y el peso molecular determinan las propiedades físicas de los ALG (Lupo *et al.*, 2012). Se agrupan constituyendo bloques tipo G (-GGG-), bloques M (-MMM-) o se alternan M y G (-MGG-). Tanto la distribución de los monómeros en la cadena polimérica como la carga y volumen confieren al gel formado características de flexibilidad o rigidez, dependiendo del contenido de G. Esos bloques en presencia de los cationes multivalentes como el Ca^{2+} (Coradin *et al.*, 2001), provocan un entrecruzamiento molecular con una estructura similar a la forma de una “caja de huevos” (Figura 1).

Las principales ventajas del gel de ALG como soporte para la encapsulación celular son las siguientes: es fácil de preparar, es económico y las condiciones de inmovilización para las bacterias son suaves. También presenta una serie de inconvenientes o desventajas como son problemas de resistencia mecánica y de estabilidad química que dificultan su aplicación en enología (Melvik and Dornish, 2004; Rodríguez-Nogales, 2017). Se han diseñados biocápsulas de ALG con *O. oeni* (Guzzon *et al.*, 2012), pero debido a los inconvenientes que presenta el biopolímero se están buscando soluciones para mejorar esta estrategia.

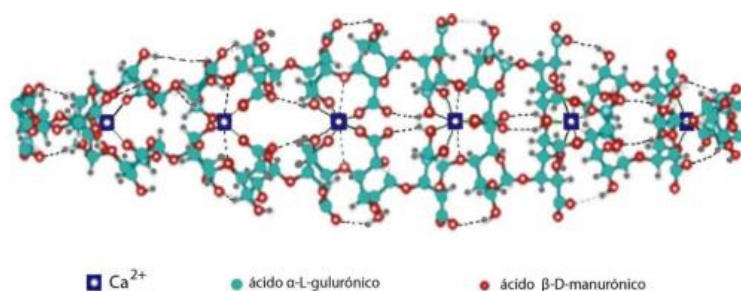


Figura 1: Estructura en forma de "caja de huevo" del gel de alginato (Reddy, 2010)

Una de las alternativas para mejorar las características de estos compuestos son el diseño de polímeros mixtos de alginato y sílice (ALG-Si) (Coradin, Nassif and Livage, 2003; Callone *et al.*, 2008; Simó *et al.*, 2017b). Mediante precursores de sílice se pueden formar redes poliméricas entrecruzadas de ALG-Si. La sílice, el cual es un compuesto inorgánico, confiere a la matriz de alginato dureza y estabilidad química y térmica. El entrecruzamiento que tiene lugar en este gel inorgánico es de naturaleza covalente, y confiere más estabilidad que las interacciones electrostáticas o puentes de hidrogeno que se dan en el gel de alginato (Callone *et al.*, 2008).

Existen dos vías, ligadas al proceso sol-gel, que permite la formación de geles inorgánicos en presencia de precursores de sílice: la ruta con alcóxidos y la ruta acuosa (Livage, 1998).

La ruta con alcóxidos es la ruta tradicional para la síntesis de geles inorgánicos, pero durante este proceso se pueden producir sustancias tóxicas para las BAL. Además, la síntesis del gel tiene lugar a valores de pH extremos para las BAL y en presencia de solventes tóxicos. Los alcóxidos de silicio [Si (OR)₄] contienen un grupo orgánico (R: CH₃, C₂H₅, etc.), que en contacto con agua sufre una hidrólisis, liberándose una molécula de alcohol (ROH) y creándose el grupo silanol (SiOH). Posteriormente, se produce una policondensación entre los grupos silanoles. Esto provoca que con el tiempo se produzca una serie de partículas coloidales que se unen unas con otras formando al final una estructura de gel (Coradin, Nassif and Livage, 2003; G. Simó *et al.*, 2017b).

La ruta acuosa está basada en la mezcla de derivados de sílice (silicato de sodio y sílice coloidal) con ALG antes de la gelificación en presencia de Ca²⁺ (Coradin *et al.*, 2001; Trivedi, Bassi and Zhu, 2006). Los reactivos son más baratos y menos nocivos para las BAL, por eso se está estudiando a fondo esta ruta en la inmovilización de BAL para el desarrollo de la FML.

Desde el grupo de investigación ENOBIOTEC se ha pretendido a lo largo de los últimos años, estudiar el uso de geles de ALG-Si para la encapsulación de BAL con el objetivo de mejorar el desarrollo de la FML en un vino tinto.

Simó *et al.* (2017a) optimizaron las condiciones de la microencapsulación de *O. oeni* en una matriz basada en redes poliméricas entrecruzadas de ALG-Si, atendiendo a los criterios de mejorar la resistencia mecánica del gel y su capacidad para retener las células bacterianas, e intensificar la actividad catalítica de las BAL. Para ello se utilizó

un proceso de coacervación basándose en la mezcla de los derivados de sílice con ALG antes de la gelificación en presencia de Ca^{2+} . Como derivados de sílice se estudiaron diferentes concentraciones de silicato de sodio y silicato coloidal, a distintos pH de inmovilización. La adición de estos derivados mejoró la resistencia mecánica del soporte de inmovilización y la capacidad de degradación del ácido málico por las BAL. Además, la matriz mixta presentó alta capacidad para retener las BAL.

Otra alternativa que se evaluó para mejorar la estabilidad química de la matriz de inmovilización fue recubrir las biocápsulas de alginato con un alcóxido de sílice que contiene un grupo amino cargado positivamente (3-aminopropiltriethoxisilano, APTES). Los grupos aminos del alcóxido pueden interactuar electrostáticamente con los grupos carboxílicos de las moléculas de alginato superficiales para formar una capa externa de sílice (Simó *et al.*, 2017b). Sin embargo, el recubrimiento de las biocápsulas de alginato con APTES no mejoró la resistencia mecánica del soporte ni la actividad maloláctica de las BAL encapsuladas.

Posteriormente, la capacidad fermentativa de *O. oeni* encapsulada en biocompositos basados en redes poliméricas entrecruzadas de ALG-Si se valoró bajo distintas condiciones desfavorables para el desarrollo de la FML. Las BAL encapsuladas mostraron un mejor comportamiento fermentativo que las células libres bajo extremas condiciones de fermentación, como son alto grado alcohólico (13-16%), bajo pH (3,0-3,3) y baja temperatura de fermentación (13-15°C) (Simó *et al.*, 2017b).

Además, se analizó la estabilidad química y operacional de estos biocompositos en vinos con distintas condiciones de pH y grado alcohólico (Simó *et al.*, 2019). Como conclusión a este estudio se obtuvo que la inclusión de derivados de sílice a las cápsulas de ALG incrementó su estabilidad química en vinos con pH bajos y con grados alcohólicos elevados. También las bacterias encapsuladas fueron capaces de realizar varios ciclos de FML en condiciones de pH bajos y grados alcohólicos altos que son altamente desfavorables para estas bacterias en estado libre.

Recientemente, se comparó el desarrollo de la FML con BAL libres e inmovilizadas en geles de ALG, con y sin derivados de sílice, y antes de la FA (coinoculación) y al final de la FA (inoculación secuencial). El estudio se realizó a nivel laboratorio con mosto tinto estéril, variando su pH y su contenido en azúcares (Simó *et al.*, 2018). Los resultados mostraron que la inoculación simultánea y secuencial con BAL encapsuladas en alginato-sílice redujo sensiblemente el tiempo para completar la FML bajo condiciones adversas de vinificación (mostos con una composición rica en azúcares y con un pH bajo). Además, no se observó una modificación en las cinéticas de la FA ni en la composición básica del vino.

3 Objetivo

El objetivo de este estudio es comparar el efecto del tiempo de inoculación (coinoculación e inoculación secuencial) y del tipo de inóculo (BAL libres e inmovilizadas en cápsulas de alginato-sílice) sobre las cinéticas fermentativas, y la composición físico-química y sensorial del vino tinto. También se valoró el efecto de la adición de lisozima en los ensayos con BAL inmovilizadas.

4 Material y métodos

4.1 INMOVILIZACIÓN DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN CÁPSULAS DE ALGINATO-SÍLICE

Las BAL se inmovilizaron en un soporte mixto de ALG-Si. El procedimiento seguido para esta inmovilización se basa en un proceso de coacervación del ALG con los derivados de sílice antes de la gelificación en presencia de Ca^{2+} (Coradin, Nassif and Livage, 2003). Se siguió el método propuesto por Trivedi et al. (2006) con modificaciones sugeridas por Simó *et al.* (2017b, 2018).

Se estudiaron dos tiempos de inoculación de las BAL (coinoculación e inoculación secuencial), por lo que se realizaron dos lotes de cápsulas de ALG-Si con BAL. En cada lote se elaboraron 167 mL de gel, que corresponden a unos 178 g. Para cada lote, se mezclaron 27,72 mL de silicato coloidal (Ludox HS40, Sigma-Aldrich, España) y 20,79 mL de silicato de sodio 0,4M y 85,09 mL de agua. Se ajustó la mezcla a un pH 6,3 con HCl concentrado. Posteriormente, se añadieron 3,34 g de ALG de sodio y 1,67 g de BAL liofilizada *O. oeni* (LALVIN VP41 MBR, Lallemand, Francia) previamente rehidratadas en 33,4 mL de agua, siempre en agitación. Esta mezcla se hizo gotear por gravedad a través de varias jeringuillas estériles de 10 mL sobre 4 L de Ca_2Cl 0,2 M estéril a una altura de 20 cm. Se dejó en agitación a 260 rpm durante 2 h. Una vez concluido el proceso de gelificación se lavaron las perlas con agua estéril. Todo el proceso se realizó en condiciones estériles, con material y reactivos esterilizados con autoclave. La concentración teórica de BAL fue de 0,0094 g/g de gel, que corresponde con una población de BAL de $\sim 10^{11}$ UFC/g de gel.

4.2 PROTOCOLOS DE VINIFICACIÓN

Para en este estudio, se empleó uva congelada de la variedad Tempranillo de la vendimia 2018, procedente de la finca Zamadueñas del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid, España). Tras los procesos de descongelación, despalillado y estrujado se obtuvieron un total de 138,4 kg de pasta-mosto, a la que se añadió 4 g/HL de SO_2 en forma de metabisulfito potásico y 20 g/HL de activador de BAL (Acti-ML, Lallemand, España). Se obtuvo un mosto con 25,8 °Brix y un pH de 3,52.

Una vez homogeneizado se separó la pasta-mosto de manera equitativa en 12 depósitos de acero inoxidable. A cada depósito se le añadieron 6,4 kg de pasta y 5,6 L de mosto.

Se realizaron un total de 6 vinificaciones por duplicado. Las estrategias de FML estudiadas fueron diversas en función del tipo de inóculo y el tiempo de inoculación. En cuanto el tipo de inóculo, consideramos BAL libres, BAL inmovilizadas y BAL inmovilizadas más liozima. Mientras que se emplearon dos tiempos de inoculación (inoculación secuencial y coinoculación). La numeración de los depósitos estuvo ligada a las diferentes denominaciones de las vinificaciones, que se realizaron según el siguiente esquema:

- Inoculación secuencial:
 - Depósitos 1A y 1B: con BAL libres
 - Depósitos 2A y 2B: con BAL inmovilizadas

- Depósitos 3A y 3B: con BAL libres + lisozima
- Coinoculación:
 - Depósitos 4A y 4B: con BAL libres
 - Depósitos 5A y 5B: con BAL inmovilizadas
 - Depósitos 6A y 6B: con BAL libres + lisozima

La inoculación de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos® YSEO®, Lallemand) se realizó a la dosis de 30 g/HL. La coinoculación de BAL (depósitos 4A, 4B, 5A, 5B, 6A y 6B) se llevó a cabo 2 días después de sembrar las levaduras a la dosis de $\sim 3,4 \cdot 10^6$ UFC/mL, tanto en forma libre como inmovilizada. Las cápsulas se dividieron en dos grupos y se introdujeron en unas bolsas de nylon que se sumergieron en el mosto-vino en la parte superior e inferior del depósito (5A, 5B, 6A y 6B). Además, en los depósitos 6A y 6B se añadió al mosto lisozima a la concentración de 30 g/HL (Enovin Lyso, Agrovin, España).

La duración de la FA para todas las vinificaciones fue de 10 días. Al finalizar la FA, los vinos se sangraron, descubaron y prensaron, empleando una prensa vertical hidráulica (presión 1,5 bar) de pequeñas dimensiones. Se trabajó en condiciones de higiene estricta para evitar contaminaciones. Se obtuvieron una media de 8 L por depósito (mezcla de vino yema y prensa). En los recipientes de los vinos coinoculados, se introdujo de nuevo las bolsas de nylon con capsulas de BAL inmovilizadas, para continuar con la FML.

Al 4º día después del primer trasiego los vinos se desfangaron para eliminar las lías del fondo de los recipientes y se rellenaron. Además, se inocularon con BAL los recipientes 1A, 1B, 2A, 2B, 3A y 3B (inoculación secuencial) empleando la misma concentración de BAL libres e inmovilizadas. Se añadió lisozima en los recipientes 3A y 3B, el mismo día de la inoculación, con la misma dosis empleada en la estrategia de coinoculación, 30 g/HL.

Se consideró el fin de la FML cuando la concentración de ácido málico estuvo entre los valores 0,1-0,2 g/L. Finalizada la FML, se comprobó el sulfuroso libre de los vinos, corrigiéndose a una dosis de 30 mg/L, utilizando metabisulfito potásico, posteriormente se trasegaron y se desfangaron los vinos. Se realizó una clarificación espontánea dejando los vinos desfangar en cámara frigorífica a 6°C durante 15 días. Por último, pasado ese periodo, se embotelló y taponó.

4.3 SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA Y MALOLÁCTICA

4.3.1 Fermentación alcohólica

El seguimiento de la FA se llevó a cabo por diferencia de pesadas, llevando el pesaje desde el primer día después de la inoculación de las levaduras. El final de la FA se consideró cuando cesó la pérdida de peso en los depósitos (Suarez & Iñigo, 1990). Durante este periodo se realizaban bazuqueos diarios, evitando contaminaciones entre depósitos con una solución con metabisulfito potásico (2%) y agua destilada para la limpieza del material.

4.3.2 Fermentación maloláctica

Para comprobar el desarrollo de la FML, se realizaron periódicamente cromatografías de papel para el ácido málico y láctico. Además, se recogieron periódicamente alícuotas de vino de 1 mL de cada depósito y se conservaron a -20°C hasta su posterior medida. Se empleó un kit enzimático para la determinación del ácido L-málico (Tecnología Difusión Ibérica, España). El método se fundamenta en la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato, en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa y el cofactor nicotinamida-adenin-dinucleótido. Las medidas de las muestras se tomaron a una longitud de onda 340 nm en un espectrofotómetro de microplacas MultiskanTMGo (Thermo-Scientific, EE. UU). Los análisis se realizaron por triplicado.

4.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS DURANTE LA VINIFICACIÓN

Se realizó un seguimiento de la población de BAL durante la vinificación empleando un cultivo en placa Petri de una muestra de vino en un medio sólido MLO en presencia de pimaricina al 10 % (p/v, disuelta en ácido acético), para inhibir el crecimiento de levaduras.

En cada análisis se aplicó la técnica de diluciones decimales, que consistía en preparar 7 diluciones (10^{-1} hasta 10^{-7}) del mosto-vino con agua peptonada (peptona 1,0 g/L y NaCl 8,5 g/L, llevado a pH $7,0 \pm 0,2$). Una vez preparada dichas diluciones de cada muestra se realizó la técnica de siembra en masa en el medio MLO. Una vez realizada la siembra, se incubaron las placas a 26°C durante 13 días. Para el recuento se seleccionaron las placas que contuvieron entre 30 y 300 colonias, realizando la medida según la norma OIV/OENO 206/2010.

Algunas colonias se observaron al microscopio para comprobar si correspondían a BAL o al género *Acetobacter*. Para esta observación se realizó la tinción Gram o tinciones con azul de metileno para una mejor visualización de las células.

4.5 ANÁLISIS QUÍMICO DEL MOSTO Y VINO

A continuación, se describe el fundamento de los análisis realizados a las muestras de mosto y/o vino:

- **pH.** Se basa en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en la muestra de estudio. OIV-MA-AS313-15.
- **Grado Brix.** Refractómetro. Es un método indirecto que determina la concentración de azúcar mediante el índice de refracción. OIV-MA-AS2-02
- **Acidez total.** La acidez total es la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada, en este caso NaOH 0,1 N. Se empleó el método potenciométrico. El dióxido de carbono no se incluye en la acidez total. OIV-MA-AS313-01.
- **Acidez volátil.** La determinación se realizó por el método de García Tena, y se basa en la separación directa o parcial del vino de una fracción del ácido acético contenido en él y posterior valoración con NaOH 0,01 N. OIV-MA-AS313-02.
- **Grado alcohólico (% vol.).** Se realizó por ebulloimetría empleando un ebulómetro (GAB, España). Es un método de determinación del grado alcohólico directo y se fundamenta en la gran diferencia que existe entre los puntos de ebullición del agua (100°C) y el alcohol (78°C).
- **Índice de Polifenoles Totales (IPT).** Método del índice ultravioleta. El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención del índice por la medida de la absorbancia del vino a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda (Zamora, 2003). OIV-OENO 574 -2017.
- **Características cromáticas.** Las características cromáticas de un vino se deducen de su espectro de absorción que presenta un mínimo a 420 nm y un máximo a 520 nm. Estas medidas permiten definir su intensidad colorante (IC), tonalidad, % rojo, % azul y % amarillo. OIV-MA-AS2-07B.
- **Taninos totales.** Este método se basa en la propiedad que presentan los taninos condensados de liberar en medio ácido y en presencia de calor, por rotura de los enlaces intermonoméricos, un carbón muy reactivo, que puede, por oxidación, dar lugar a una antocianidina (Bate-smith, 1981). Se midió en el espectrofotómetro a 550 nm.
- **SO₂ libre.** Valoración iodimétrica del sulfuroso libre por el método Ripper con un valorador automático (Hanna Instruments, España). El anhídrido sulfuroso libre es un fuerte reductor el cual es oxidado en medio ácido por el yodo.
- **Antocianos totales.** El fundamento consiste en la capacidad o propiedad que tienen los antocianos de cambiar su estructura química con la variación de pH, dando lugar a una coloración roja medible a una longitud de onda de 520 nm.

Para los parámetros de IPT, IC, taninos totales y antocianos totales, se centrifugó previamente las muestras de vino a 4000 rpm durante 5 minutos. Todos los parámetros se analizaron por duplicado.

4.6 ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS VINOS

Con un grupo de 7 catadores seleccionado y entrenado en el año 2016, se evaluaron los vinos experimentales (6 muestras) utilizando análisis sensorial descriptivo cuantitativo, mediante un diseño de bloques completamente aleatorizado. Para ello se utilizó una ficha de cata, desarrollada ese mismo año y, compuesta por 15 descriptores agrupados en 3 fases (fase visual: limpidez, tonalidad e intensidad de capa; fase olfativa: intensidad de olor, frutos rojos, frutos negros, vegetal, láctico, acético y alcohólico; fase gustativa: intensidad gustativa, amargo, ácido, astringencia y persistencia) que se evalúan en una escala no estructurada de 10 cm.

Las catas se realizaron en dos sesiones y en total se realizaron cuatro repeticiones de cada muestra (vinificación).

4.7 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVII (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, USA), realizando un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$). Las diferencias estadísticas significativas entre muestras se determinaron por el test de Tukey ($p < 0.05$). En las figuras, las barras de error indican el intervalo de confianza de la media. En el tratamiento estadístico de los datos del análisis sensorial, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 24.

5 Resultados y discusión

En este apartado se mostrarán y discutirán los resultados obtenidos en el presente estudio.

5.1 EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

En el estudio, primero se analizó el impacto que generan las BAL, ya sean en su forma libre o inmovilizada, sobre las levaduras del género *S. cerevisiae* durante la coinoculación de ambas, en comparación con una inoculación secuencial. La mejor manera de representar este análisis es con una cinética fermentativa de los vinos estudiados. La evolución de la FA se expresó como producción de CO₂ (Kg/L de mosto), en base a las diferencias de peso observadas en los depósitos de fermentación.

En la *Figura 2*, se observa la producción de CO₂ frente a los días de duración de la FA. En el día 0 se realizó la siembra de las levaduras, mientras que en el día 2 se inocularon las BAL en los depósitos coinoculados. La producción de CO₂ debida a la transformación de los azúcares a etanol es máxima durante los 4 primeros días. La FA se completa con la fase estacionaria que se manifiesta con una producción más lenta de CO₂. En todos los casos la FA terminó al cabo de 10 días. También se observó que, en todas las fermentaciones, independientemente del tipo de inóculo (libre, inmovilizado e inmovilizado con lisozima) y del tiempo de inoculación (inoculación secuencial y coinoculación), los rendimientos fermentativos fueron muy similares (0,099-0,113 Kg de CO₂/L de mosto). Por lo tanto, la presencia de BAL en las primeras etapas de la FA no afectó ni inhibió la dinámica de la fermentación de las levaduras. Es fundamental que las cepas de levaduras y BAL seleccionadas sean compatibles para evitar cualquier tipo de competencia que pueda afectar a la cinética de la FA (Taniyasuri *et al.*, 2016; Tristezza *et al.*, 2016). Un análisis de varianza confirmó estas observaciones, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de producción de CO₂ observadas a los 10 días de la FA ni para el tiempo de inoculación ($p=0,103$), ni para el tipo de inóculo ($p=0,618$) y de vino ($p=0,443$).

Algunos autores, en cambio, demostraron que las BAL tienen capacidad para inhibir el desarrollo de las levaduras, debido a un agotamiento de los nutrientes y otros factores de supervivencia que necesitan las levaduras (Alexandre *et al.*, 2004). Esta inhibición se ve favorecida por la enzima β -glucanasa, que es responsable de la hidrólisis de la pared de las levaduras y que entraña la lisis de la célula entera (Guilloux-Benatier *et al.*, 2000). Además, la presencia de lisozima en el vino, con efecto inhibidor de las BAL, tampoco afectó a la cinética fermentativa de la levadura.

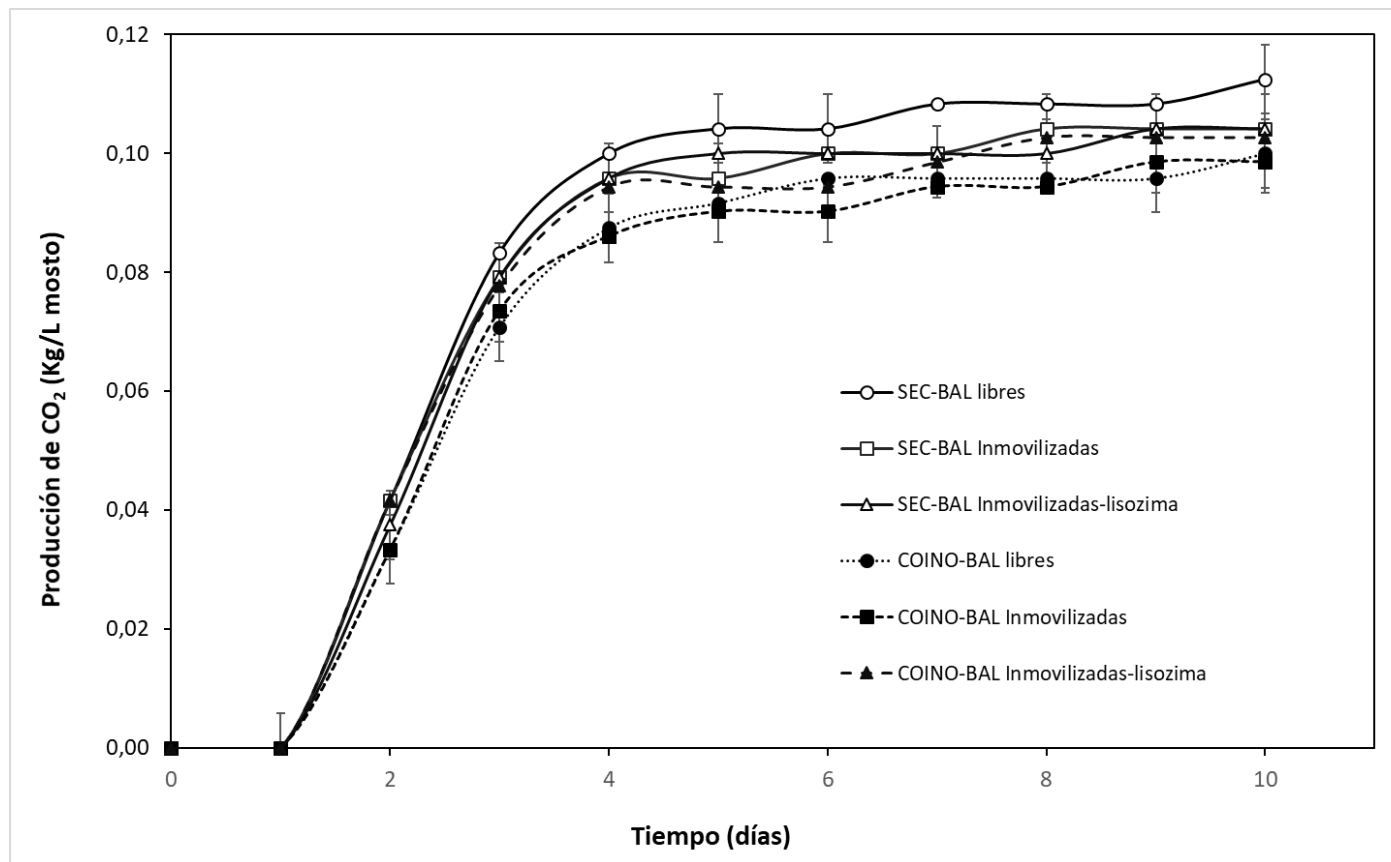


Figura 2: Producción de CO₂ durante la fermentación alcohólica de las distintas vinificaciones (COINO: coinoculación; SEC: secuencial).

5.2 EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

El final de la FML, según varios autores, se da por completado cuando hay una concentración de ácido málico inferior a 0,5 g/L de acuerdo con Hidalgo (2011) o a 0,10 g/L según Henick-Kling and Park (1994). En este estudio se decidió concluir la FML a una concentración de ácido málico entre 0,1-0,2 g/L.

La *Figura 3* muestra las cinéticas de la FML, donde se representa la concentración de ácido málico desde la siembra de las levaduras (representada en el tiempo 0) hasta el final de la degradación del ácido málico. La inoculación de las BAL tuvo lugar 2 días (vinos coinoculados) o 14 días (vinos con inoculación secuencial) después de la inoculación de las levaduras. Paralelamente, se realizó un recuento de las BAL durante el tiempo de fermentación (*Figura 4*).

Finalizada la FML de los vinos coinoculados con BAL libres, se esperaron unos días para comprobar si las BAL eran capaces de degradar por completo el ácido málico. Los cuatro depósitos con el inóculo de BAL libres (inoculación secuencial y coinoculación), se trasegaron y sulfitaron el mismo día. Para los vinos coinoculados con BAL libres, la degradación de ácido málico se completó a los 24 días desde la siembra de levaduras, y a los 16 días desde la siembra del inóculo de BAL para los vinos con inoculación secuencial. Para el resto de los vinos, se dio por finalizada la degradación y el fin de la FML a los 40 días desde la inoculación de las levaduras.

Evaluando las cinéticas de degradación del ácido málico de la *Figura 3* se observa que la duración de la FML con las BAL libres es superior en régimen de coinoculación que, en inoculación secuencial, siendo los valores de 22 días (desde día 2 al día 24) y de 16 días (desde el día 14 hasta el día 30), respectivamente.

En los vinos coinoculados, las cinéticas de degradación del ácido málico se producen de manera similar para todos los tipos de inóculos, aunque fue más rápida la degradación del ácido málico con el uso de las BAL libres. También se puede asegurar que los inóculos con BAL inmovilizadas con y sin lisozima realizaron y completaron la degradación del ácido málico, aunque de manera más retardada. En la inoculación secuencial, la degradación del ácido málico durante las 2 primeras semanas es análoga para los tres tipos de inóculos, pero cuando la concentración de ácido málico empieza a ser menor a 1 g/L, su degradación se ve ralentizada en las pruebas con BAL inmovilizadas con y sin lisozima.

Las diferencias observadas en las cinéticas de degradación del ácido málico entre las BAL libres e inmovilizadas pueden deberse a problemas de transferencia de nutrientes hacia las células microbianas. Por un lado, las BAL libres están dispersas en todo el medio (mosto-vino) con un acceso sencillo a los nutrientes, mientras que las BAL inmovilizadas se encuentran encapsuladas en un gel de ALG-Si, que debido a su estructura porosa puede reducir la transferencia de los nutrientes y metabolitos del medio hacia las BAL (Kourkoutas, Manojlović and Nedović, 2010). Por otro lado, las BAL inmovilizadas se encontraban contenidas en dos mallas de nylon localizadas a dos alturas del depósito que también pueden dificultar la transferencia de los nutrientes hacia las células. Si durante la ejecución del experimento no se mantiene un movimiento constante y dinámico del vino, la región del depósito donde se localiza las BAL

inmovilizadas no ha estado en contacto con parte del mosto-vino y no se ha podido degradar adecuadamente el ácido málico. Es posible que por estas cuestiones las BAL libres hayan finalizado la FML antes, degradando rápidamente el ácido málico, a pesar de realizar una homogeneización diaria de los depósitos que facilitaría la difusión de nutrientes al interior de las cápsulas de ALG-Si. Una posible estrategia para reducir los problemas de transferencia de materia entre las bacterias inmovilizadas y el vino, y por consecuencia incrementar la velocidad de degradación del ácido málico, es el uso de sistemas de fermentación en continuo relativamente fáciles de diseñar con células inmovilizadas (Kourkoutas, Manojlović and Nedović, 2010).

Por otro lado, las cinéticas de degradación del ácido málico inoculando BAL inmovilizadas con y sin lisozima son similares para ambos tiempos de inoculación (coinoculación e inoculación secuencial). La lisozima es una enzima que se puede emplear en enología con el objetivo de evitar la alteración del mosto o del vino por las BAL autóctonas alterantes. Sin embargo, su actividad no es selectiva y puede también afectar al inóculo de BAL añadidas al vino, pudiendo inhibir el desarrollo de la FML. Por ello, es necesario un tratamiento específico con un clarificante para eliminar la lisozima del vino antes de proceder a la inoculación del cultivo de BAL seleccionado (Liburdi, Benucci and Esti, 2014).

Nuestros resultados ponen de manifiesto que la inmovilización de las BAL en un gel de ALG-Si protege a *O. oeni* del efecto antibacteriano de la lisozima. La porosidad del soporte de inmovilización ha permitido el intercambio de nutrientes y metabolitos entre las BAL y el vino, pero ha impedido el contacto entre la lisozima añadida al vino y las BAL del interior del gel. Por lo tanto, la inmovilización de las BAL en este gel permite el desarrollo de la FML en presencia de lisozima, inhibiendo a las BAL alterantes presentes en el vino que podrían ser responsables de la acumulación de compuestos tóxicos o no deseados en el vino. Además, sería posible el diseño de un protocolo de vinificación con lisozima sin la necesidad de un tratamiento con un clarificante previo a la inoculación de la cepa de BAL seleccionada.

En este estudio no se puede asegurar que la coinoculación reduzca el tiempo de la vinificación, tal y como concluyen algunos autores como Jussier *et al.*, (2006), Zapparoli *et al.*, (2009), o Servetas *et al.*, (2013), si bien es cierto que estos autores parten de otras condiciones de vinificación. En cualquier caso, todas las pruebas con BAL inmovilizadas han finalizado satisfactoriamente la FML. Además, el empleo de BAL inmovilizadas permitiría su simple reutilización durante varios ciclos seguidos (Simó *et al.*, 2019) y posibilita el inicio o la parada de la FML en un instante determinado sin que ello suponga un aspecto negativo en la calidad del vino (Kourkoutas, Manojlović and Nedović, 2010).

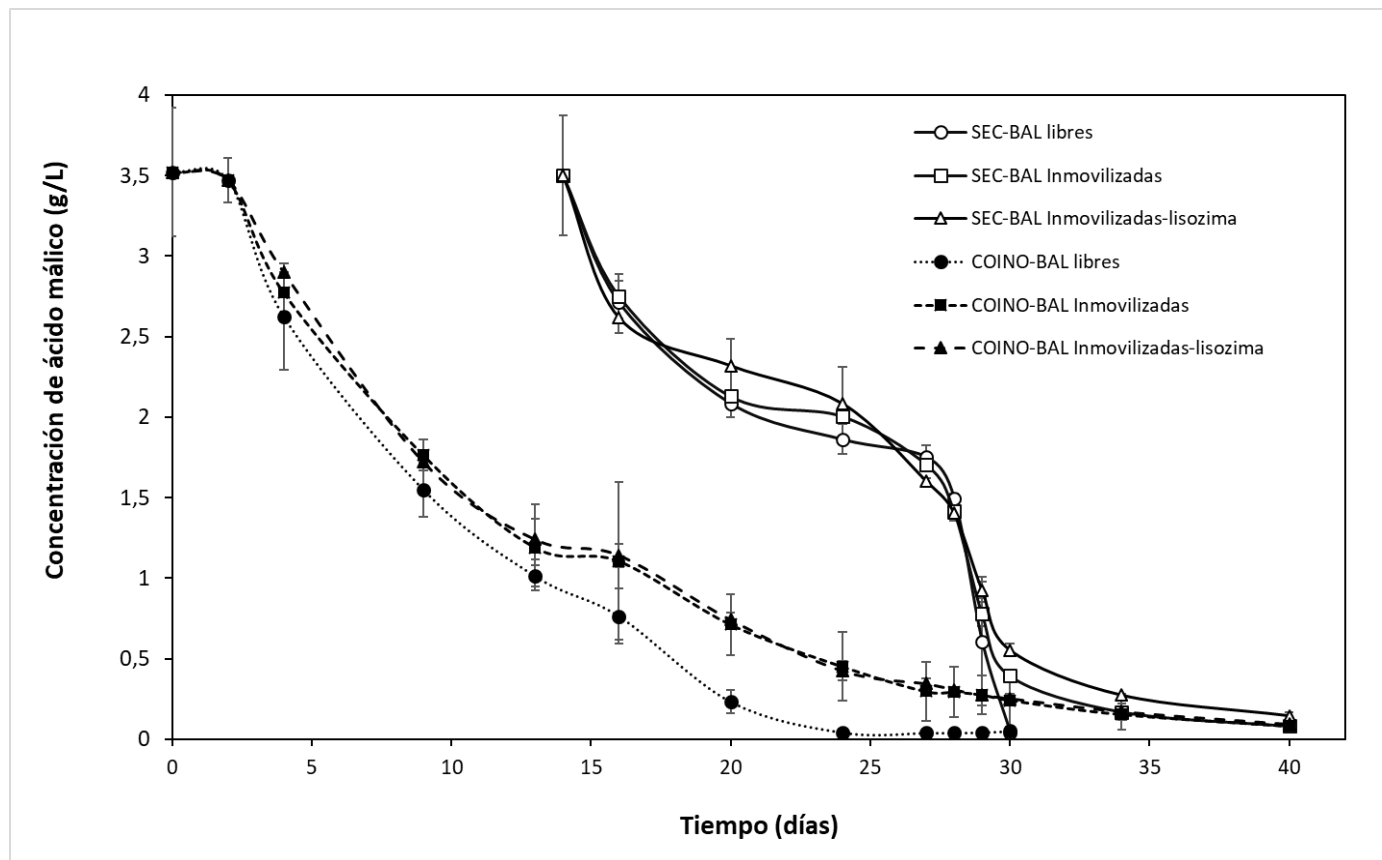


Figura 3: Evolución de la concentración de ácido málico durante la fermentación de los mostos-vinos en las distintas vinificaciones (COINO: coinoculación; SEC: secuencial).

5.3 SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO DE LAS BAL

La *Figura 4* muestra el recuento de las BAL a lo largo de la vinificación de los distintos vinos. Tal y como se comentó en el anterior apartado, la coinoculación de las BAL libres e inmovilizadas se realizó el segundo día después de la inoculación de las levaduras empleando una población de BAL de $\sim 3,4 \cdot 10^6$ UFC/mL. En el régimen de inoculación secuencial, se inoculó la misma población de BAL libres e inmovilizadas a los 14 días de inocular las levaduras.

Independientemente del tiempo de inoculación (inoculación secuencial o coinoculación), el recuento de BAL libres desde el principio de su inoculación se encontró por encima del umbral de población de 10^6 UFC/mL necesario para realizar la FML (Peynaud, 2004). En los ensayos de coinoculación e inoculación con BAL inmovilizadas, se observa un incremento de la población de BAL hasta valores de $6,8 \cdot 10^4$ UFC/mL y $6,7 \cdot 10^3$ UFC/mL al final de la FML, respectivamente, poblaciones insuficientes para poder realizar la FML. Con esto se puede deducir que las BAL que han realizado la FML, tanto en régimen de coinoculación como de inoculación secuencial, han sido las BAL inmovilizadas en las capsulas de ALG-Si. La presencia de BAL en el mosto-vino en aquellas pruebas con BAL inmovilizadas, se debe probablemente al desarrollo de las BAL autóctonas, aunque tampoco podemos descartar una fuga de BAL de la matriz de inmovilización. Previamente, Simó *et al.* (2017a) demostraron que el soporte de inmovilización de ALG-Si presentaba una alta capacidad para retener las BAL en su interior, observándose una tasa de liberación de tan sólo un 0,001%.

En los ensayos de coinoculación, la lisozima añadida en el mosto-vino junto con las BAL inmovilizadas inhibe ligeramente la población de BAL con respecto a la población observada en la vinificación con BAL inmovilizadas sin lisozima. Su efecto fue más efectivo en el régimen de inoculación secuencial, inhibiendo su desarrollo hasta prácticamente el final de la FML. Esta enzima inhibe el crecimiento de las bacterias Gram+ y por lo tanto a las BAL (Guzzon *et al.*, 2012), rompiendo sus paredes celulares, y es utilizada para estabilizar los vinos después de la FML, bloquear la FML o retrasar el inicio de la FML, dependiendo de la dosis empleada. Además, es usado para reducir la dosis de sulfuroso empleada (Lisanti *et al.*, 2019). Probablemente, la baja eficacia de la enzima lisozima para la inhibición de las BAL en los ensayos de coinoculación sea debido a una disminución de su estabilidad durante el desarrollo de la FA.

Paralelamente al recuento de las BAL, se tomaron al azar distintas colonias de las placas de cultivo con MLO para realizar una prueba de Tinción de Gram. Con esta prueba nos aseguramos de diferenciar si las colonias presentes en las placas eran BAL (Gram +) o bien se trataban de bacterias acéticas (Gram -). En la *Figura 5*, a modo de ejemplo, se ilustra una fotografía (x100) de una muestra obtenida con un microscopio óptico donde se observan cocos encadenados de color azul violáceo, lo que demuestra que no son bacterias acéticas y si BAL (OIV, 2016).

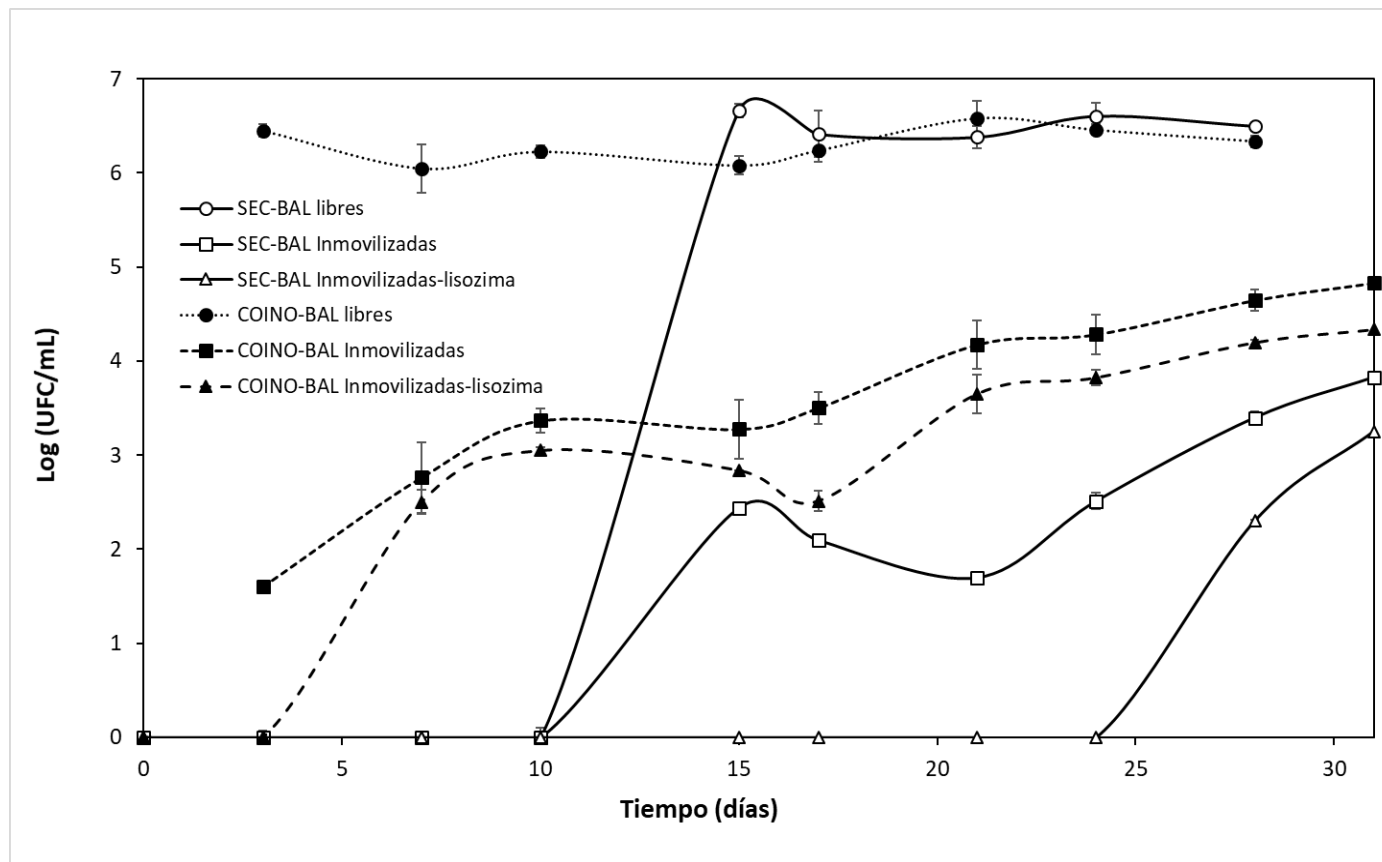


Figura 4: Evolución de la población de BAL durante la fermentación de los mostos-vinos en las distintas vinificaciones (COINO: coinoculación; SEC: secuencial).



Figura 5: Fotografía obtenida por microscopía óptica (x 100) de las BAL.

5.4 EFECTO DEL TIEMPO DE INOCULACIÓN Y TIPO DE INÓCULO EN LA COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL VINO

En la *Tabla 1* se muestra el análisis físico-químico de los vinos después de haber sido embotellados. El análisis de varianza muestra únicamente diferencias estadísticamente significativas para la acidez volátil y el IPT en función del tiempo de inoculación. En el caso del tipo de inóculo, además de estos dos parámetros, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros de color (% rojo, % amarillo y % azul), y para el contenido en ácido málico, antocianos y taninos.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el pH y la acidez total de los vinos con inoculación secuencial y con coinoculación, ni tampoco en función del tipo de inóculo. Por el contrario, para el pH el efecto del tipo de inóculo es diferente en función del tiempo de inoculación. Sin embargo, la diferencia de pH observada fue tan sólo de ~0,1 unidades, valor irrelevante a nivel tecnológico.

Para la acidez volátil (AV), sí que se encuentran diferencias estadísticamente significativas para ambos factores. En primer lugar, para el factor tiempo de inoculación, se observó un valor de AV algo inferior en los vinos con inoculación secuencial (0,42 g/L) respecto a los coinoculados (0,48 g/L). Con respecto al tipo de inóculo, las muestras con BAL libres presentaron una menor AV (0,38 g/L) que aquellas con BAL inmovilizadas o inmovilizadas con lisozima (0,49 g/L). Por último, el efecto del tiempo de inoculación es distinto en función del tipo de inóculo, donde la mayor diferencia se encuentra en los vinos coinoculados entre las BAL libres e inmovilizadas.

Todos los valores de AV están por debajo del límite máximo de 1,2 g/L (expresado en ácido acético), que permite la legislación española (Reglamento CE N° 606/2009, 10 de julio de 2009). Existen estudios contradictorios sobre el efecto que tiene el tiempo de inoculación (coinoculación frente a inoculación secuencia) sobre la AV. Algunos autores han concluido que la AV no se incrementa con un régimen de coinoculación (Antalick, Perello and De Revel, 2013; Tianasuri, Lee and Liu, 2016; Tristezza *et al.*,

2016; Simó *et al.*, 2018), mientras otros observaron un aumento (Cañas *et al.*, 2012; Guzzon *et al.*, 2013). En el presente estudio, si se observó un ligero incremento de la AV en los vinos coinoculados, que puede correlacionarse con el pequeño incremento de la duración de la FML, lo que conllevaría a una mayor producción de metabolitos secundarios, como el ácido acético, por parte de *O. oeni* al tratarse de una BAL con metabolismo heterofermentativo. (Ribereau-Gayon, 2003). Del mismo modo ocurre entre las BAL libres y las otras dos formas de inóculo (BAL inmovilizadas y BAL inmovilizadas con lisozima), donde el retraso en la finalización de la FML puede ser el causante de esta subida de la acidez volátil. En cualquier caso, las diferencias son muy limitadas, lo que genera poca importancia a nivel tecnológico.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el grado alcohólico (GA) de los vinos, ni en función del tiempo de inoculación ni del tipo de inóculo. Estos resultados están en consonancia con los encontrados previamente por Simó *et al.*, (2018), en un estudio a nivel laboratorio con mosto de uva estéril.

En cuanto al contenido en ácido málico, se observaron diferencias estadísticamente significativas para el tipo de inóculo. Los vinos inoculados con BAL libres presentaron el menor valor medio (0,048 g/L), siendo algo superior para los vinos con BAL inmovilizadas (0,080-0,135 g/L).

En el análisis del Índice de Polifenoles Totales (IPT), hay una diferencia estadísticamente significativa en todos los factores. Los vinos con coinoculación presentaron un valor medio ligeramente mayor en comparación con los vinos con inoculación secuencial, observándose una diferencia de tan sólo 1 unidad de IPT. Para el tipo de inóculo, hay una diferencia algo mayor, ya que los vinos con BAL libres tuvieron 5 unidades de IPT más que los restantes vinos. Esto podría deberse a que las cápsulas de ALG-Si absorban compuestos polifenólicos en su estructura porosa. Esto coincide con lo descrito por Massalha *et al.* (2007), que manifiestan que los geles con alginato tienen capacidad para absorber compuestos polifenólicos.

Para la intensidad colorante (IC) no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función de ninguno de los dos factores. En el caso de la tonalidad, no hay diferencia estadísticamente significativa ni para el tipo de inóculo ni para el tiempo de inoculación, pero sí para la interacción entre ambos factores, y podemos decir que el efecto del tipo de inóculo es diferente en función del tiempo de inoculación.

Para los % de amarillo, rojo y azul no existieron diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo de inoculación, lo mismo que ocurre para la concentración de antocianos y taninos. Sin embargo, para estos parámetros sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de inóculo. Las principales diferencias para estos parámetros se observan entre las bacterias libres y las bacterias encapsuladas con lisozima. Los vinos inoculados con BAL libres presentaron altos % de rojo y azul y bajo % de amarillo. Sin embargo, los vinos con lisozima presentan menores % de rojo y azul y mayor % de amarillo. Aunque el aumento del porcentaje de amarillo y la disminución de azules y rojos indican una mayor evolución (Zamora, 2013) de los vinos con lisozima, las diferencias observadas entre los vinos no son importantes.

Los vinos inoculados con BAL libres presentaron un alto contenido en antocianos y taninos, que no se correlacionaron con una mayor intensidad de color, pero sí con un mayor IPT y % rojo. Las menores concentraciones de antocianos y taninos observadas en los vinos elaborados con BAL inmovilizadas podrían deberse a la capacidad de los geles de ALG de adsorben compuestos polifenólicos, tal y como se ha comentado anteriormente. Por otro lado, a pesar de que se ha descrito que la enzima lisozima tiene la capacidad para unirse a taninos y a otros compuestos fenólicos, provocando una disminución del color del vino tinto (Liburdi, Benucci and Esti, 2014), este efecto no se ha observado en nuestros vinos. Finalmente, el tiempo de inóculo no ha generado diferencias significativas ni en los parámetros del color ni en el contenido polifenólico, tal y como demuestran otros estudios (Abrahamse and Bartowsky, 2012; Versari *et al.*, 2016).

Tabla 1. Composición química final de los vinos inoculados con BAL libres, BAL inmovilizadas y BAL inmovilizadas con lisozima, usando inoculación secuencial y coinoculación¹.

Tiempo de inoculación	Tipo de inóculo	pH	AT (g/L)	AV (g/L)	GA (%)	IPT	IC	Tn	Amarillo (%)	Rojo (%)	Azul (%)	Ant (mg/L)	Tan (g/L)	Am (g/L)
Secuencial	Libres	3,85 ^{bc}	4,7 ^a	0,39 ^a	14,75 ^a	50 ^d	9,9 ^a	0,74 ^a	37,1 ^a	50,3 ^b	12,6 ^b	686,4 ^b	1,8 ^{ab}	0,041 ^a
	Inmovilizadas	3,87 ^c	4,8 ^a	0,44 ^a	14,69 ^a	45 ^b	9,9 ^a	0,77 ^{ab}	38,1 ^{ab}	49,5 ^{ab}	12,5 ^b	632,8 ^a	1,6 ^{ab}	0,080 ^{ab}
	Inmovilizadas + Lisozima	3,79 ^a	4,8 ^a	0,44 ^{ab}	14,67 ^a	44 ^{ab}	9,7 ^a	0,75 ^a	37,5 ^a	50,1 ^b	12,4 ^{ab}	622,6 ^a	1,4 ^{ab}	0,0141 ^c
Coinoculación	Libres	3,81 ^{ab}	4,7 ^a	0,37 ^a	14,73 ^a	48 ^c	10,0 ^a	0,75 ^a	37,5 ^a	50,2 ^b	12,3 ^{ab}	677,0 ^b	2,3 ^b	0,050 ^a
	Inmovilizadas	3,84 ^{abc}	4,7 ^a	0,55 ^c	14,64 ^a	42 ^a	10,4 ^a	0,73 ^a	36,8 ^a	50,6 ^b	12,7 ^b	608,1 ^a	2,0 ^{ab}	0,080 ^{ab}
	Inmovilizadas + Lisozima	3,87 ^c	4,8 ^a	0,53 ^{bc}	14,59 ^a	44 ^{ab}	10,5 ^a	0,98 ^b	43,4 ^b	45,2 ^a	11,4 ^a	614,5 ^a	1,2 ^a	0,125 ^{bc}
Tiempo de inoculación	Secuencial	3,84 ^a	4,8 ^a	0,42 ^a	14,70 ^a	46 ^b	9,8 ^a	0,75 ^a	37,6 ^a	50,0 ^a	12,5 ^a	647,3 ^a	1,8 ^a	0,090 ^a
	Coinoculación	3,84 ^a	4,8 ^a	0,48 ^b	14,65 ^a	45 ^a	10,3 ^a	0,82 ^a	39,2 ^a	48,7 ^a	12,1 ^a	633,2 ^a	1,6 ^a	0,085 ^a
Tipo de inóculo	Libres	3,83 ^a	4,7 ^a	0,38 ^a	14,80 ^a	49 ^b	10,0 ^a	0,75 ^a	37,3 ^a	50,3 ^b	12,4 ^{ab}	681,7 ^b	2,0 ^b	0,048 ^a
	Inmovilizadas	3,85 ^a	4,8 ^a	0,49 ^b	14,71 ^a	44 ^a	10,2 ^a	0,75 ^a	37,4 ^{ab}	50,0 ^{ab}	12,6 ^b	620,5 ^a	1,8 ^{ab}	0,080 ^{ab}
	Inmovilizadas + Lisozima	3,83 ^a	4,8 ^a	0,49 ^b	14,68 ^a	44 ^a	10,1 ^a	0,86 ^a	40,4 ^b	47,7 ^a	11,9 ^a	618,5 ^a	1,3 ^a	0,135 ^b
Análisis factorial														
Tiempo de inoculación (T)		n.s.	n.s.	* *	n.s.	* * *	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tipo de inóculo (I)		n.s.	n.s.	* * *	n.s.	* * *	n.s.	n.s.	*	*	*	*	* *	* * *
T*I		* * *	n.s.	*	n.s.	* *	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	0,135

¹Los valores representan las medias para dos factores (n=8 para el tipo de inóculo; n=12 para el tiempo de inoculación). Las letras en las medias indican una diferencia estadísticamente significativa para cada factor individual con un 95,0 % de nivel de confianza. Para el análisis factorial, la significancia estadística para cada factor y su interacción se muestra como: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; n.s.= no significativas. AT: acidez total; AV: acidez volátil; GA: grado alcohólico; IPT: índice de polifenoles totales; IC: intensidad colorante; Tn: tonalidad; Ant: antocianos; Tan: taninos; Am; ácido málico.

5.5 EFECTO DEL TIEMPO DE INOCULACIÓN Y TIPO DE INÓCULO EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL VINO

El resultado del análisis sensorial realizado por el grupo de catadores se muestra en la Tabla 2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ningún descriptor estudiado, exceptuando el ácido láctico (fase olfativa), que sí presentó una diferencia significativa en función del tipo de inóculo. Para este descriptor, los catadores dieron una puntuación ligeramente superior a los vinos elaborados con BAL libres (6,1) respecto a los inoculados con BAL inmovilizadas (5,3-5,4). Este resultado está correlacionado con lo descrito anteriormente, donde se observó una degradación más completa del ácido málico en los vinos inoculados con BAL libres, lo que conlleva una mayor concentración de ácido láctico.

Como se comentó en el anterior apartado, para los parámetros físico-químicos pH, acidez total, tonalidad e intensidad de color no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en función del tiempo de inoculación ni del tipo de inóculo. Estos resultados están en consonancia con lo observado en el análisis sensorial para los descriptores ácido (fase gustativa) y tonalidad e intensidad de capa (fase visual), respectivamente. Finalmente, los catadores no encontraron diferencias estadísticamente significativas para el atributo acético (fase olfativa) ni en función del tiempo de inoculación ni del tipo de inóculo. Probablemente este resultado sea debido a que las diferencias observadas en la acidez volátil de los vinos fueron muy pequeñas.

De este modo, estos resultados ponen de manifiesto que la aplicación de BAL inmovilizadas, con o sin lisozima, bien en régimen de coinoculación o inoculación secuencial, no modificó las características sensoriales de los vinos, a excepción del descriptor láctico.

Tabla 2. Análisis sensorial de los vinos inoculados con BAL libres, BAL inmovilizadas y BAL inmovilizadas con lisozima, usando inoculación secuencial y coinoculación¹.

Tiempo de inoculación	Tipo de inóculo	FASE VISUAL			FASE OLFATIVA							FASE GUSTATIVA				
		Limpidez	Tonalidad	Intensidad de capa	Intensidad de olor	Frutos rojos	Frutos negros	Vegetal (Herbáceo)	Láctico	Acético	Alcohólico	Intensidad gustativa	Amargo	Ácido	Astringencia	Persistencia
Secuencial	Libres	8,2 ^a	7,6 ^a	7,6 ^a	7,0 ^a	5,5 ^a	6,0 ^a	5,4 ^a	5,9 ^a	3,8 ^a	4,8 ^a	7,1 ^a	6,0 ^a	5,7 ^a	5,5 ^a	6,2 ^a
	Inmovilizadas	8,2 ^a	7,1 ^a	7,8 ^a	6,8 ^a	5,8 ^a	6,4 ^a	4,7 ^a	5,7 ^a	3,5 ^a	4,8 ^a	6,8 ^a	5,7 ^a	5,5 ^a	4,9 ^a	5,9 ^a
	Inmovilizadas + Lisozima	8,1 ^a	7,7 ^a	7,9 ^a	6,6 ^a	5,7 ^a	6,4 ^a	5,3 ^a	5,3 ^a	3,7 ^a	5,0 ^a	6,7 ^a	5,5 ^a	5,9 ^a	5,1 ^a	6,1 ^a
Coinoculación	Libres	8,1 ^a	7,4 ^a	8,0 ^a	7,1 ^a	5,5 ^a	6,3 ^a	5,3 ^a	6,3 ^a	3,6 ^a	5,0 ^a	6,7 ^a	5,4 ^a	5,8 ^a	4,8 ^a	6,0 ^a
	Inmovilizadas	8,3 ^a	7,6 ^a	7,8 ^a	6,6 ^a	5,8 ^a	6,0 ^a	5,1 ^a	5,2 ^a	3,8 ^a	4,8 ^a	6,7 ^a	5,2 ^a	5,4 ^a	4,7 ^a	5,5 ^a
	Inmovilizadas + Lisozima	8,0 ^a	7,3 ^a	7,8 ^a	6,5 ^a	5,7 ^a	6,1 ^a	5,2 ^a	5,4 ^a	3,9 ^a	5,0 ^a	6,9 ^a	5,6 ^a	5,6 ^a	4,9 ^a	6,0 ^a
Tiempo de inoculación	Secuencial	8,2 ^a	7,5 ^a	7,8 ^a	6,8 ^a	5,7 ^a	6,3 ^a	5,1 ^a	5,6 ^a	3,7 ^a	5,0 ^a	6,9 ^a	5,7 ^a	5,7 ^a	5,2 ^a	6,1 ^a
	Coinoculación	8,1 ^a	7,4 ^a	7,9 ^a	6,7 ^a	5,7 ^a	6,2 ^a	5,2 ^a	5,6 ^a	3,8 ^a	4,8 ^a	6,8 ^a	5,4 ^a	5,6 ^a	4,8 ^a	5,8 ^a
Tipo de inóculo	Libres	8,1 ^a	7,5 ^a	7,8 ^a	7,1 ^a	5,7 ^a	6,1 ^a	5,3 ^a	6,1 ^b	3,7 ^a	4,9 ^a	6,9 ^a	5,7 ^a	5,7 ^a	5,1 ^a	6,1 ^a
	Inmovilizadas	8,3 ^a	7,3 ^a	7,8 ^a	6,7 ^a	5,7 ^a	6,2 ^a	4,9 ^a	5,4 ^{ab}	3,6 ^a	4,8 ^a	6,8 ^a	5,5 ^a	5,5 ^a	4,8 ^a	5,7 ^a
	Inmovilizadas + Lisozima	8,0 ^a	7,5 ^a	7,8 ^a	6,5 ^a	5,6 ^a	6,3 ^a	5,2 ^a	5,3 ^a	3,8 ^a	5,0 ^a	6,8 ^a	5,5 ^a	5,7 ^a	5,0 ^a	6,0 ^a
Análisis factorial																
Tiempo de inoculación (T)		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Tipo de inóculo (I)		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T*I		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

¹ Los valores representan las medias para dos factores (n=8 para el tipo de inóculo; n=12 para el tiempo de inoculación). Las letras en las medias indican una diferencia estadísticamente significativa para cada factor individual con un 95,0 % de nivel de confianza. Para el análisis factorial, la significancia estadística para cada factor y su interacción se muestra como: * = p<0,05; ** = p<0,01; *** = p<0,001; n.s.= no significativas.

6 Conclusiones

A continuación, se muestran las conclusiones del estudio realizado:

- La cinética de producción de CO₂ no se encuentra afectada por la inoculación de BAL inmovilizadas en cápsulas de ALG-Si, ya sea régimen de coinoculación o inoculación secuencial, realizando la FA al cabo de 10 días.
- La degradación del ácido málico por parte de las BAL inmovilizadas se produjo satisfactoriamente llegando a una concentración de ácido málico por debajo de 0,2 g/L.
- Las cápsulas ALG-Si protegieron a las BAL del efecto antimicrobiano de la lisozima.
- En las vinificaciones con BAL inmovilizadas, la población de BAL presentes en forma libre en el vino fue insuficiente para comenzar la degradación del ácido málico.
- Los vinos en régimen de coinoculación y los vinos inoculados con BAL inmovilizadas presentaron una ligera mayor acidez volátil, si bien este incremento no fue percibido por los jueces.
- Los vinos elaborados con las BAL encapsuladas presentan un menor contenido en antocianos y taninos, y un menor valor de IPT y % de rojo. Estas diferencias no fueron percibidas en el análisis sensorial por los jueces.
- Las características sensoriales de los vinos no se modificaron ni por el tiempo de inoculación ni por el tipo de inóculo, a excepción del descriptor ácido láctico que fue algo mayor para los vinos elaborados con BAL libres.

7 Bibliografía

- Abrahamse, C. E. and Bartowsky, E. J. (2012) 'Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition'. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), pp. 255–265.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., Guilloux-Benatier, M. (2004) 'Saccharomyces cerevisiae-Oenococcus oeni interactions in wine: Current knowledge and perspectives'. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), pp. 141–154.
- Antalick, G., Perello, M. C. and De Revel, G. (2013) 'Co-inoculation with yeast and LAB under winery conditions: Modification of the aromatic profile of merlot wines'. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), pp. 223–232.
- Suárez Lepe, A. and Morata, A. (2015) 'Levaduras para vinificación en tinto (Yeasts for red winemaking)'. AMV Ediciones.
- Bate-Smith, E. C. (1981) 'Astringent tannins of the leaves of Geranium species'. *Phytochemistry*, 20(2), pp. 211-216.
- Bauer, R. and Dicks, L. M. T. (2017) 'Control of malolactic fermentation in wine. A Review'. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), pp. 74-88.
- Betteridge, A. L. *et al.* (2018) 'Application of directed evolution to develop ethanol tolerant *Oenococcus oeni* for more efficient malolactic fermentation'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(2), pp. 921-932.
- Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A. and Guzzon, R. (2008) 'Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: Procedures, physico-chemical features and bioactivity'. *Journal of Materials Chemistry*, 18(40), pp. 4839–4848.
- Cañas, P. M., Pérez-Martín, F., García Romero, E., Seseña, S. and Palop-Herreros, M.L (2012) 'Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines'. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), pp. 245–254.
- Coradin, T., Mercey, E., Lisnard, L. and Livage, J. (2001) 'Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation'. *Chemical Communications*, 23, pp. 2496-2497.
- Coradin, T., Nassif, N. and Livage, J. (2003) 'Silica-alginate composites for microencapsulation', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5–6), pp. 429–434.
- Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. and Fleet, G.H. (1985) 'Practical implications of malolactic fermentation: a review'. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, pp. 290-301.
- Guilloux-Benatier, M., Pageault, O., Man, A. and Feuillat, M. (2000) 'Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes'. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), pp. 193–197.
- Guzzo, J., Jobin, M. P. and Diviès, C. (1998) 'Increase of sulfite tolerance in *Oenococcus oeni* by means of acidic adaptation'. *FEMS Microbiology Letters*, 160(1), pp. 43-47.

Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S. and Cavazza, A. (2012) 'Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme'. *Annals of Microbiology*, 62, pp. 381–390.

Guzzon, R., Román, T., Pedron, M., Malacarne, M., Nicolini, G. and Larcher, R. (2013) 'Simultaneous yeast-bacteria inoculum. A feasible solution for the management of oenological fermentation in red must with low nitrogen content'. *Annals of Microbiology*, 63(2), pp. 805–808.

Henick-Kling, T. and Park, Y. H. (1994) 'Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation'. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45(4), pp. 464-469.

Hidalgo, J. (2011) 'Tratado de Enología'. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.

Homich, L. J., Joshua, A., Scheinberg, R.E. and Gardner, D.M. (2016) 'Effects of co-inoculation on wine-quality attributes of the high-acid, red hybrid variety chambourcin'. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(2), pp. 245–250.

Johnsson, T., Nikkila, P., Toivonen, L., Rosenqvist, H. and Laakso, S. (1995) 'Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium'. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), pp. 4497-4499.

Jussier, D., Morneau, A. D. and De Orduña, R. M. (2006) 'Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay'. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), pp. 221–227.

Karel, S. F., Libicki, S. B. and Robertson, C. R. (1985) 'The immobilization of whole cells: Engineering principles'. *Chemical Engineering Science*, 40(8), pp. 1321-1354.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R. and Koutinas, A.A.(2004) 'Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review'. *Food Microbiology*, 21(4), pp. 377–397.

Kourkoutas, Y., Manojlović, V. and Nedović, V. A. (2010) 'Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider', in *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 1, pp. 327- 344.

Lerm, E., Engelbrecht, L. and du Toit, M. (2010) 'Malolactic fermentation: The ABC's of MLF'. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), pp. 186–212.

Liburdi, K., Benucci, I. and Esti, M. (2014) 'Lysozyme in Wine: An Overview of Current and Future Applications'. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), pp. 1062–1073. Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C. and Moio, L. (2019) 'Alternative Methods to SO₂ for Microbiological Stabilization of Wine'. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(2), pp. 455–479.

Livage, J. (1998) 'Sol-gel synthesis of heterogeneous catalysts from aqueous solutions'. *Catalysis Today*, 41(1–3), pp. 3–19.

Lupo, B., González-Azón, C. and Maestro-Garriga, A. (2012) 'Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones'. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), pp. 130-151.

- Maicas, S. (2001) 'The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), pp. 35–39.
- Rodríguez-Nogales, J. M. (2017) 'Estrategias biotecnológicas para mejorar la gestión de la fermentación maloláctica en vinos'. *Revista de la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León*. 65, pp. 27-31.
- Massalha, N., Basheer, S. and Sabbah, I. (2007) 'Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels'. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46(21), pp. 6820-6824.
- Melvik, J. and Dornish, M. (2004) 'Alginate as a carrier for cell immobilisation'. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*, 8(A), pp. 33-51.
- Mills, D. A., Rawsthorne, H., Parker, C., Tamir, D. and Makarova, K. (2005) 'Genomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 and its relevance to winemaking'. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), pp. 465–475.
- Mira de Orduña, R. (2010) 'Climate change associated effects on grape and wine quality and production'. *Food Research International*, 43(7), pp. 1844–1855.
- OIV (2016) 'Codigo Practicas Enológicas'.
- Peynaud, E. and Blouin, J. (2003) 'Enología Práctica. Conocimiento y Elaboración del Vino'. Ediciones Mundi Prensa (España).
- Pilkington, P. H., Margaritis, A., Mensour, N.A. and Russell, I. (1998) 'Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: A review', *Journal of the Institute of Brewing*, 104(1), pp. 19-31.
- Ravindra Reddy, K. and Sabitha Reddy, P. (2010) 'Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid'. *International Journal of PharmTech Research*, 2(4), pp. 2198-2203.
- Reguant, C., Olguin, N., Bordas, M. and Bordons, A. (2010) 'Nuevos retos para *Oenococcus oeni* como consecuencia del cambio climático'. *ACE: Revista de enología*, pp. 1–5.
- Ribéreau Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. (2003) 'Tratado de Enología. Vol. 1'. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur.
- Rossi, J. and Clementi, F. (1984) 'L-malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc Oenos*' *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 35, No. 2, pp 100-103
- Servetas, I., Berbegal, N., Camacho, A., Bekatorou, S.F., Singh, P., Nigam, N., Drouza, C. and Koutinas, A.A. (2013) '*Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* immobilized in different layers of a cellulose/starch gel composite for simultaneous alcoholic and malolactic wine fermentations'. *Process Biochemistry*, 48, pp. 1279–1284.
- Simó, G., Vila-Crespo, J., Fernández-Fernández, E., Ruipérez, V. and Rodríguez-Nogales, J.M. (2017a) 'Highly efficient malolactic fermentation of red wine using encapsulated bacteria in a robust biocomposite of silica-alginate'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(25), pp. 5188–5197.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. and Rodríguez-Nogales, J.M. (2017b) 'Silica–alginate-encapsulated bacteria to enhance malolactic fermentation performance in a stressful environment'. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(3), pp. 342–349.

- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. and Rodríguez-Nogales, J.M. (2018) 'Malolactic fermentation induced by silica-alginate encapsulated *Oenococcus oeni* with different inoculation regimes'. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, pp. 12377.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V. and Rodríguez-Nogales, J.M. (2019) 'Effect of stressful malolactic fermentation conditions on the operational and chemical stability of silica-alginate encapsulated *Oenococcus oeni*'. *Food Chemistry*, 276, pp. 643–651.
- Taniasuri, F., Lee, P. R. and Liu, S. Q. (2016) 'Induction of simultaneous and sequential malolactic fermentation in durian wine', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 230, pp. 1–9.
- Torriani, S., Felis, G. E. and Fracchetti, F. (2011) 'Selection criteria and tools for malolactic starters development: An update'. *Annals of Microbiology*, 61(1), pp. 33–39.
- Tristezza, M., Di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G. and Mita, G. (2016) 'Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine'. *LWT - Food Science and Technology*, 66, pp. 406–412.
- Trivedi, U. J., Bassi, A. S. and Zhu, J. (2006) 'Investigation of phenol removal using sol-gel/alginate immobilized soybean seed hull peroxidase'. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 84(2), pp. 239–247.
- Versari, A., Patrizi, C., Parpinello, G.P., Mattioli, A.U., Pasini, L., Meglioli, M and Longhini, G. (2016) 'Effect of co-inoculation with yeast and bacteria on chemical and sensory characteristics of commercial Cabernet Franc red wine from Switzerland'. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), pp. 876–882.
- Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E. and Hernanz-Moral, M.C. (2010) 'Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions'. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 122(32), pp. 90–99.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. and Lee, T.H. (1985) 'Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A Review'. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, pp. 302- 313.
- Yabur, R., Bashan, Y. and Hernández-Carmona, G. (2007) 'Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion'. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), pp. 43–53.
- Zamora, F. (2013) 'La química del color del vino', *ACE: Revista de enología*.
- Zamora, F. (2003). "Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos Científicos y Prácticos". Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa.
- Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P. and Krieger, S. (2009) 'Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines', *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(1), pp. 49–55.