



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**INMOVILIZACIÓN DE *Oenococcus oeni*
EN MATRICES DE ALGINATO-SÍLICE
PARA EL DESARROLLO DE LA
FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN
VINOS TINTOS.**

Alumno: David Ledo Varela

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutores: Josefina Vila Crespo

Encarnación Fernández Fernández

Septiembre de 2014

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	2
2. Introducción	2
3. Objetivo	7
4. Material y métodos	7
4.1. Preparación del inóculo microbiano	7
4.2. Inmovilización de bacterias en esferas de alginato -sílice	7
4.2.1. Preparación del reactivo de sílice	7
4.2.2. Preparación del alginato de sodio	8
4.2.3. Incorporación de la biomasa microbiana	8
4.2.4. Preparación del cloruro de calcio	8
4.2.5. Formación del gel de alginato de calcio	8
4.2.6. Recubrimiento con APTES	9
4.3. Fermentación maloláctica	9
4.3.1. Vino utilizado	9
4.3.2. Experiencias realizadas	10
4.4. Análisis químicos y microbiológicos	12
4.4.1. Capacidad de retención de las bacterias por las esferas	12
4.4.2. Determinación de ácido málico	12
4.4.3. Resistencia mecánica de las esferas	14
5. Resultados y discusión	14
5.1. Primer diseño de experimentos	14
5.2. Segundo diseño de experimentos	17
5.2.1. Resistencia mecánica de las esferas	18
5.2.2. Degradación de ácido málico	20
5.2.3. Capacidad de retención de bacterias de las esferas	21
6. Conclusiones	22
7. Bibliografía	22

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio es mejorar la gestión de la fermentación maloláctica en vinos tintos mediante el uso de células de inmobilizadas. Se empleó un método de inmobilización por atrapamiento en esferas de alginato-sílice, en el que se gelifica el alginato de sodio en presencia de cloruro cálcico, y posteriormente se recubre con un silano organofuncional como es el 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES) por inmersión en agitación. Se estudió la resistencia mecánica de las esferas, la capacidad de retención de bacterias por las esferas y la cinética de fermentación, variando las concentraciones de APTES y los pH de la disolución de recubrimiento.

2. INTRODUCCIÓN

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso biológico ampliamente utilizado en la elaboración de vinos tintos que consiste, principalmente en la transformación del ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono. Como resultado se consigue una reducción de la acidez y un aumento del pH del vino. Además, se sintetizan una serie de compuestos metabólicos secundarios que producen cambios sensoriales positivos en el vino. Estas modificaciones analíticas y sensoriales repercuten en la calidad del vino, obteniéndose vinos menos ácidos y ásperos y con una mayor variabilidad de aromas. Además, la FML proporciona estabilidad microbiológica al vino final (Vila-Crespo *et al.*, 2010).

La FML está catalizada por las bacterias acidolácticas (BAL) (Davis *et al.*, 1985). Las BAL aisladas a partir del vino pertenecen a los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Son microaerófilas y capaces de crecer en las condiciones anaerobias de un vino en fermentación. Estas bacterias fermentan las hexosas principalmente en lactato (homofermentativas) o en una mezcla de lactato, etanol o acetato y dióxido de carbono (heterofermentativas) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). La principal especie implicada en el desarrollo de la FML es *Oenococcus oeni* (Bauer *et al.*, 2004).

Las BAL son capaces de desarrollar la FML en condiciones bastante diversas, sin embargo, varios componentes del vino pueden inducir estrés en ellas, como el etanol, el pH ácido, los compuestos fenólicos, el dióxido de azufre, etc. Estos componentes tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano y en la duración de la FML (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Cuando la FML tiene lugar en un medio muy alcohólico, como el vino, el crecimiento bacteriano es muy lento y la FML puede durar semanas o incluso meses (Zhang *et al.*, 2006).

Actualmente el cambio climático está repercutiendo mucho en la agricultura. El incremento del consumo de combustibles fósiles y determinados cambios en los usos del suelo son los factores que más afectan a la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera, lo que provoca el conocido como calentamiento global, con una elevación de la temperatura media mundial y una fluctuación en los periodos de lluvias. Traduciendo esto a la viticultura, estas alteraciones climáticas provocan, principalmente, un crecimiento más rápido y una maduración desequilibrada del viñedo. En un clima más cálido que el óptimo, la viña experimentará todos los cambios fenológicos mucho más rápidamente, por lo que la uva alcanzará su madurez con altos niveles de azúcar, lo que se conllevará un mayor grado alcohólico. A lo largo de los últimos años se han constatado modificaciones importantes en la composición de los vinos, debido al cambio climático, tales como un aumento del grado alcohólico del 12,3% al 13,9% en los vinos de Australia entre los años 1984 y 2001; y de un 12,5% a un 14,8% en Napa Valley entre 1971 y 2001 (Vila-Crespo *et al.*, 2010). Esta modificación en la composición de las vendimias, provocan que las BAL responsables de FML tengan aún mayores dificultades para realizarla (Reguant *et al.*, 2010).

Debido a estas circunstancias ha surgido la necesidad de buscar nuevas estrategias para mejorar el proceso de la FML. Una línea de actuación es la selección de cepas de BAL con mayor resistencia al estrés por el alcohol. Otra técnica estudiada es la coinoculación de levaduras y bacterias durante la fermentación alcohólica. Las bacterias pueden de esta forma adaptarse mejor a la creciente concentración de etanol y crecer en medio con una gran cantidad de nutrientes (Zhang *et al.*, 2006).

Una tecnología que permite que tengan lugar FML más rápidas y fiables es la inmovilización de bacterias (Maicas *et al.*, 2001). La inmovilización de BAL permite separar la fase de crecimiento microbiano de la etapa de conversión del ácido málico; de esta manera se podría inocular al vino con una alta concentración de BAL, lo que aumentaría significativamente la posibilidad de tener una fermentación rápida y

completa (Maicas *et al.*, 1999b). Otras razones que apoyan el uso de esta técnica son: (i) las técnicas de inmovilización de células permiten el aumento de la tolerancia de estos microorganismos a situaciones de estrés ambiental (pH, etanol, etc); (ii) permite la realización de la FML con una selección de los microorganismos inmovilizados; (iii) mejora la productividad de la FML por las altas densidades celulares; (iv) permite la reutilización de las células y la aplicación del proceso continuo; (v) menor coste de recuperación y reciclaje (Kourkoutas *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006); (vi) se puede controlar la producción de productos secundarios, y además la FML se puede iniciar y detener en el momento deseado por el enólogo y no se ve afectada negativamente la calidad del vino (Maicas *et al.*, 2001).

La inmovilización celular se define como el confinamiento físico o localización de las células intactas en una determinada región del espacio con la preservación de su actividad metabólica (Kourkoutas *et al.*, 2004). Dentro de los distintos tipos de inmovilización, el atrapamiento dentro de una matriz porosa representa la solución más sencilla y efectiva para inmovilizar microorganismos que no tienen una tendencia natural a unirse, como las BAL. Diversos materiales han sido probados como soportes de inmovilización de células para el desarrollo de la FML en vino y sidra como son: alginato de calcio, poliacrilamida, κ -carragenato, alcohol polivinílico, astillas de madera, gel de pectato de calcio, esponja de celulosa y materiales celulósicos deslignificados (Maicas *et al.*, 2001).

El material más ampliamente empleado para la inmovilización de células es el alginato de calcio, por su biocompatibilidad y flexibilidad, pero debido a su tamaño de poro, los sustratos con pesos moleculares superiores a 300.000 no pueden filtrarse a través de la cápsula, lo que reduce su rango de aplicación (Kurayama *et al.*, 2010). Se ha estudiado la posibilidad de inmovilizar *O. oeni* en geles de alginato, pero para mejorar su aplicabilidad industrial es preciso mejorar su propiedades mecánicas y su estabilidad química (Coradin *et al.*, 2003, Callone *et al.*, 2008, Guzzon *et al.*, 2011).

Una alternativa para optimizar la estabilidad de la matriz de alginato es el diseño de geles de inmovilización mixtos de sílice-alginato (Coradin *et al.*, 2003). Soportes mixtos diseñados con compuestos orgánicos e inorgánicos reciben cada vez más atención como unas de las nuevas clases de materiales avanzados que ofrecen la oportunidad de combinar las propiedades deseables de un polímero orgánico

(flexibilidad, elasticidad y biocompatibilidad) con las de los compuestos inorgánicos (rigidez y resistencia química) (Kurayama *et al.*, 2010).

La elaboración de estos materiales es posible gracias a recientes avances en la química del sol-gel que permite el desarrollo de geles inorgánicos estables a temperatura ambiente empleando precursores de sílice. Los precursores más populares son los alcóxidos de silicio ($\text{Si}(\text{OR})_4$) que contienen un grupo orgánico (R: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, etc). Estos compuestos en contacto con el agua sufren una hidrólisis liberándose una molécula de alcohol (ROH) y creándose un grupo silanol (Si-OH). A continuación, tiene lugar una policondensación entre los grupos silanoles. Con el tiempo, la policondensación produce partículas coloidales que se enlazan unas con otras para formar una estructura tridimensional que se extiende por el medio líquido, dando lugar a un gel (Coradin *et al.*, 2003).

Una opción para la formación de esferas mixtas de alginato-sílice es el método de coacervación. El primer intento para la preparación de microcápsulas de sílice asociado a alginato fue hace 15 años, mezclando sílice coloidal (~ 10 nm) acidificado a pH 7 con una solución de alginato de sodio antes de emprender el proceso de gelificación con Ca^{2+} (Coradin *et al.*, 2003). El uso de tetrametoxisilano (TMOS) como fuente de sílice fue empleado en 1995 por primera vez. Se suspendieron perlas de alginato de calcio en una solución de TMOS en hexano. La hidrólisis parcial del alcóxido condujo a la formación de especies de silicio solubles en agua que impregnaron el gel de alginato y que polimerizan dentro de la cápsula. El proceso de Biosil en fase gaseosa también se aplicó recientemente para la encapsulación de células animales en esferas de alginato-sílice (Coradin *et al.*, 2003). En un procedimiento típico de elaboración de microcápsulas, el tamaño de las gotas de alginato se controla por un flujo de aire en la punta de la boquilla de extrusión. Se saturó este flujo de aire con una mezcla de vapores de silicio, para así impregnar las gotas con precursores de sílice.

Otra estrategia para la inmovilización de células con geles mixtos de alginato-sílice es el método multicapa. El primer paso de esta técnica consiste en encapsular las células en geles de alginato de calcio. El polisacárido ácido algínico es un copolímero lineal de ácido β -D-manurónico y α -L-gulurónico. A pH neutro, se desprotona quedando una carga negativa global, que se compensa por la unión de iones de sodio. La adición de cationes divalentes, tales como Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} inducen

la reticulación del polímero, y por lo tanto la formación de gel (Coradin *et al.*, 2003). A continuación, los geles de alginato de calcio (en forma de esferas) se pueden recubrir con una red inorgánica basada en materiales de sílice. A pH neutro, existe una repulsión electrostática entre los grupos carboxílicos (cargados negativamente) del alginato y las especies de sílice (con carga negativa) que impiden un recubrimiento directo. Por ello, se han desarrollado protocolos para depositar una capa de sílice sobre perlas de alginato previamente recubiertas con polielectrolitos catiónicos, que actúan como agentes precipitantes. (Coradin *et al.*, 2003).

Recientemente se ha diseñado una nueva ruta que permite un recubrimiento directo de las perlas de alginato, sin la necesidad del uso de costosos intermediarios químicos, como son los polielectrolitos catiónicos. Se basa en el uso de un alcóxido de silicio que contiene un grupo amino (3-aminopropiltriétoxosilano, APTES) (Kurayama *et al.*, 2010). Este compuesto se mantiene estable sin precipitaciones en forma de oligómero en una solución acuosa y tiene el potencial de interactuar electrostáticamente con otros materiales que tengan grupos hidroxilo y carbonilo, y el etanol liberado durante la hidrólisis de APTES puede ser eliminado fácilmente. Se utiliza APTES para formar una capa externa de sílice sobre las perlas de alginato, ya que los grupos amino cargados positivamente pueden interactuar con la superficie de alginato para anclar el depósito mineral (Figura 1).

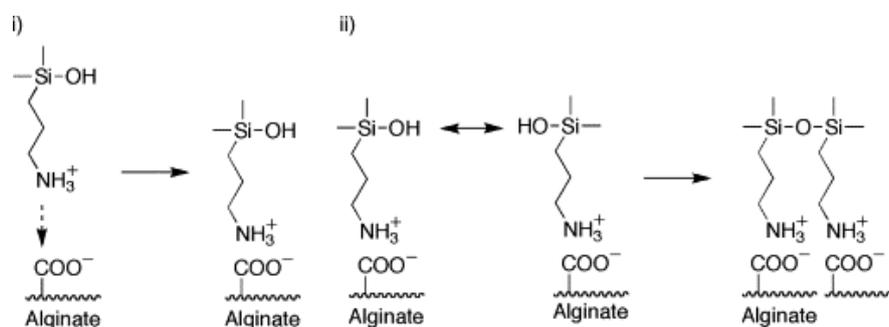


Figura 1: Posible mecanismo para la formación de las esferas híbridas de alginato-APTES: (i) proceso de adsorción vía electrostática por interacción de los grupos amino protonados del APTES y los grupos carboxílicos del alginato y (ii) proceso de condensación para formar la red de polisilanos en la superficie de las esferas de alginato (Kurayama *et al.*, 2010).

3. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es optimizar las condiciones de inmovilización de *O. oeni* en un gel híbrido de alginato-sílice con APTES atendiendo a tres criterios: (i) intensificar la actividad catalítica del soporte, (ii) incrementar su resistencia mecánica y (iii) mejorar su capacidad para retener las células bacterianas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PREPARACIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO

Las bacterias lácticas utilizadas fueron de la cepa *Oenococcus oeni*, (LALVIN VP41 de Lallemand Bio, S.L.) se presentan en forma liofilizada por lo que deben rehidratarse en agua estéril, a la concentración de 20 veces su peso en agua, a 20°C y durante 15 minutos.

Esta operación y todas las asociadas a la preparación del inóculo se realizaron de forma aséptica, utilizando una cabina de flujo laminar (Telstar Mini-V /PCR) y con el material de vidrio previamente autoclavado durante 20 min a 121°C o utilizando material de plástico estéril.

4.2. INMOVILIZACIÓN DE BACTERIAS EN ESFERAS DE ALGINATO-SÍLICE

Para la inmovilización de las bacterias se optimizó el método multicapa propuesto por Kuruyama *et al.* (2010). El método se basa en la formación de esferas por gelificación de alginato de sodio en presencia de cloruro cálcico, y su posterior recubrimiento con 3-aminopropiltrietsilano (APTES).

4.2.1. Preparación del reactivo de sílice

Se utilizó APTES (Sigma-Aldrich) en disolución líquida. Este reactivo debe pasar previamente una fase de hidrólisis durante 12 horas en agitación, por lo que se mezcló con agua estéril a razón 1/9, en condiciones asépticas y en tubos estériles. Tras la fase de hidrólisis, se prepararon disoluciones de APTES hidrolizado en agua estéril a concentraciones 3,28, 6,65 y 9,83% para un primer ensayo, y 0,50, 1,25 y 2,00 % (v/v), para el experimento final (ver tablas 1 y 2).

4.2.2. Preparación del alginato de sodio

Se utilizó alginato de sodio en polvo (Panreac) para preparar una disolución del mismo a una concentración del 2%. El alginato sólido se añadió al agua estéril muy lentamente y en agitación, en condiciones asépticas y guardándolo en tubos estériles.

4.2.3. Incorporación de la biomasa microbiana

Las bacterias rehidratadas se incorporaron a la disolución de alginato de sodio, consiguiendo una concentración final del 0,1 g/L. ($\approx 8 \times 10^9$ UFC/mL)

4.2.4. Preparación del cloruro de calcio

Se utilizó cloruro de calcio sólido para preparar una disolución 0,2M del mismo en agua destilada. Una vez conseguida la disolución, se esterilizó mediante filtración a vacío, en un filtro con una membrana estéril de nitrato de celulosa (diámetro de poro de 0,20 μm), conectado a una bomba de vacío (Millipore 100 mbar, 10 kPascal, 75 mmHg), que retendrá todos los posibles microorganismos que pueda contener ese medio. Tras la filtración el medio se guardó en tubos estériles y en condiciones asépticas.

4.2.5. Formación del gel de alginato de calcio

Para esta operación, se dejó gotear la disolución de alginato de sodio mezclada con la biomasa en la disolución de cloruro cálcico en agitación. Se colocaron 250 mL de cloruro de calcio 0,2M en un vaso de precipitados estéril y se mantuvieron en agitación con ayuda de un dispositivo magnético.

Por otra parte, se colocaron 10 mL de alginato de sodio en una jeringuilla estéril de 10 mL sin émbolo (de esta forma se conseguirá realizar el goteo), situada a 20 cm de separación vertical de la disolución de cloruro cálcico con la ayuda de un pie de bureta. Se esperó a que se vaciase la jeringuilla, y se repitió 10 veces esta operación. Tras eso se dejaron las esferas dos horas más de agitación para asegurar la formación del gel. De aquí se obtuvieron aproximadamente 2.000 esferas.

4.2.6. Recubrimiento con APTES

Cada 20 esferas obtenidas en el proceso anterior se introdujeron en tubos estériles con 10 ml de disolución de APTES, también en condiciones asépticas. Previamente se corrigió el pH de las distintas disoluciones de APTES con ácido clorhídrico 0,5N a 4,0, 5,5 y 7,0 según el experimento (ver tabla 1 y 2). El tiempo de residencia de las esferas en contacto con el APTES fue de 15,0, 37,5 y 60,0 min para los distintos experimentos del primer experimento, y 60 min, para todos los ensayos del segundo experimento (ver tablas 1 y 2). Pasado este tiempo, se lavaron con agua estéril, y en condiciones asépticas. En la Figura 2 se muestra una fotografía de las esferas de alginato-síllice tratadas con APTES.



Figura 2: Esferas de alginato-síllice tratadas con APTES.

4.3. FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA

4.3.1. Vino utilizado

Se partió de un vino tinto sin realizar la FML de la variedad Tinta de Toro procedente de Bodegas Fariña, S.L. (Toro, Zamora), al que se corrigió el nivel de

ácido málico hasta los 3 g/L y se añadió un activador de la FML (ACTIML, Lallemand) a una dosis de 20 g/hL. El vino presentó los siguientes parámetros analíticos básicos: densidad: 993 g/L; IPT: 62,5; azúcares reductores: 2,45 g/L; ácido málico: 1,85 g/L; pH: 3,7; grado alcohólico: 14,2 %(v/v).

4.3.2. Experiencias realizadas

En un primer experimento las tres variables a estudiar están relacionadas con el reactivo APTES y van a determinar las experiencias a realizar. Son las siguientes:

- Concentración de APTES hidrolizado: 3,28, 6,65 y 9,83% (v/v).
- pH de la disolución del APTES hidrolizado: 4,0, 5,5 y 7,0.
- Tiempo de residencia de las esferas en APTES: 15,0, 37,5 y 60,0 min.

Por lo tanto se realizaron 15 experimentos, siguiendo un diseño Box-Behnken aleatorio de un solo bloque sin réplicas y con tres ejecuciones del punto central. Además se realizaron dos experimentos control, uno de ellos con esferas de alginato sin recubrimiento (experimento nº16), y el otro con bacterias sin inmovilizar (experimento nº17).

Tabla 1: Diseño de experimentos para el primer ensayo

Experimento nº:	[APTES hydr.]	Ph	Tiempo
	% (v/v)		Minutos
1	3,28%	4,0	37,5
2	6,65%	7,0	15,0
3	6,65%	4,0	15,0
4	9,83%	7,0	37,5
5	6,65%	4,0	60,0
6	3,28%	5,5	15,0
7	9,83%	4,0	37,5
8	9,83%	5,5	15,0
9	9,83%	5,5	60,0
10	3,28%	7,0	37,5
11	6,65%	7,0	60,0
12	3,28%	5,5	60,0
13	6,65%	5,5	37,5
14	6,65%	5,5	37,5
15	6,65%	5,5	37,5
16	0,00%	5,5	60,0
17	Bacterias sin inmovilizar		

A cada uno de los experimentos se le estudió la capacidad de degradación de ácido málico (se explicará más detalladamente en el apartado 4.4). Para cada fermentación se utilizaron 10 mL de vino previamente esterilizado mediante filtración a vacío, al que se le añadieron 20 esferas en condiciones asépticas en un tubo estéril, y se mantuvieron a 22°C.

Tras este ensayo se diseñó un segundo experimento, variando las concentraciones de APTES hidrolizado y conservando los mismos pH, y desestimando el tiempo como variable manteniendo un tiempo de 60 min para todos los casos. Los nuevos parámetros fueron los siguientes:

- Concentración de APTES hidrolizado: 0,50, 1,25 y 2,00% (v/v).
- pH de la disolución: 4,0, 5,5 y 7,0.

Por lo tanto se realizaron 11 experimentos, siguiendo un diseño factorial 3² aleatorio de un solo bloque sin réplicas y con tres ejecuciones del punto central. Además se realizaron dos experimentos control, uno de ellos sin recubrimiento (experimento nº12), y el otro con bacterias sin inmovilizar (experimento nº13).

Tabla 2: Diseño final de experimentos.

Caso nº:	[APTES hidr.]	pH
	% (v/v)	
1	0,50%	4,0
2	1,25%	4,0
3	2,00%	4,0
4	0,50%	5,5
5	1,25%	5,5
6	2,00%	5,5
7	0,50%	7,0
8	1,25%	7,0
9	2,00%	7,0
10	1,25%	5,5
11	1,25%	5,5
12	0,00%	5,5
13	Bacterias sin inmovilizar	

A cada uno de los experimentos (13 fermentaciones distintas), se le analizaron tres parámetros distintos: porcentaje de degradación de ácido málico, capacidad de retención de bacterias y resistencia mecánica de las esferas (se explicará más detalladamente en el apartado 4.4)

4.4. ANÁLISIS QUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS

4.4.1. Capacidad de retención de bacterias de las esferas

La capacidad de retención de las BAL en las esferas se midió mediante un recuento de colonias tras siembra en masa de diluciones decimales del vino a las 24 horas de residencia de las esferas en vino (Gamazo et al., 2005).

Para el recuento de bacterias lácticas se siguió el siguiente método. Se realizaron cinco diluciones decimales de cada muestra, ya que no se espera encontrar demasiadas bacterias en el vino. Para hacer la dilución 10^{-1} , se toma de forma aséptica mediante una pipeta estéril 1 mL del vino en 9 mL de agua estéril. Para hacer la siguiente dilución 10^{-2} , se coge con otra pipeta estéril 1 mL de la dilución anterior (10^{-1}) en 9 mL de medio de agua estéril. Se repitió la misma operación sucesivamente para el resto de diluciones. Cada dilución se agitó utilizando un agitador de tubos hasta conseguir una mezcla totalmente homogénea.

Para realizar la siembra en masa se depositó 1 mL de la muestra directa y 1 mL de cada dilución en placas de *Petri* estériles y vacías, a las que se añadió posteriormente de 15 a 20 ml del medio de cultivo sólido agar MRS (Tween Biolife), previamente autoclavado, fundido y atemperado a unos 37-40°C en un baño de agua. Posteriormente se agitaron para homogeneizar y se dejaron solidificar. Tras esto se cierran con film y se incuban a 24°C.

Tras la incubación y cuando se observó crecimiento microbiano, se contaron aquellas placas en las que hubieran crecido entre 30 y 300 UFC utilizando una lupa para contar colonias, y se aplicó el factor de dilución para obtener el resultado en UFC /mL.

4.4.2. Determinación de ácido málico

Se observó la evolución del ácido málico en el vino a lo largo de la fermentación maloláctica, mediante cromatografía de papel. Para determinar la concentración de ácido málico consumido a un tiempo determinado (96 horas) se empleó un kit enzimático (TDI España).

Para llevar a cabo la cromatografía en papel se prepararon disoluciones patrón de ácido málico con un contenido de 0,5, 1,0, 2,0 y 4,0 g/L utilizando como disolvente una mezcla hidroalcohólica en etanol al 12%, y también el eluyente, que es una mezcla de 50 mL de una disolución de 1g de azul de bromofenol en 1 L de n-butanol y 20 mL de una disolución de ácido acético al 50% (500 mL de agua destilada + 500 mL de acético puro).

Se utilizó papel cromatográfico y a unos 2 cm del borde inferior, se trazó una recta dividiéndola en segmentos. Se depositaron 2 μ L de vino en el papel utilizando una micropipeta y de la misma forma los patrones. Para desarrollar el cromatograma se llevó el papel a la cubeta que contiene el eluyente y que está saturada con sus vapores; se sumerge el papel 1 cm y se dejó que ascendiese (3 horas). Por último, se saca el papel cromatográfico y se deja secar al aire para observar las tres manchas de los patrones situadas a la misma altura, pero de distinto diámetro. En la vertical correspondiente al vino, se encontraran según contenga o no ácido málico tres manchas de color amarillo a distintas alturas que corresponden a:

- Mancha superior: ácidos láctico y succínico solapados.
- Mancha central: ácido málico.
- Mancha inferior: ácido tartárico.

El test enzimático consiste en la medida al espectrofotómetro de una muestra de vino antes y después de llevar a cabo una determinada reacción para la cual se añaden las siguientes soluciones:

- 0,5 mL de la solución 1 (tampón de gliciglicina; ácido L-glutámico 440 mg)
- 0,10 mL de la solución 2 (210 mg de β -NAD liofilizado reconstruido en 6 mL de agua)
- 0,45 mL de agua bidestilada
- 0,005 mL de la solución 3 (glutamato-oxalacetato-transaminasa)
- 0,01 mL de la solución 4 (L-malato deshidrogenasa)
- 0,05 mL de vino

Durante el proceso se deben mezclar todos los componentes excepto la solución cuatro y medir la absorbancia a 340 nm. Tras esto se añade la solución 4 y tras diez minutos se vuelve a medir. El resultado se obtiene de la siguiente expresión.

$$\text{Ácido Málico (g/L)} = 0,472 \times F \times \Delta A, \text{ siendo:}$$

F: factor de dilución, ΔA : incremento de absorbancia

4.4.3. Resistencia mecánica de las esferas

Para evaluar la resistencia mecánica de las perlas se empleó el procedimiento descrito por Serp et al. (2000). Se realizó un ensayo TPA (Texture Profile Analysis) de doble compresión en el que se mide la fuerza necesaria para alcanzar una deformación del 50% del tamaño de la perla. Para ello se utilizó el texturómetro Texture Analyser Plus-Upgrade (Stable Microsystems, Reino Unido) con sonda cilíndrica de 6 mm de diámetro, acompañado del software Exponent Lite para trabajar con los datos obtenidos. Se trabajó con una distancia de retorno de 20 mm, velocidad de retorno de 5 mm/s y una fuerza de contacto de 1 g. Este parámetro se ensayó en 20 perlas conservadas en Ca_2Cl 0,2 M estéril durante 72 h a 24°C.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PRIMER DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En esta investigación se estudió en un primer experimento la degradación de ácido málico en 17 casos distintos (ver tabla 3), produciendo las esferas según el método de Kurayama *et al.* (2010) modificado, manejando concentraciones de APTES hidrolizado de 3,28% (v/v), 6,65% y 9,83%; pH de 4,0, 5,5 y 7,0 y tiempos de residencia en APTES de 15,0, 37,5 y 60,0 minutos.

El método antes mencionado, es el primer estudio realizado con APTES como compuesto silíceo para el recubrimiento de esferas de alginato por el método multicapa. Este método presenta las ventajas de que es muy sencillo de realizar, se basa en el simple goteo de una solución de carboximetilcelulosa de sodio y cloruro cálcico en una solución de alginato de sodio en agitación y su posterior recubrimiento

con APTES por inmersión; y mucho más económico que otros antes utilizados, ya que el APTES presenta la capacidad de interactuar electrostáticamente con la superficie del alginato produciéndose el anclaje del material, y evitando así el uso de polielectrolitos catiónicos de alto coste, utilizados para evitar las repulsiones electrostáticas producidas por las cargas negativas de alginato y sílice, como se había hecho hasta el momento.

Kurayama *et al.* (2010) utilizan este método para el estudio y caracterización de las mencionadas esferas, realizando ensayos con concentraciones de APTES hidrolizado de 3,28%, 6,65%, 9,83% y 16,38% (v/v), con pH entre 6,0 y 10,0 y con tiempos de residencia en APTES de entre 0 y 90 minutos. Se evaluó el efecto del APTES sobre algunas características morfológicas de las esferas (diámetro, tamaño de la capa de recubrimiento, etc.) y cuantificando los grupos amino de la capa de las esferas. Estos autores obtuvieron unos resultados muy exitosos comparando estas esferas con otras sin recubrimiento y viendo marcadas diferencias por la influencia del pH.

Basándose en las ventajas y resultados del experimento de Kurayama *et al.* (2010), se decidió realizar este estudio modificando el método, goteando alginato de sodio en cloruro cálcico y posteriormente recubriendo las esferas con APTES, y se manejaron los parámetros mencionados al principio de este capítulo.

Los resultados obtenidos (ver tabla 3) mostraron que bajo las condiciones de ensayo, la degradación de ácido málico era muy poco satisfactoria, aunque si algo más notoria en el experimento control realizado sin recubrimiento de APTES.

Tabla nº3: Concentración final de ácido málico tras el primer experimento.

Caso nº:	[APTES hidr.]	pH	Tiempo	Ac. mál. final
	% (v/v)		Minutos	g/L
1	3,28%	4,0	37,5	2,91±0,03
2	6,65%	7,0	15,0	2,98±0,01
3	6,65%	4,0	15,0	2,87±0,02
4	9,83%	7,0	37,5	2,99±0,07
5	6,65%	4,0	60,0	2,90±0,06
6	3,28%	5,5	15,0	2,93±0,05
7	9,83%	4,0	37,5	2,94±0,06
8	9,83%	5,5	15,0	2,93±0,03
9	9,83%	5,5	60,0	2,88±0,03
10	3,28%	7,0	37,5	2,90±0,07
11	6,65%	7,0	60,0	2,95±0,08
12	3,28%	5,5	60,0	2,88±0,05
13	6,65%	5,5	37,5	2,94±0,04
14	6,65%	5,5	37,5	2,94±0,04
15	6,65%	5,5	37,5	2,93±0,03
16	0,00%	5,5	60,0	2,33±0,11
17	Bacterias sin inmovilizar			0.56±0,07

Ylivero *et al.* (2013) estudiaron el uso de levaduras inmovilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones de residuos lignocelulósicos (virutas de abeto tratadas) para la producción de bioetanol. Para ello, elaboraron esferas de alginato-quitosano-alginato tratadas con APTES. Brevemente, el procedimiento consistió en confeccionar esferas de alginato-quitosano según el método de *Talebria et al.* (2006) modificado, goteando alginato de sodio en una solución de quitosano al 2% con 300 mM de CaCl₂, con un tiempo de permanencia de 10 h, seguido de un recubrimiento de alginato por inmersión en una solución del 0,05% durante 12 horas, todo en agitación a 130 rpm. Por último se recubrieron las esferas con APTES hidrolizado a concentraciones 0,75, 1,00 y 3,00 %, también por inmersión y agitación a la misma velocidad durante 90 minutos a un pH de 5.0. Se analizaron, entre otros parámetros, la concentración de glucosa y de etanol, y las células viables de levadura dentro de la cápsula.

Se comprobó que en los experimentos con 0,75 y 1,00 % de APTES hidrolizado se duplicó la viabilidad de las levaduras inmovilizadas al final del cultivo, lo que demostró que las levaduras pueden soportar los agentes tóxicos de los derivados lignocelulósicos (como son el furfural, el 3-hidroxifurfural, los ácidos carboxílicos y los compuestos fenólicos), y que el APTES hidrolizado no influyó en el crecimiento microbiano hasta una concentración del 1,5%. Por el contrario, en los experimentos con el 3,0% de APTES hidrolizado, no se encontraron levaduras viables, lo que hizo suponer que esta concentración alta de APTES influyó negativamente en la viabilidad de las levaduras. Estos autores indican que el reactivo APTES puede reaccionar directamente con las levaduras ejerciendo un efecto tóxico sobre las células. Además, sugieren que el APTES puede disminuir la permeabilidad de las esferas frente a la entrada y salida de los sustratos y productos del metabolismo de las levaduras, respectivamente, dificultando el proceso fermentativo. Finalmente, los experimentos con 0,75 y 1,0 % de APTES hidrolizado mostraron unos resultados similares, consumiendo entre el 89 y el 100% de la glucosa, mientras que el experimento al 3,0% de APTES hidrolizado no consiguió realizar la fermentación.

5.2. SEGUNDO DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Basándose en los resultados alcanzados por Ylivero *et al.* (2013) se decidió reestructurar el experimento. Se disminuyó la concentración de APTES hidrolizado, utilizando diluciones al 0,50%, 1,25% y 2,00% (v/v) ante la hipótesis de un posible efecto tóxico de concentraciones superiores al 3,00% de APTES sobre la supervivencia de *O. oeni*. Se repitió los valores de pH a 4,0, 5,5 y 7,0 tras observar en el experimento de Kurayama *et al.* (2010) que los extremos ácido y alcalino mostraban peores resultados en el recubrimiento de las esferas con APTES. Se desestimó el tiempo de residencia en APTES como variable de estudio, fijándose un tiempo de 60 min para todos los ensayos. En el estudio de Kurayama *et al.* (2010), este tiempo de residencia resultaba óptima para maximizar el recubrimiento de las esferas de alginato con APTES.

Tras estas modificaciones se obtuvo un nuevo diseño de 13 experimentos (ver tabla 4) y se decidió estudiar además de la degradación de ácido málico, la resistencia mecánica de las esferas, y la capacidad de retención de bacterias, ya que una de las ventajas claves de esta nueva biotecnología, es evitar contaminaciones microbiológicas y posteriores refermentaciones no deseadas.

5.2.1. Resistencia mecánica de las esferas

El ensayo de resistencia mecánica se llevó a cabo a las 72 horas de la formación de las esferas, midiendo la fuerza de compresión necesaria para deformar las esferas hasta la mitad de su tamaño. La medida se realizó, individualmente, en veinte perlas, conservadas en cloruro cálcico después de su formación.

Los resultados observados mostraron una baja variabilidad en la medidas para una población muestral de 20 esferas (ver tabla 4), consiguiéndose desviaciones típicas de entre 2,09 y 3,25, y coeficientes de variación entre 2,82% y 4,42%.

Tabla nº 4: Media, desviación típica y coeficiente de variación para la medida de la resistencia mecánica de 20 esferas en cada caso.

Caso nº:	Media	Desv. típica	Coef. var.
	g	g	%
1	71,14	2,27	3,19
2	70,35	2,09	2,97
3	71,64	2,30	3,22
4	71,78	2,25	3,13
5	69,99	1,98	2,83
6	70,94	2,28	3,22
7	70,42	2,86	4,06
8	72,05	2,51	3,48
9	71,17	2,40	3,38
10	71,65	2,69	3,75
11	70,75	2,79	3,95
12	72,83	3,25	4,46
13	Bacterias sin inmovilizar.		

La resistencia mecánica media varía entre 69,99 y 72,83 g (ver tabla 4) y tras realizar un análisis de la varianza (ANOVA simple), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.05$) entre los distintos tipos de esferas. En el

anexo 3 se recogen los datos de resistencia mecánica de todos los ensayos. Para el tratamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II

Para abordar la influencia de las variables experimentales sobre las respuestas es preciso cuantificar los efectos de cada factor. El efecto de cada factor se define como la modificación observada en la respuesta como consecuencia de un cambio de nivel de ese factor, promediado sobre los niveles de los otros factores. En la Figura 3 se muestra el diagrama de Pareto que muestra los efectos para cada uno de los factores y sus interacciones de segundo orden. A los niveles ensayados, ningún factor tiene influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta.

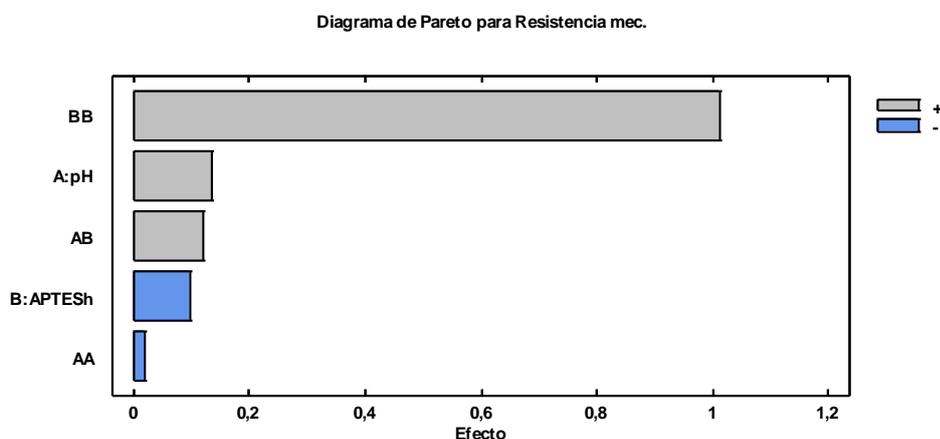


Figura 3: Diagrama de Pareto para la resistencia mecánica.

Recientemente, Simó (2014) comprobó que un ensayo TPA de doble compresión era adecuado para medir la resistencia mecánica de perlas mixtas de alginato-sílice, ya que fue capaz de ver diferencias para este parámetro en función de la composición de las mismas. En concreto, en este estudio se formaron las esferas añadiendo silicato coloidal y silicato de sodio al alginato de sodio, previamente al proceso de gelificación. Se analizó el efecto de distintas concentraciones de silicatos y distintos pH sobre la resistencia mecánica de las esferas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la resistencia mecánica de las esferas entre los diferentes casos estudiados. Se observó que un aumento de las distintas concentraciones de silicatos supuso un incremento en la resistencia mecánica de las esferas, mientras que el pH no influyó en este parámetro.

En nuestro estudio, el recubrimiento de la superficie de las esferas de alginato con APTES no modificó la resistencia mecánica medida con el ensayo TPA de doble compresión. Sin embargo, Ylivero *et al.*, (2013) obtuvo muy buenos resultados al estudiar la robustez de las esferas tratadas con APTES, empleando un ensayo de cizallamiento mecánico, que consistió en agitar vigorosamente a 600 rpm 100 esferas en 35 mL de NaCl al 0,9%. Los resultados se obtuvieron cuantificando el número de esferas rotas a las 2, 4 y 6 h. El recubriendo de las esferas con APTES mejoró significativamente su robustez mecánica. De las esferas con recubrimiento de APTES hidrolizado al 3,0%, todas soportaron el estudio de cizallamiento mientras que el 25 % de las esferas sin recubrimiento se rompieron a las 6 h. Solo el 1% de las esferas con recubrimiento al 1,5% de APTES hidrolizado no soportaron el ensayo.

5.2.2. Degradación de ácido málico

En cualquier de los dos diseños experimentales, no se consiguió una degradación de ácido málico satisfactoria (ver tablas 3 y 5) en las fermentaciones llevadas a cabo por las esferas recubiertas con APTES. Resultados similares se han obtenido al recubrir las esferas de alginato con tetraetilortosilicato (TEOS) donde la viabilidad de las bacterias lácticas se redujo drásticamente (Callone *et al.*, 2008).

Tabla nº5: Concentración final de ácido málico tras el segundo experimento.

Caso nº:	[APTES hidr.]	pH	Ac. mál. Final
	% (v/v)		g/L
1	0,50%	4,0	2,89±0,04
2	1,25%	4,0	2,99±0,07
3	2,00%	4,0	2,90±0,07
4	0,50%	5,5	2,96±0,11
5	1,25%	5,5	2,95±0,02
6	2,00%	5,5	2,93±0,05
7	0,50%	7,0	2,88±0,05
8	1,25%	7,0	2,89±0,01
9	2,00%	7,0	2,98±0,5
10	1,25%	5,5	2,97±0,06
11	1,25%	5,5	2,95±0,07
12	0,00%	5,5	2,45±0,09
13	Bacterias sin inmovilizar		0,76±0,02

El hecho de que los experimentos control, con bacterias sin inmovilizar y con esferas sin recubrimiento si degradaron ácido málico, vuelven a poner en relevancia el estudio de Ylivero *et al.*, (2013) en el que la concentración de APTES hidrolizado influía notoriamente en la viabilidad de los microorganismos implicados.

Aunque en su caso el límite de la viabilidad lo marcaba la concentración de 3,0%, debemos recordar que los microorganismos encapsulados fueron levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, y que probablemente soporten mejor esta supuesta toxicidad que las bacterias. Es conocido que las BAL que realizan la FML son muy sensibles a los cambios en su medioambiente, observándose una alta tasa de mortalidad después de inocular una alta concentración de BAL en el vino. Además, se ha descrito que las bacterias no toleran prolongadas exposiciones a tóxicos incluso si están presentes a concentraciones soportables para las levaduras (Callone *et al.*, 2008). También es conveniente señalar que en el estudio de Ylivero *et al.* (2013), se utilizó un medio de propagación para el cultivo, un medio azucarado a razón de 50 g/L, que proporcionaba unas condiciones más favorables para el desarrollo de las levaduras.

5.2.3. Capacidad de retención de las bacterias por las esferas

Se contabilizaron mediante siembras microbiológicas las bacterias existentes en el vino de los distintos experimentos, provenientes de las fugas de las esferas, para así poder conocer la capacidad de estas para retener los microorganismos y evitar contaminaciones y refermentaciones.

Ninguno de los experimentos con recubrimiento de APTES ha mostrado crecimiento microbiano en las placas de las siembras de sus respectivas muestras de vino. Este resultado hay que tomarlo con precaución, ya que al no producirse degradación de ácido málico, es probable que durante el proceso de inmovilización la viabilidad de las bacterias haya sido mínima.

Ylivero *et al.* (2013), realizaron un recuento microbiológico en placas de YPD del triturado de las esferas, previamente lavado y diluido con 0,1% de peptona y 0,9% de NaCl, con lo que consiguen conocer la viabilidad del microorganismo dentro de la esfera. Este procedimiento podría ser oportuno aplicarlo en futuros estudios para

conocer si verdaderamente existen microorganismos dentro las esferas en el momento de cuantificar las células liberadas. Si bien hay que señalar que este método conduce a una estimación a la baja del recuento de células, ya que parte de las células son dañadas durante el proceso de desintegración del soporte de inmovilización y una proporción de las células permanecen inmovilizadas en el soporte (Kuncová and Trögl, 2010).

Nuestro ensayo sin recubrimiento de APTES, ha mostrado un crecimiento microbiano de 50 UFC en su primera dilución (10^{-1}). Sabiendo que los experimentos se realizaban en recipientes con 10 ml de vino, que las bacterias fueron inoculadas al 0,1g/L sobre gel de alginato, se obtuvo una fuga de bacterias de 0,00015% del total, lo que supone, para esas circunstancias, un buen resultado.

6. CONCLUSIONES

Para las condiciones empleadas en este estudio, la inmovilización de *Oenococcus oeni* en esferas de alginato recubiertas con APTES hidrolizado por el método multicapa, las variables pH y concentración de APTES no modificaron significativamente la resistencia mecánica de las esferas, medida por el ensayo TPA de doble compresión. Por otro lado, la degradación de ácido málico en las distintas fermentaciones no aporta resultados satisfactorios en los distintos ensayos con células inmovilizadas en esferas de alginato recubiertas con APTES, debido probablemente al carácter tóxico del APTES sobre *O. oeni*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, R. & Dicks, L. M. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review, *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25 (2), 74-87.
- Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A. & 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), 4839-4848.

- Coradin, T., Nassif, N., & Livage, J. (2003). Silica-alginate composites for microencapsulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5-6), 429–434.
- Davis, C.R., Wibowo, D.J., Eschenbruch, R., Lee, T.H. & Fleet, G.H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.
- Gamazo, C., López, I. & Díaz, R. (2005). *Manual práctico de microbiología*. Elsevier Masson. Barcelona.
- Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S. & Cavazza, A. (2011). 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(1), 381-390.
- Hidalgo Togores, J. (2011). *Tratado de Enología*. Editorial Mundi-Prensa Libros. Madrid.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R. & Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production. *Food Microbiology*, 21, 377-397.
- Kuncová, G. & Trögl, J. (2010) Physiology of microorganisms immobilized into inorganic polymers. *Handbook of Inorganic Chemistry Research*. Editor: D.A. Morrison. Nova Science Publishers, Inc. Nueva York.
- Kurayama, F., Suzuki, S., Oyamada, T., Furusawa, T., Sato, M. & Suzuki, N. (2010). Facile method for preparing organic/inorganic hybrid capsules using amino functional silane coupling agent in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 349 (2010), 70-76
- Maicas, S., Pardo, I. & Ferrer, S. (2001). The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 415-419.
- Reguant, C., Rozès, I., Olguin, N., Bordas, M. & Bordons, A. (2010). Nuevos retos para *O. oeni* como consecuencia del cambio climático. *Acenología*. Disponible en

http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/oenococcus_cambio_climatico_4cienc1010.htm [Consulta: 9 de Enero de 2014]

- Riberau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B. & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino. Vinificaciones*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., Von Stockar U. & Marison, I.W. (2000) Characterization of an encapsulation Device for the Production os Monodisperse Alginate Beads for Cell Immobilization. *Biotechnnology & Bioengineering*; 70 (1), 41-53.
- Talebnia F, Niklasson C and Taherzadeh MJ, Ethanol production from glucose and dilute-acid hydrolyzates by encapsulated *S. cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 90:345–353 (2005).
- Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández E. & Hernández-Moral, M.C. (2010). Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. En: Méndez-Vilas A, editor. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Microbiology Series N° 2. Formatex. Badajoz.
- Ylivero, P., Franzén C. & Taherzadeh, M. (2013). Mechanically robust polysiloxane – ACA capsules for prolonged ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 88, 1080–1088.
- Zhang, D. & Lovitt, R. W. (2006). Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (7), 1130–1140.

ANEXO I: Ensayo de resistencia mecánica.

	Exp1	Exp2	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6
	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2
ESFERA Nº	pH4 – APT 0,5	pH4 – APT 1,25	pH4 - APT 2	pH5,5 – APT 0,5	pH5,5 – APT 1,25	pH5,5 - APT 2
1	75,975	70,246	74,427	69,818	66,304	72,247
2	70,58	68,103	72,819	74,701	69,591	71,104
3	72,176	70,235	69,032	66,876	71,092	70,115
4	74,344	71,592	66,102	71,211	67,221	71,569
5	72,414	73,403	72,783	68,579	72,164	75,261
6	70,497	70,366	71,783	74,487	67,448	67,853
7	71,259	67,09	70,651	72,76	69,222	66,912
8	69,758	73,284	68,734	72,283	67,102	72,914
9	71,878	71,735	75,427	70,33	71,58	70,818
10	71,128	70,104	70,687	69,996	69,901	72,116
11	69,699	74,248	71,259	72,831	68,162	70,616
12	69,758	69,032	72,414	71,33	69,818	69,163
13	68,257	69,067	76,166	70,985	68,257	70,58
14	67,055	68,269	73,617	71,449	72,676	70,961
15	72,712	69,365	71,676	72,235	70,58	66,364
16	67,448	73,343	72,712	76,547	70,675	72,509
17	71,438	68,234	73,212	71,616	71,807	72,771
18	74,093	70,473	72,057	71,604	70,032	68,246
19	69,961	68,388	70,616	74,129	73,82	73,939
20	68,138		70,306	70,461	69,044	68,841
21	74,784		70,318	69,913	70,532	69,055
22	72,057		69,341	71,235	72,664	73,831
23	71,211			75,523	70,187	71,878
24	70,675					72,891
Media (g):	71,14	70,35	71,64	71,78	69,99	70,94
Desviación típica (g)	2,27	2,09	2,30	2,25	1,98	2,28
Coef. de Variación (%)	3,19	2,97	3,22	3,13	2,83	3,22

	Exp7	Exp8	Exp9	Exp10	Exp11	Exp12
	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2	Fuerza 2
ESFERA Nº	pH7 – APT 0,5	pH7 – APT 1,25	pH7 - APT 2	pH5,5 – APT 1,25	pH5,5 – APT 1,25	pH5,5 – APX 0
1	69,27	69,77	73,069	73,998	75,392	68,829
2	70,032	72,152	73,986	73,438	71,414	76,059
3	70,902	69,615	69,425	69,699	69,091	72,057
4	71,128	73,629	75,082	72,104	69,782	74,332
5	70,366	73,879	73,153	73,022	69,973	69,282
6	73,331	70,163	73,558	70,127	74,034	76,809
7	71,449	68,472	71,723	72,164	73,462	68,448
8	72,045	69,984	70,294	72,009	70,056	72,498
9	75,427	70,151	74,117	74,439	71,676	74,57
10	75,916	72,331	71,044	75,13	72,39	68,841
11	71,342	69,77	71,973	70,651	70,318	74,272
12	70,425	73,022	68,234	72,855	72,724	75,344
13	68,031	75,594	69,687	72,164	72,688	72,748
14	73,855	72,926	71,545	75,713	69,401	68,782
15	69,329	77,023	68,829	71,461	68,615	66,137
16	65,768	71,116	69,663	71,64	73,951	69,984
17	67,221	67,424	68,567	69,46	71,997	76,297
18	66,519	70,949	73,081	67,269	70,139	76,88
19	73,486	75,535	68,889	65,173	74,332	76,011
20	69,079	71,723	75,844	73,129	65,125	73,022
21	68,877	74,427	67,781	66,852	71,295	76,666
22	64,935	74,784	67,424	69,675	67,376	74,987
23	70,961	70,175	70,878	71,89	64,113	72,188
24		74,689	70,127	75,451	68,674	
Media (g):	70,42	72,05	71,17	71,65	70,75	72,83
Desviación típica (g)	2,86	2,51	2,40	2,69	2,79	3,25
Coef. de Variación (%)	4,06	3,48	3,38	3,75	3,95	4,46