



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

**Caracterización enológica de bacterias
lácticas inmovilizadas en matrices de
alginato-sílice**

Alumno: Noelia Santamaría Gregorio

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor: Josefina Vila Crespo

Cotutor: Encarnación Fernández Fernández

Septiembre de 2015



Índice

1. Resumen	2
2. Introducción	2
2.1. Dificultades para desarrollar la fermentación maloláctica (FML)	2
2.2. Influencia de los factores físicos y químicos en FML	2
Temperatura	2
Sulfuroso	3
pH.....	3
Etanol	4
Ácido L-málico	5
Aminoácidos	5
2.3. Inmovilización de células para desarrollar la FML	6
2.4. Efecto de la inmovilización	8
Efecto sobre el crecimiento y la fisiología	8
Efectos sobre la actividad metabólica	8
Efectos sobre la tolerancia al estrés	9
3. Justificación	9
4. Objetivo	10
5. Materiales y métodos.....	10
5.1. Preparación de la muestra de vino	10
5.2. Inmovilización de las bacterias lácticas	11
Fundamento del método de inmovilización	11
Metodología empleada	12
5.3. Desarrollo de la fermentación maloláctica.	12
5.4. Determinaciones analíticas de las muestras.....	12
Seguimiento de la FML mediante el análisis del ácido málico.....	12
Métodos analíticos.....	12
5.5. Tratamiento estadístico de datos.....	12
6. Resultado y discusión	13
7. Conclusión	18
8. Bibliografía.....	19

1. RESUMEN

Este trabajo presenta los resultados de la caracterización enológica de las bacterias lácticas *O. oeni* inmovilizadas en soportes híbridos de alginato-sílice y en estado libre. Se ha estudiado el efecto del grado alcohólico (11-16% (v/v)), la temperatura (13-22°C), el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) (50-250 g/l), el pH (3.0-4.0) y la concentración del ácido málico (2-5 g/l) en vinos tintos sobre la degradación de ácido málico durante la fermentación maloláctica (FML). Las células inmovilizadas son una alternativa interesante para la gestión de la FML en vinos tintos con grados alcohólicos superiores a 13% (v/v) y con pH inferiores a 3,2. No se han observado claras diferencias entre las células inmovilizadas y las libres para el resto de parámetros analizados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Dificultades para desarrollar la fermentación maloláctica (FML)

La fermentación maloláctica (FML) es la transformación del ácido málico contenido en el vino a ácido láctico. Los agentes que desarrollan la FML son las bacterias lácticas (BAL) y en especial la especie *Oenococcus oeni* (Bauer et al., 2004). Esta transformación se produce gracias a la acción de la enzima maloláctica sintetizada por estos microorganismos, que produce una descarboxilación del ácido L(-) málico desprendiéndose una molécula de anhídrido carbónico y otra de ácido L(-) láctico. 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).

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, pH ácidos, el SO₂, 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).

2.2. Influencia de los factores físicos y químicos en FML

Temperatura

La temperatura afecta a la tasa de crecimiento y a la duración de la fase de retardo de BAL, por tanto, también a la población máxima de las bacterias. La tasa de crecimiento óptima de cepas de *O. oeni* está cerca de 25°C (Henick-Kling, 1993). La supervivencia de *O. oeni* en vino y su capacidad para realizar la FML mejora con la preincubación a 42°C (Guzzo et al, 1994). La fluidez de la membrana de las bacterias que recibieron la preincubación se adaptarán ligeramente mejor cuando sólo se exponen a 42°C (Tourdot-Marechal et al., 2000). Para mantener la fluidez óptima bajo diversas condiciones de crecimiento, las células regulan la composición de lípidos en sus membranas celulares (Lehninger et al, 1993). Un incremento de la temperatura de crecimiento induce un aumento en la incorporación de ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos grasos insaturados disminuyen. Una disminución de la

temperatura tiene el efecto opuesto. Cuanto mayor sea la proporción de ácidos grasos saturados, mayor es la temperatura de transición de sólido a líquido de la membrana celular. Según Tourdot-Marechal et al. (2000), la capacidad de *O. oeni* para regular la fluidez de su membrana representa un mecanismo de estrés de tolerancia.

Sulfuroso

Es una práctica común añadir SO_2 (50 a 100 mg/l) al mosto al comienzo de la vinificación para restringir el crecimiento de levaduras indígenas como pueden ser *Kloeckera* y *Henseni*spp. y de bacterias, principalmente las del ácido acético (Fleet., 1993). Algunas cepas de levaduras también producen cantidades relativamente grandes de SO_2 (King et al., 1986). A pH bajo, como en el vino (pH de 3 a 4), el sulfito predomina como SO_2 libre (Usseglio-Tomasset, 1992).

El SO_2 molecular es la única forma de SO_2 que puede atravesar las paredes celulares de levaduras y bacterias, entra en la célula por difusión y se convierte en HSO_3 . El sulfito en la célula puede reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos y cofactores, afectando el crecimiento de BAL (Carrete et al., 2002) y levaduras. La mayoría de las células de *O. oeni* se mueren a las 3 h en presencia de 15 mg/l de sulfito libre (Bauer et al., 2004). La actividad maloláctica también está influenciada por el SO_2 (Henick-Kling., 1993). En concentraciones de SO_2 a 20 mg/l reduce la degradación de L-malato al 13%, 50 mg/l reduce en un 50%, y 100 mg/l inhibe la actividad maloláctica completamente.

Una serie de compuestos de carbonilo (principalmente acetaldehído, ácido cetoglutárico y ácido pirúvico) se unen con el SO_2 libre (especialmente HSO_3) para formar un compuesto complejo (SO_2 combinado) que tiene propiedades antimicrobianas únicas débiles. El SO_2 combinado a 30 mg/l retrasa el crecimiento de las BAL, mientras que el SO_2 límite en más de 50 mg/l puede inhibir completamente el crecimiento (Henick-Kling., 1993). Si el SO_2 libre se une al acetaldehído puede causar una inhibición microbiana lo que provoca una ralentización o parada de la FML (Osborne et al., 2000). En el caso de que se unan al ácido cetoglutárico o al ácido pirúvico pueden ocasionar resultados similares ya que se reducen durante la FML (Nielsen et al., 1999).

O. oeni ha desarrollado una tolerancia a sulfito de hasta 30 mg/l y las células adaptadas a pH bajo sobreviven mejor que las células no adaptadas (Bauer et al., 2004). La adición de una concentración subletal de sulfito (15 mg/l) durante la etapa de adaptación en medio ácido (pH 3,5) aumenta la tolerancia al sulfito.

pH

El pH del vino juega un papel importante en la determinación de las especies de BAL que pueden sobrevivir y desarrollarse, así como en la tasa de crecimiento de las bacterias. El pH afecta fuertemente a la actividad maloláctica de la célula (Henick-Kling et al., 1993).

En cuanto al inicio y el final de la FML, los vinos con un pH de 3,3 o superior presentan poco problemas mientras que a un pH más bajo hay dificultades (Bauer et al., 2004). *O. oeni* es, por lo general, la especie dominante en los vinos con un pH inferior de 3,5. A mayor pH las especies de *Lactobacillus* y *Pediococcus spp* pueden sobrevivir y crecer. Aunque el crecimiento de *O. oeni* se inhibe en un pH bajo (Davis et

al., 1985), la actividad de transporte de malato en *L. plantarum* es mayor en células a pH 3,5 que en células cultivadas a pH 6,0 (Olsen et al., 1991).

La supervivencia de *O. oeni* en el vino mejora cuando se somete a un choque ácido antes de la inoculación, se supone que esto ocurre debido a la síntesis de proteínas de estrés específicas (Guzzo et al., 1994).

Etanol

El etanol interfiere fuertemente en el crecimiento y la actividad metabólica de las BAL. Las altas concentraciones de etanol disminuyen la temperatura de crecimiento óptima de BAL y la tolerancia al etanol se disminuye a temperaturas elevadas (Henick-Kling et al 1993). Las cepas de *Lactobacillus* y *Pediococcus* son en general más tolerantes a altas concentraciones de etanol que *O. oeni* (Bauer et al., 2004).

Aunque las concentraciones de etanol que se encuentran en el vino (8-12% v/v) no son inhibitorias para la actividad maloláctica (Capucho et al., 1994), la tasa de crecimiento de *O. oeni* disminuye linealmente a medida que hay un aumento en la concentración de etanol, estando el límite superior tolerado por la mayoría de las cepas en 14% (v/v) (Henick-Kling., 1993). Se ha observado que con 10-14% (v/v) el crecimiento óptimo de las bacterias (menor tiempo de retraso, tasa de crecimiento más rápida y el más alto rendimiento de células) se produce entre 18 y 20°C (Henick-Kling., 1993). A concentraciones de etanol entre 0-8% (v/v) y a aproximadamente 22°C se obtiene el máximo rendimiento celular. Por otro lado el grado de tolerancia al etanol también depende de la cepa, del pH y del nitrógeno que tenga el vino (Bauer et al., 2004).

El primer lugar donde se puede ver la respuesta a la adaptación al etanol es en la composición de la membrana celular, siendo los lípidos los protagonistas (Bauer et al., 2004). La respuesta de adaptación a la presencia de altas concentraciones de etanol está orientada a mantener la fluidez y la integridad de la membrana celular (Bauer et al., 2004). Teixeira et al. (2002) estudiaron la composición de lípidos y proteínas de la membrana de *O. oeni* en presencia de diferentes concentraciones de etanol. El porcentaje de ácido lactobacílico en la membrana aumenta cuando las células son cultivadas en presencia de una concentración de etanol superior al 8% (v/v). El aumento de ácido lactobacílico en la membrana de *O. oeni* parece proporcionar protección contra el efecto tóxico de etanol y equilibrar el aumento de la fluidez de la membrana, normalmente atribuido al etanol. Por ciclación de los ácidos grasos insaturados, las bacterias pueden estabilizar su membrana plasmática, particularmente en la fase estacionaria. Esto podría explicar por qué la lisis celular inducida por la bacteriocina de *O. oeni* era menos prominente en las células en fase estacionaria (Bauer et al., 2004).

El etanol en concentraciones de hasta 8% (v/v) induce un aumento en la permeabilidad de la membrana en las células de *O. oeni*, pero no en las células cultivadas en presencia de 8% (v/v) de etanol (Teixeira et al., 2002). El contenido total de proteína de la membrana de las células cultivadas en presencia de 8% (v/v) o superior etanol disminuyó (Teixeira et al, 2002).

En definitiva, el desarrollo de resistencia de etanol en *O. oeni* es un fenómeno complejo y de múltiples capas, que depende de la gravedad y la duración del choque y en condiciones de cultivo tales como la composición del medio, el pH y la temperatura.

Ácido L-málico

El mosto de uva contiene entre 1 y 8 g/l de ácido L-málico (Henick-Kling., 1993). La concentración de malato en la uva disminuye durante la maduración. En las regiones vitícolas con climas más frescos las concentraciones finales en el mosto son típicamente de 2-5 g/l, mientras que el contenido de malato es menor en los climas cálidos (normalmente <2 g/l).

Varios estudios han demostrado que el L-malato estimula el crecimiento y la producción de biomasa en *O. oeni* (Bauer et al., 2004). A pH bajo, L-malato se metaboliza a un ritmo elevado, mientras que el producto del metabolismo de los hidratos de carbono se realiza muy lentamente. El aumento resultante en el pH permite un aumento en la utilización de carbohidratos, lo que explica el crecimiento inducido por el malato (Miranda et al., 1997). La degradación de L-malato también estimula el crecimiento de una manera independiente del pH (Bauer et al., 2004) mediante la generación de una enzima metabólica que impulsa la síntesis de ATP (Cox et al., 1989).

Aminoácidos

La eficiencia de la FML está influenciada por la composición de nutrientes de los ácidos del vino y sus aminoácidos libres parecen ser de gran importancia. Sin embargo, sólo unos pocos estudios se han centrado en las necesidades en aminoácidos de *O. oeni* y su efecto en la actividad maloláctica (Bauer et al., 2004). Fourcassie et al., (1992) demostraron la absoluta necesidad de cuatro aminoácidos (arginina, ácido glutámico, triptófano e isoleucina), mientras que otros seis (valina, metionina, cisteína, leucina, ácido aspártico e histidina) se requieren para el crecimiento óptimo de *O. oeni*.

Remize et al., (2006) estudiaron el efecto de altas concentraciones del aminoácido no esencial, ácido L-aspártico, sobre el crecimiento de *O. oeni* y la FML. El crecimiento de bacterias en un medio sin ácido L-aspártico se reduce entre un 30 y un 50%, dependiendo de la cepa de *O. oeni* (Bauer et al., 2004). El efecto favorable de L-aspartato sobre el crecimiento bacteriano puede ser debido a la capacidad de *O. oeni* para metabolizar el aminoácido esencial L-isoleucina (Saguir et al., 1995). Por otra parte, las altas concentraciones de L-aspartato inhiben casi completamente el crecimiento bacteriano por lo que hay una reducción de la fermentación (Bauer et al., 2004). El L-aspartato interactúa con el ácido L-glutámico por lo que el transporte del ácido L-glutámico es inhibido. Tales interacciones entre los aminoácidos podrían explicar algunas de las dificultades experimentadas en la inducción de la FML en vino.

O. oeni crece mal en condiciones aeróbicas con glucosa como el único carbohidrato (Maicas et al., 2002). Cuando se añade cisteína, el consumo de glucosa en condiciones aeróbicas llega a tasas similares a los encontrados en condiciones anaeróbicas.

La arginina, siendo uno de los aminoácidos más importantes de mosto de uva y vino, representa una fuente potencial de energía e incrementa la viabilidad de *O. oeni* (Tonon et al., 2000). La degradación de arginina por BAL tiene varias implicaciones enológicas.

Aunque la mayor parte de arginina se degrada por las levaduras durante la fermentación alcohólica, algunos vinos tienen niveles de arginina tan altos de 2 a 5 g/l después de la fermentación alcohólica (Bauer et al., 2004). El género *Oenococcus* es

capaz de degradar la arginina a pH 3,9 y parcialmente a pH 3,6, pero no a pH 3,3 (Bauer et al., 2004).

Muchas cepas de BAL en el vino son capaces de descarboxilar aminoácidos, lo que conlleva a la producción de altas concentraciones de aminas biógenas (Bauer et al., 2004). Si las cepas productoras de aminas biógenas están presentes, se recomienda al enólogo inocular cultivos iniciadores seleccionados para reemplazar la microflora indígena.

2.3. Inmovilización de células para desarrollar la FML

Una de las tecnologías que permite que tengan lugar FML más rápidas y fiables es la inmovilización de bacterias (Maicas et al., 2001). El motivo de la utilización de este método son entre otras, que permite el aumento de la tolerancia de estos microorganismos a situaciones de estrés ambiental (pH, etanol, etc), permite la realización de la FML con una selección de los microorganismos inmovilizados, hay una mejora de la productividad de la FML por las altas densidades celulares, permite la reutilización de las células y la aplicación de un proceso continuo, existe un menor coste de recuperación y reciclaje (Kourkoutas et al., 2004), 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).

El gel de alginato de calcio es el material comúnmente utilizado para el atrapamiento de células en la industria alimentaria (Strehaiano et al., 2006) si bien, presenta una baja estabilidad operacional y química. 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).

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).

La inmovilización de *O. oeni* también se ha realizado en otros soportes como pueden ser residuos de mazorcas de maíz, hollejos y tallos de uva. Esos materiales se eligieron teniendo en cuenta sus valores naturales, de abundancia y de costos, así como su idoneidad para ser utilizados como material de soporte para la inmovilización de células de levaduras (Genisheva et al., 2011). Los hollejos de la uva y los tallos junto con las semillas de la uva se conocen con el nombre común de orujo de uva. El orujo de uva es el mayor de los residuos sólidos de la industria del vino y es de interés darle un uso alternativo a este subproducto. Otra ventaja de usar hollejos de uva y tallos como soporte de la inmovilización es que al ser productos naturales procedentes de la materia prima, se espera un efecto negativo menor sobre el producto final (Genisheva et al., 2013). Antes de su uso, los materiales, se lavaron con agua destilada y se secaron a 60°C hasta peso constante. Para su utilización como soportes de



inmovilización, los materiales fueron cortados y preparados de acuerdo con Genisheva et al. (2011). Por último, los soportes se esterilizaron a 121°C durante 20 min. La FML se llevó a cabo en vino blanco sintético y a distintas concentraciones de parámetros enológicos. Lo que se observó fue que el soporte de inmovilización en mazorcas de maíz y pieles de uva en cantidades de 30 g/l fueron los mejores para la inmovilización de *O. oeni*, ya que inmovilizaron la mayor cantidad de células. Sin embargo, la fermentación con células inmovilizadas en 10 g/l de mazorcas de maíz y tallos de uva dio la más alta productividad en ácido láctico. En su conjunto, las fermentaciones con bacterias inmovilizadas sobre 10 g/l alcanzaron concentraciones más significativas de ácido láctico que con bacterias inmovilizadas en 30 g/l de apoyo.

Además se pudo observar que el consumo de ácido málico fue más rápido en las fermentaciones con células inmovilizadas en comparación con fermentaciones con células libres. También que las células de *O. oeni* inmovilizadas en los soportes mencionados anteriormente fueron más resistentes contra el efecto inhibitorio de altas concentraciones de etanol, SO₂ y temperaturas elevadas que las células libres. Concretamente en la inmovilización en residuos de mazorcas de maíz las células de *O. oeni* se vieron fuertemente afectadas por una concentración alta de SO₂ libre (30 mg/l) aunque cuando las BAL se adaptaron a la presencia de SO₂ no se experimentó una reducción de la degradación de ácido málico. Por otro lado, los ensayos con células inmovilizadas en el hollejo y el tallo de la uva no se vieron afectados negativamente por la concentración de 30 mg/l de SO₂ libre (Agouridis et al., 2008).

Kosseva et al., 2004 ha podido demostrar que la encapsulación de *Lactobacillus casei* en un gel de pectato puede llevar a cabo la FML a altas concentraciones de etanol (12-13% v/v).

Sin embargo por otro lado, se ha demostrado que el método de encapsulación tiene limitaciones de transferencia de masa para los nutrientes, que conducen a la inactivación o incluso la muerte de las células en el centro. Por lo tanto, se propuso un nuevo soporte de inmovilización: una esponja fibrosa a base de celulosa (Maicas et al., 2001). Se demostró que la esponja cargada positivamente, inmoviliza las mayores cantidades de células de *O. oeni*. Aunque los resultados fueron mejores que los ensayos realizados con células libres, se detectó una disminución de la actividad de las células inmovilizadas después de cierto tiempo. La principal razón fue considerada por la disminución de la viabilidad de las células por una larga exposición al etanol (Maicas et al., 2001).

Según el estudio de Agouridis et al., (2008) la utilización de material celulósico deslignificado (DCM) para la inmovilización de células de *O. oeni* para FML da buenos resultados. DCM también se ha demostrado como un muy buen soporte para la inmovilización de células de levaduras para la fermentación alcohólica, por lo que puede obtener una tecnología de elaboración del vino basado en células inmovilizadas en DCM. Por otra parte demostró que utilizando DCM como material de inmovilización, las concentraciones de los principales subproductos volátiles (acetaldehído, acetato de etilo, 1-propanol, alcohol de isobutilo, diacetilo y alcoholes de amilo) estaban en niveles aceptables y por lo tanto el método puede ser industrializado. En general se puede concluir que la inmovilización de *O. oeni* en DCM durante la FML es un método prometedor. (Agouridis et al., 2008).

2.4. Efecto de la inmovilización

Se ha descrito que la inmovilización de célula puede producir alteraciones en el crecimiento celular, la fisiología y en la actividad metabólica

Generalmente es difícil predecir el tipo y la magnitud de los posibles cambios metabólicos experimentados por la inmovilización. Los parámetros que han sido considerados responsables de estas alteraciones son los siguientes; las limitaciones de transferencia de masa por difusión (Webb et al., 1986), las alteraciones en el patrón de crecimiento (Doran et al., 1986), los efectos de la tensión superficial y la presión osmótica (Vijayalakshmi et al., 1979), la actividad de agua reducida (Mattiasson et al., 1984), la comunicación de célula a célula (Shuler, 1985), los cambios en la morfología celular (Shirai et al., 1988), la alteración de la permeabilidad de la membrana (Brodelius y Nilsson, 1983) y la disponibilidad de los componentes en el medio (Chen et al., 1990).

A continuación se estudiarán algunos de los efectos más importantes que se han establecido gracias a trabajos comparativos entre células libres e inmovilizadas.

Efectos sobre el crecimiento y la fisiología

Las células inmovilizadas muestran una mayor viabilidad y actividad cuando se almacenan a baja temperatura durante largos períodos (Kourkoutas et al., 2004). En la fermentación del mosto por células de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) inmovilizadas en perlas de gel de alginato de calcio, las células muestran un comportamiento alterado en el crecimiento en comparación con las células libres, en las cuales disminuye la tasa de crecimiento cuando la concentración de levadura aumenta en las perlas del gel (Kourkoutas et al., 2004).

Se ha observado que la adsorción de la levadura a diversas superficies sólidas afecta a la tasa de crecimiento intrínseca de las células, ya sea aumentándola (Bandyopadhyay et al., 1982) o disminuyéndola (Doran et al., 1986).

Jamai et al. (2001) demostraron que las células de *Candidatropicalis* y *S. cerevisiae* inmovilizadas en alginato de calcio no mostraron alteraciones morfológicas significativas pero si una alteración en su actividad metabólica. Si se comparan los resultados de los ensayos en los cuales se utilizaron diferentes matrices de gel se puede sugerir que lo que afecta a la fisiología y al comportamiento metabólico es el microambiente dentro de las perlas y no la naturaleza de la matriz del gel.

Efectos sobre la actividad metabólica

Buzas et al. (1989) observaron que el pH óptimo para la fermentación usando células libres de *S. cerevisiae* fue 4,0, mientras que la actividad fermentativa de las células inmovilizadas en alginato fue independiente del pH. Según Galazzo et al., (1990), el pH intracelular en células libres e inmovilizadas de *S. cerevisiae* en alginato fue de 6,9 y 6,8, respectivamente. Esto hace que la actividad de la enzima aumente y por tanto haya una mayor productividad.

La adsorción de *S. carlsbergensis* sobre perlas de vidrio poroso aumenta el rendimiento de etanol sobre la glucosa y disminuye la producción de dióxido de carbono (Navarro et al., 1977). Similarmente se comportan las células de *S. cerevisiae* inmovilizadas en soportes de cerámica (Demuyakor et al., 1992). Por otro lado, las células de *S. cerevisiae* inmovilizadas en gelatina dan como resultado una mayor



concentración de polisacáridos, ADN y ARN en comparación con las células libres (Kourkoutas et al., 2004).

Las células de *Aspergillus niger* inmovilizadas en perlas de alginato de calcio muestran un aumento de la síntesis de enzimas antioxidantes en comparación con las células libres (Kourkoutas et al., 2004). *Candidatropicalis* y *S. cerevisiae* inmovilizadas en alginato de calcio muestran diferentes patrones matemáticos cuando se relacionan la tasa de crecimiento, la tasa de respiración y la tolerancia al etanol (Jamai et al., 2001).

Efectos sobre la tolerancia al estrés

Norton et al., (1994) discutieron el aumento de la tolerancia al etanol de células de levaduras inmovilizadas y sugirieron que este fenómeno puede atribuirse a la encapsulación de células por una capa protectora del material de gel o por la modificación de la concentración de ácidos grasos en las membranas celulares debido a la limitación de oxígeno por difusión.

El estrés osmótico causado por las técnicas de inmovilización favorece la producción intracelular de compuestos de regulación de presión, tales como polioles, que disminuyen la actividad del agua y por consiguiente tienen una mayor tolerancia a compuestos tóxicos (Norton et al., 1994).

Las células de levadura y *Bacillus* inmovilizados en diversas matrices poliméricas muestran una mayor viabilidad y estabilidad térmica en condiciones de congelación y liofilización en comparación con las células libres (Kourkoutas et al., 2004).

Soportes de inmovilización

Los diferentes soportes utilizados para la inmovilización de células se clasifican en naturales, inorgánicos, orgánicos y sistemas de membranas. Los soportes naturales son principalmente de naturaleza alimenticia y se utilizan con ningún o casi ningún pretratamiento tal como madera, aserrín, trozos de fruta, etc. Los materiales orgánicos pueden realizarse sintéticamente (como el plástico) o extraerse de fuentes naturales mediante procesos más complejos (como hidrogeles poliméricos) (Kourkoutas et al., 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

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.

4. OBJETIVO

El objetivo del proyecto consiste en la caracterización enológica de la bacteria láctica *O. oeni* inmovilizada en matrices de alginato-sílice, y su comparación con su contrapartida libre.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Preparación de la muestra de vino

Para la realización de los ensayos se empleó vino tinto de la variedad de uva Tinta de Toro de la D.O Toro sin realizar la FML. Para poder trabajar con dicho vino, primero se le adicionó la dosis de cortezas de levaduras de 20 g/Hl, se filtró con papel de filtro y a continuación se le sometió a un tratamiento de desalcoholización mediante un rotavapor, se concentró un 30% (v/v) y de ese modo también se eliminaba el sulfuroso libre. Una vez se tuvo el vino listo se le realizó un análisis para conocer los parámetros de partida, los cuales se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis del vino concentrado

ANALÍTICA VINO DE PARTIDA	
Sulfuroso libre (mg/l)	0
pH	3,4
Ácido málico (g/l)	1,8
Nitrógeno fácilmente asimilable (NFA)	50
Grado alcohólico (% v/v)	0,8

Para estudiar el efecto del pH, grado alcohólico, temperatura, ácido málico y NFA sobre la capacidad fermentativa de *O. oeni* en estado libre e inmovilizado se empleó el vino anteriormente citado con distintas condiciones para estos parámetros (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros a analizar

Variable							Condiciones estándar
pH	3,0	3,2	3,4	3,6	3,8	4,0	3,4
Grado alcohólico (% v/v)	11	12	13	14	15	16	13
Temperatura (°C)	13	16	19	22	20	22	22
NFA (mg/l)	50	100	150	200	250		50
Ácido málico (g/l)	2	3	4	5			3

A modo de ejemplo, para estudiar el efecto del NFA se dejan fijas todas las variables a los niveles descritos para las condiciones estándar, y la variable NFA se estudiará a los cinco niveles descritos en la Tabla 2. Para el resto de variables se trabajaría de la misma forma.

Para ajustar el pH al valor deseado se emplea una disolución de NaOH 2N o H₂SO₄ 2N. En el caso del grado alcohólico se utilizó alcohol etílico (99,5% de pureza). Las condiciones de NFA se llevaron a cabo mediante la adición de diamonio hidrógeno fosfato (DAP) (Panreac). En relación al ácido málico se utilizó DL- ácido málico (Panreac).

El vino antes de prepararlo según la Tabla 2 se esterilizó mediante filtración con matraz Kitasato empleando un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0.2 µm de diámetro de poro. Todas las operaciones se realizaron en condiciones de asepsia.

5.2. Inmovilización de las bacterias lácticas

• Fundamento del método de inmovilización

Para este trabajo se empleó un gel de alginato de calcio como soporte de la inmovilización junto materiales silíceos ya que presentan características físicas muy deseables, además de una estabilidad química ocasionada por el enlace Si-O. Por otro lado, para realizar una adecuada encapsulación de *O. oeni* es necesario evitar la producción de algunas sustancias tóxicas asociadas al proceso de gelificación tradicional (ruta con alcóxidos), como son la presencia de sustancias precursoras de silicio, de alcohol o valores de pH del medio perjudiciales para las BAL (Callone et al., 2008). La alternativa escogida en el presente trabajo para afrontar este reto es el empleo de precursores de silicio no alcóxidos, como son el silicato de sodio y el silicato coloidal. Éstos no precisan de disolventes orgánicos y no se precisan de una etapa previa de hidrólisis.

- **Metodología empleada**

Para la inmovilización de *O. oeni* se empleó una concentración de alginato de sodio del 2% (Guzzon et al., 2011). Se empleó la bacteria liofilizada *O. oeni* (LALVIN VP 41 MBR, Lallemand).

Para inmovilizar las BAL en los soportes mixtos de alginato-sílice se empleó un proceso de coacervación basado en la mezcla de los derivados de silicio con el alginato antes de la gelificación en presencia de Ca^{2+} (Coradin et al., 2003). Se siguió el método propuesto Trivedi et al. (2006) con modificaciones. Como derivados de silicio se emplearon silicato de sodio y silicato coloidal demostrada su capacidad para formar un gel empleando una ruta acuosa (Coradin et al., 2003).

Se utilizaron las condiciones previamente optimizadas para la inmovilización de *O. oeni* por Simó et al., (2015) las cuales son una concentración de silicato de sodio de 0,06M y 1,23M de silicato coloidal a un pH de 6,29.

El procedimiento que se utilizó fue el siguiente. En un tubo Falcón estéril se preparó una disolución en agua de silicato de sodio y silicato coloidal para obtener una concentración final de 0,06M y 1,23M respectivamente y se ajustó el pH hasta 6,29 con HCl 2N. Una vez obtenida dicha disolución se añadió un 2% alginato de sodio en agitación continua para que la mezcla fuera homogénea. Seguidamente se le adicionó las bacterias en la concentración establecida (previamente hidratadas en agua estéril en el volumen de 20 veces su peso). La suspensión se hizo gotear por gravedad mediante una jeringuilla estéril de 10 ml sobre unos 200 ml de Ca_2Cl 0,2 M estéril. Se dejó en agitación a 260 rpm durante 2 h para que finalizase el proceso de gelificación y se lavaron las perlas con unos 100 ml de agua destilada estéril. Todas estas operaciones se realizaron en condiciones estériles y empleando material y reactivos esterilizados comercialmente o mediante autoclavado a 121°C durante 20 minutos.

5.3. Desarrollo de la fermentación maloláctica.

Para el desarrollo de la fermentación maloláctica se trabajó por triplicado con una concentración de $\approx 0,0034\text{g gel/ml}$ de vino. La carga bacteriana que se empleó finalmente fue de 10^7 UFC/ml de vino para la inmovilización en la matriz híbrida de alginato-sílice y de 10^8 UFC/ml para las células libres. Todas estas operaciones se realizaron en condiciones estériles y empleando material esterilizado comercialmente o mediante autoclavado a 121°C durante 20min.

5.4. Determinaciones analíticas de las muestras.

- **Seguimiento de la FML mediante el análisis del ácido málico.**

El seguimiento de la FML de cada experimento se realizó cada 24 h mediante la medida semicuantitativa del ácido málico por medio de cromatografía en papel (Hidalgo, 2011). Esto permitió establecer el momento en el que poder evaluar cuantitativamente la capacidad de fermentación de cada muestra de BAL inmovilizada, que se estableció en 24 horas desde la inmovilización. En este punto, se observó una suficiente variabilidad entre muestras para la concentración de ácido málico.

La determinación cuantitativa del ácido málico se realizó mediante un kit enzimático (TDI, España) según el método propuesto por Olschiimke et al. (1969). El método se fundamenta en el hecho de que la nicotinamida-adenin-dinucleótido (NAD)

oxida el ácido L-Málico a oxalacetato en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa (L-MDH).

La medida espectrofotométrica de la cantidad de NAD⁺ reducido a NADH indica la cantidad de ácido L-Málico (L-malato) presente en la muestra. La medida se realizó a 340 nm, utilizando un colorímetro (Spectronic Unicam, modelo 4001/4, Reino Unido).

- **Métodos analíticos**

En relación a los análisis de pH se llevó a cabo mediante el pH-meter BASIC 20+ CRISON. En cuanto al NFA del vino se analizó mediante el protocolo establecido por Aerny (1996).

5.5. Tratamiento estadístico de los datos.

Con todos los resultados obtenidos de las concentraciones de ácido málico finales se realizó el % de degradación de ácido málico, dando como 100% a la mayor degradación es decir, a la menor concentración de ácido málico final. Después se realizaron gráficos de dispersión teniendo en cuenta las medias de % de degradación de cada nivel de cada parámetro y se les incluyó las barras de error con la desviación estándar de los % de degradación.

Además de lo citado anteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó un estudio de múltiple rangos utilizando la opción de Tukey HSD (ANEXO 1). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa Statgraphics centurion.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Grado alcohólico

En la Figura 1 se observa la degradación de ácido málico frente el grado alcohólico para las células libres e inmovilizadas en alginato-sílice. Si nos fijamos en las células libres se puede observar una disminución de la degradación de ácido málico a medida que aumenta el grado alcohólico. Esto podría explicarse ya que como demostró Henick-Kling et al. (1993) el etanol interfiere fuertemente en el crecimiento y la actividad metabólica de las BAL. También se puede observar que a partir de 13%(v/v) la disminución de la degradación del ácido málico es más pronunciada, esto puede deberse a que como observó Davis et al. (1988), la tasa de crecimiento de *O. oeni* disminuye linealmente a medida que hay un aumento de la concentración de etanol, estando el límite superior tolerado por la mayoría de las cepas en 14% (v/v). Hay que tener en cuenta que *O. oeni* tiene menos resistencia al etanol que otros tipo de cepas como pueden ser *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

A diferencia de lo observado para las células en estado libre, el incremento de la concentración de alcohol no modifica sensiblemente la conversión del ácido málico para las células inmovilizadas. Estos resultados están en consonancia con los encontrados por Rodríguez-Nogales et al. (2013) que muestran una mayor eficiencia en la degradación de ácido málico en vinos de alta concentración alcohólica. Esta tolerancia al etanol podría atribuirse a que la encapsulación ofrece una capa de protección frente a este metabolito o a la modificación de ácidos grasos en las membranas celulares debido a limitaciones de difusión de oxígeno. Se ha demostrado que la inmovilización celular podría causar alteraciones deseables en el metabolismo

de las células incrementando su tolerancia al alcohol (Kourkoutas et al., 2010). También se ha demostrado que el etanol modifica la composición de ácidos grasos de la membrana celular de las BAL (Norton et al., 1994).

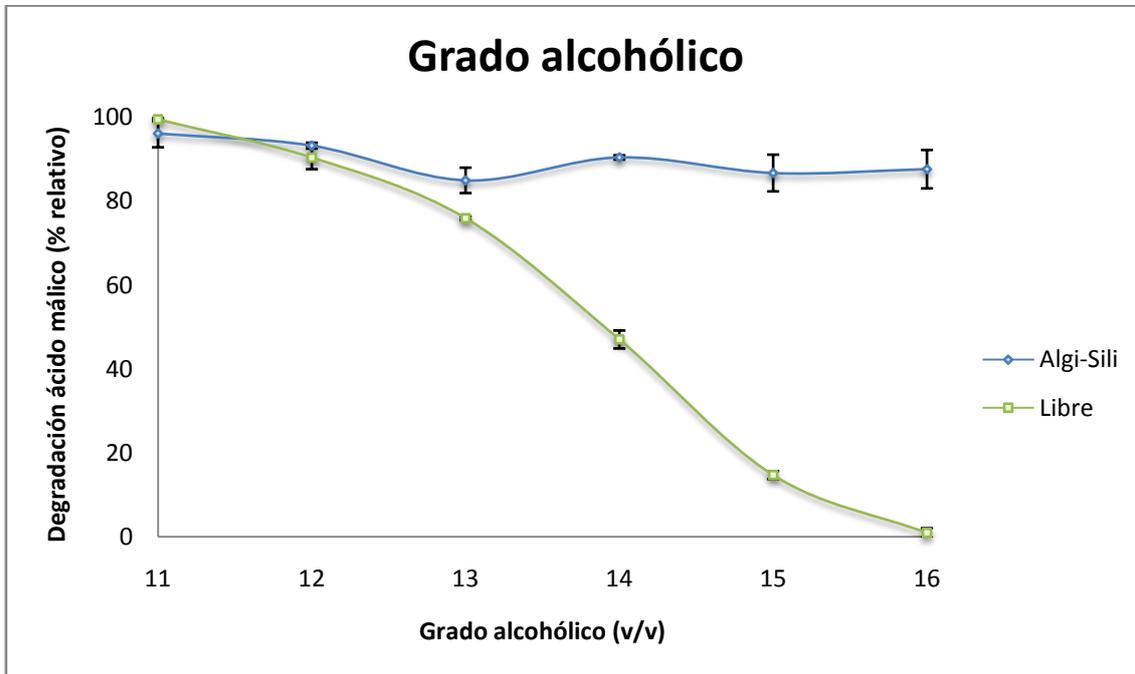


Figura 1 Degradación de ácido málico (% relativo) frente al grado alcohólico

6.2. Temperatura

La temperatura afecta a la tasa de crecimiento y a la duración de la fase de retardo de las BAL, por tanto, también a la población máxima de las bacterias. Henick-Kling, (1993) observó que la tasa de crecimiento óptima de cepas de *O. oeni* está cerca de los 25°C. Según muestra la Figura 2, existe un aumento de la degradación de ácido málico según se aumenta la temperatura tanto para células libres como inmovilizadas en alginato-sílice, siendo la 22°C la temperatura óptima. Rodríguez-Nogales et al. (2013) observaron una reducción de la conversión de ácido málico del 60% al 30% a una temperatura de 30 y 15°C, respectivamente. También se puede ver en la Figura 2 que el aumento de la degradación de ácido málico desde 13°C a 16°C es más pronunciado en células libres que en inmovilizadas.

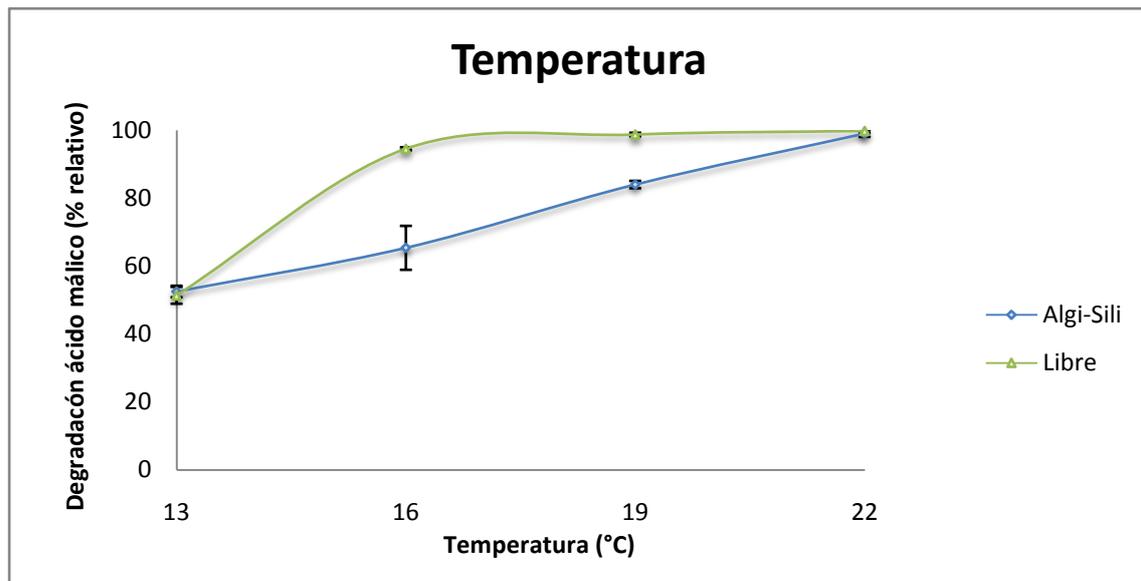


Figura 2 Degradación de ácido málico (% relativo) frente a la temperatura

6.3. Nitrógeno fácilmente asimilable

La eficiencia de la FML está influenciada por la composición en aminoácidos del vino. Sin embargo, sólo unos pocos estudios se han centrado en las necesidades en aminoácidos de *O. oeni* y su efecto en la actividad maloláctica (Bauer et al., 2004). Fourcassie et al., (1992) demostraron la absoluta necesidad de cuatro aminoácidos (arginina, ácido glutámico, triptófano e isoleucina), mientras que otros seis (valina, metionina, cisteína, leucina, ácido aspártico e histidina) se requieren para el crecimiento óptimo de *O. oeni*.

Como se puede ver en la Figura 3, la degradación de ácido málico se mantiene más o menos estable en el rango de NFA ensayado. Parece claro que el proceso de inmovilización no modifica el comportamiento de las células frente a los niveles de NFA ni genera problemas de difusión de los aminoácidos y del amonio hacia el interior del soporte donde se encuentran las células.

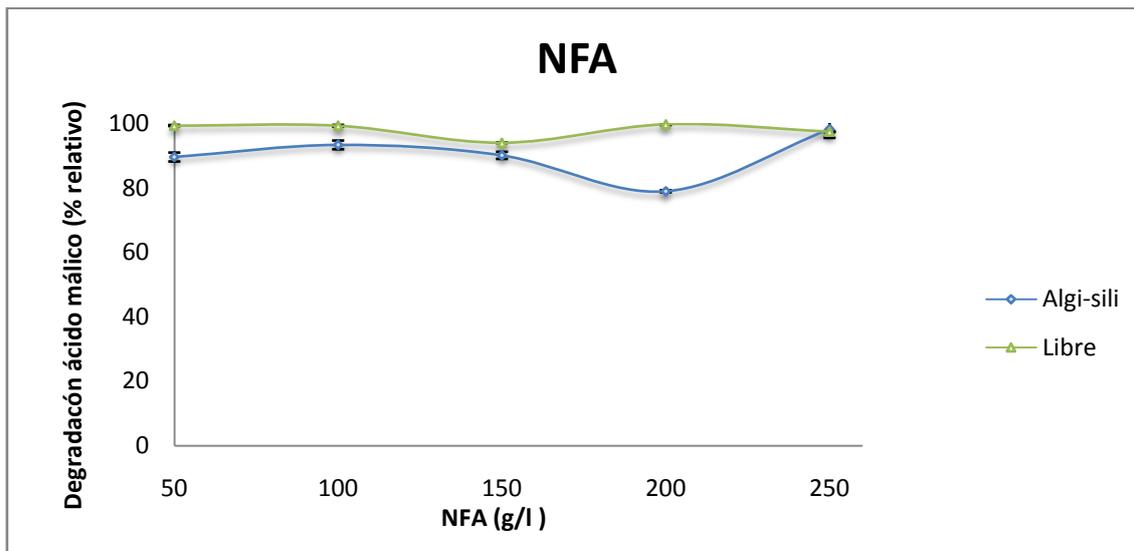


Figura 3 Degradación de ácido málico (% relativo) frente a NFA

6.4. pH

Como observó Henick-Kling et al. (1993), el pH del vino es muy importante en la tasa de crecimiento de las BAL ya que afecta fuertemente a la actividad maloláctica de la célula. Kukee et al. (1967) demostró que en vinos con un pH 3,3 o superior presentan pocos problemas mientras que a un pH bajo existen dificultades. Davis et al. (1986) comprobó que el crecimiento de *O. oeni* se inhibe a un pH bajo. Este comportamiento lo podemos observar en la Figura 4, en la que se aprecia claramente que a pH bajo la degradación de ácido málico es muy inferior para las células libres. Rodríguez-Nogales et al. (2013) pudieron observar que la capacidad de *O. oeni* inmovilizada en gel de PVA, para degradar el ácido málico no se vio afectada por los cambios de pH aunque sí que vieron un ligero descenso en la conversión del ácido málico del 98% al 90% cuando el pH era de 3,95 y 3,36 respectivamente. Cuando se inmovilizó células de *S. cerevisiae* en geles de alginato, la actividad fermentativa fue independiente del pH mientras que para las células libres el óptimo fue de 4,0 (Rodríguez-Nogales et al. 2013). Esto también se puede observar en la Figura 4, en la que se refleja que en las células inmovilizadas la degradación de ácido málico no se encuentran tan afectadas por la disminución del pH como en las células libres.

El motivo de que a pH bajos trabajen mejor las células inmovilizadas en alginato-sílice que las células libres se puede explicar gracias a Gallazo et al. (1990) que vieron que con *S. cerevisiae* hay un incremento del valor pH intracelular en las células inmovilizadas lo que da como resultado una mayor actividad de la enzima y por lo tanto mayor productividad. El pH intracelular aumentado podría incrementar la permeabilidad de la membrana citoplásmica a los protones, lo que conduce a un mayor consumo de ATP causando un aumento de la actividad metabólica.

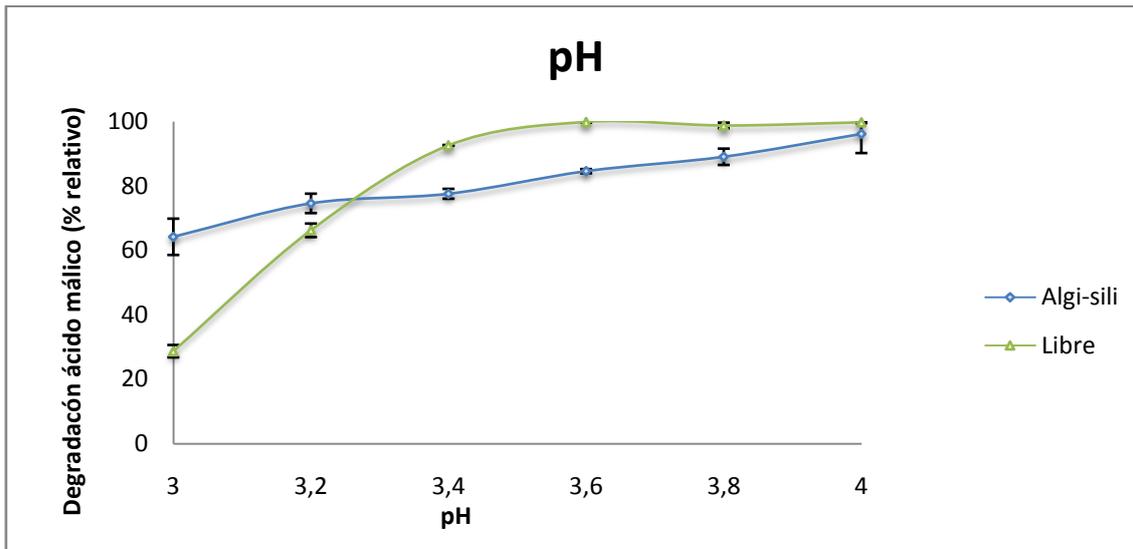


Figura 4 Degradación de ácido málico (% relativo) frente al pH

6.5. Ácido málico

Varios estudios han demostrado que el L-malato estimula el crecimiento y la producción de biomasa en *O. oeni* (Bauer et al., 2004). A pH bajo, L-malato se metaboliza a un ritmo elevado, mientras que el producto del metabolismo de los hidratos de carbono se realiza muy lentamente. El aumento resultante en el pH permite un aumento en la utilización de carbohidratos, lo que explica el crecimiento inducido por el malato (Miranda et al, 1997). La degradación de L-malato también estimula el crecimiento de una manera independiente del pH (Bauer et al., 2004) mediante la generación de una enzima metabólica que impulsa la síntesis de ATP (Cox et al., 1989).

Como se muestra en la Figura 5, hay un aumento de la degradación de ácido málico según se aumenta la concentración de dicho ácido tanto para células libres como inmovilizadas. Se observa que a bajas concentraciones de ácido málico en el vino de partida también se produce una conversión de ácido málico. De nuevo se observa como el proceso de inmovilización no modifica el metabolismo de las células ni generó problemas de difusión del ácido málico.

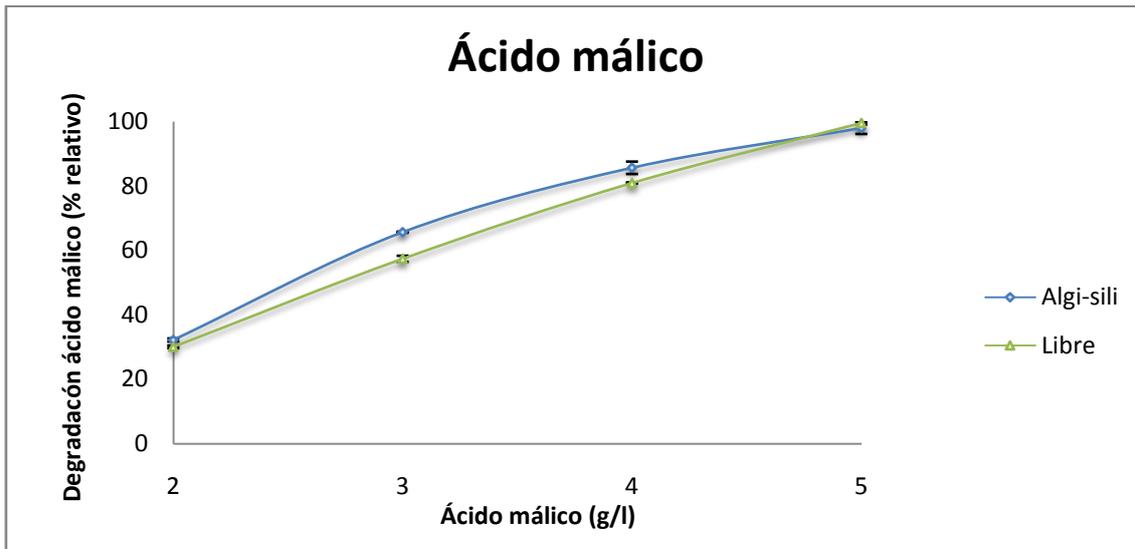


Figura 5 Degradación de ácido málico (% relativo) frente al ácido málico.

7. Conclusión

La utilización de una matriz híbrida de alginato-sílice como soporte de inmovilización de *O. oeni* supone grandes beneficios a la hora de realizar la FML en vinos tintos, en comparación con el empleo de células libres. Se ha observado que las células inmovilizadas son capaces de metabolizar mejor el ácido málico en vinos con grados alcohólicos superiores a 13% (v/v), en relación con las bacterias libres. Por otro lado, las células inmovilizadas presentan un mejor comportamiento en vinos con pH menores de 3,2. En cuanto a los demás parámetros enológicos estudiados, el proceso de inmovilización no modificó sensiblemente el proceso fermentativo. Tampoco se observaron problemas de difusión del ácido málico y de los aminoácidos hacia el interior del soporte de inmovilización.



8. Bibliografía

Agouridis N, Kopsahelis N, Plessas S, Koutinas AA, Kanellaki M. Oenococcus oeni cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresour Technol* 2008;99(18):9017-9020.

Bandyopadhyay S. A study of the volumetric setting shrinkage of some dental materials. *J Biomed Mater Res* 1982;16(2):135-144.

Bauer R, Dicks L. Control of malolactic fermentation in wine. A review. *S.Afr.J.Enol.Vitic* 2004;25(2):74-88.

Buzás Z, Dallmann K, Szajani B. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechnol Bioeng* 1989;34(6):882-884.

Capucho I, San Romao M. Effect of ethanol and fatty acids on malolactic activity of *Leuconostoc oenos*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1994;42(2-3):391-395.

Carrete M, Sánchez-Zapata JA, Martínez JE, Sánchez MÁ, Calvo JF. Factors influencing the decline of a Bonelli's eagle *Hieraaetus fasciatus* population in southeastern Spain: demography, habitat or competition? *Biodiversity & Conservation* 2002;11(6):975-985.

Coradin T, Nassif N, Livage J. Silica–alginate composites for microencapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;61(5-6):429-434.

Coradin T, Nassif N, Livage J. Silica–alginate composites for microencapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003;61(5-6):429-434.

Cox DJ, Henick-Kling T. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *J Bacteriol* 1989 Oct;171(10):5750-5752.

Davis C, Wibowo D, Eschenbruch R, Lee T, Fleet G. Practical implications of malolactic fermentation: a review. *Am J Enol Vitic* 1985;36(4):290-301.

Demuyakor B, Ohta Y. Promotive action of ceramics on yeast ethanol production, and its relationship to pH, glycerol and alcohol dehydrogenase activity. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;36(6):717-721.

Doran PM, Bailey JE. Effects of immobilization on growth, fermentation properties, and macromolecular composition of *Saccharomyces cerevisiae* attached to gelatin. *Biotechnol Bioeng* 1986;28(1):73-87.

Fleet GH. *Wine microbiology and biotechnology*. : CRC Press; 1993.

Fourcassie P, Makaga- Kabinda- Massard E, Belarbi A, Maujean A. Growth, Dglucose utilization and malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos* strains in 18 media deficient in one amino acid. *J Appl Bacteriol* 1992;73(6):489-496.

Galazzo JL, Bailey JE. Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium- alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnol Bioeng* 1990;36(4):417-426.



Genisheva Z, Mussatto SI, Oliveira J, Teixeira J. Malolactic fermentation of wines with immobilised lactic acid bacteria—Influence of concentration, type of support material and storage conditions. *Food Chem* 2013;138(2):1510-1514.

Genisheva Z, Mussatto SI, Oliveira JM, Teixeira JA. Evaluating the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Industrial Crops and Products* 2011;34(1):979-985.

Guzzo J, Cavin J, Divies C. Induction of stress proteins in *Leuconostoc oenos* to perform direct inoculation of wine. *Biotechnol Lett* 1994;16(11):1189-1194.

Henick-Kling T. Malolactic fermentation. *Wine microbiology and biotechnology* 1993:289-326.

Jamai L, Sendide K, Ettayebi K, Errachidi F, Hamdouni-Alami O, Tahri-Jouti MA, et al. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;204(2):375-379.

Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004;21(4):377-397.

Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat IM, Marchant R, Koutinas A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol* 2004;21(4):377-397.

Leninger A, Nelson DL, Cox MM. *Principles of biochemistry*. New York: Worth Publishers 1993.

Maicas S, Pardo I, Ferrer S. The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enzyme Microb Technol* 2001;28(4):415-419.

Maicas S, Ferrer S, Pardo I. NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. *Microbiology* 2002 Jan;148(Pt 1):325-332.

Miranda M, Ramos A, Veiga-da-Cunha M, Loureiro-Dias MC, Santos H. Biochemical basis for glucose-induced inhibition of malolactic fermentation in *Leuconostoc oenos*. *J Bacteriol* 1997 Sep;179(17):5347-5354.

Nielsen JC, Richelieu M. Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 1999 Feb;65(2):740-745.

Norton S, D'Amore T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. *Enzyme Microb Technol* 1994;16(5):365-375.

Olschimke D, Niesner W, Junge C. Bestimmung der Äpfelsäure in Weinen und Traubensäften. *Dtsch Lebensm -Rundsch* 1969;65:383-384.

Olsen EB, Russell JB, Henick-Kling T. Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J Bacteriol* 1991 Oct;173(19):6199-6206.



Osborne J, de Orduña RM, Pilone G, Liu S. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;191(1):51-55.

Reguant C. Nuevos retos para *Oenococcus oeni* como consecuencia del cambio climático. *ACE: Revista de enología* 2010(122):1.

Remize F, Gaudin A, Kong Y, Guzzo J, Alexandre H, Krieger S, et al. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. *Arch Microbiol* 2006;185(6):459-469.

Rodríguez Nogales JM, Vila Crespo J, Fernández- Fernández E. Immobilization of *Oenococcus oeni* in Lentikats® to develop malolactic fermentation in wines. *Biotechnol Prog* 2013;29(1):60-65.

Strehaiano P, Ramon-Portugal F, Taillandier P. Yeasts as biocatalysts. *Yeasts in food and beverages*: Springer; 2006. p. 243-283.

Teixeira H, Goncalves M, Rozes N, Ramos A, San Romao M. Lactobacillic acid accumulation in the plasma membrane of *Oenococcus oeni*: a response to ethanol stress? *Microb Ecol* 2002;43(1):146-153.

Togores JH. *Tratado de enología I.* : Mundi-Prensa Libros; 2011.

Tonon T, Lonvaud- Funel A. Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *J Appl Microbiol* 2000;89(3):526-531.

Tourdot-Maréchal R, Gaboriau D, Beney L, Divies C. Membrane fluidity of stressed cells of *Oenococcus oeni*. *Int J Food Microbiol* 2000;55(1):269-273.

Tracey R, ROOYEN TV. Utilization of glucose, fructose and malic acid by malolactic bacteria: effect of ethanol and formation of mannitol and volatile acids. *J Appl Bacteriol* 1988;65(2):113-118.

Usseglio Tomasset L. Properties and use of sulphur dioxide. *Food Additives & Contaminants* 1992;9(5):399-404.

Vila-Crespo J, Rodriguez-Nogales J, Fernández-Fernández E, Hernanz-Moral M. Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Microbiology Series* 2010(2).

Zhang D, Lovitt RW. Strategies for enhanced malolactic fermentation in wine and cider maturation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2006;81(7):1130-1140.