



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS

Grado en Enología

Aplicación de *Oenococcus oeni* atrapada
en geles de alginato-sílice para desarrollar
la fermentación maloláctica. Estudios de
estabilidad química.

Alumno: Irene López Pérez

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor: Josefina Vila crespó

Cotutor: Encarnación Fernández Fernández

Junio de 2014

Copia para el tutor/a

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Introducción	3
3. Antecedentes.....	3
4. Objetivos.....	7
5. Materiales y métodos.....	7
5.1. Preparación de la muestra de vino	7
5.2. Inmovilización de las bacterias lácticas.....	7
5.3. Experimentos de estabilidad química.....	8
5.4. Determinaciones analíticas de las muestras	9
5.5. Tratamiento estadístico de los datos.....	9
6. Resultados y discusión	10
6.1. Estabilidad del soporte en un vino tinto.....	10
6.3. Estabilidad del soporte en disoluciones acuosas a distinto pH	19
6.4. Estabilidad del soporte en disoluciones acuosas con compuestos quelantes de calcio.....	24
7. Conclusiones	26
Bibliografía.....	26

1. Resumen

En el presente trabajo se ha estudiado el comportamiento químico de un gel híbrido de alginato de sodio y sílice (ALG-SI) formado por el método de coacervación y utilizado para inmovilizar bacterias lácticas (BAL) del género *Oenococcus oeni* aplicado a la fermentación maloláctica (FML) en vinos tintos. Para ello, las perlas de ALG-SI cargadas de bacterias se sumergieron en un vino tinto y en distintas soluciones formadas por compuestos quelantes de calcio, mezclas hidroalcohólicas de etanol (concentraciones de 10, 12, 14 y 16% vol.) y disoluciones acuosas a distintos pH (3,0, 3,3 3,6 y 3,9). Paralelamente se incluyeron experimentos control con un gel de alginato de calcio (ALG). A distintos intervalos de tiempo se evaluó (i) la presencia de polisacáridos en el vino y en las soluciones de ensayo donde se sumergieron los geles, (ii) el diámetro y (iii) el peso de las perlas.

2. Introducción

Para una futura aplicación industrial del uso de BAL inmovilizadas para realizar la FML en un vino tinto es necesario conocer el comportamiento del soporte de inmovilización en el medio. El vino puede ser un medio agresivo para los soportes diseñados con geles de ALG, ya que es una mezcla hidroalcohólica con un pH ácido y contiene otros componentes, como el ácido cítrico, que pueden afectar a su estabilidad.

En previos estudios se ha demostrado la buena capacidad del soporte de inmovilización mixto de ALG-SI para inmovilizar bacterias lácticas y para realizar la fermentación maloláctica. Además, la inclusión de una red inorgánica de silicios en el gel de alginato de calcio mejoró sensiblemente sus características mecánicas (Simó, 2014) y su actividad metabólica en vinos de alta graduación (Santamaría, 2015). El siguiente paso, es evaluar la estabilidad química del soporte de ALG-SI frente al vino y frente a distintos factores presentes en el vino (compuestos quelantes del calcio, presencia de etanol y pH ácidos).

3. Antecedentes

En la elaboración del vino la FML es uno de los procesos más difíciles de controlar, debido a que depende del desarrollo y la actividad metabólica de las BAL. Éstas son principalmente de los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*, siendo la especie *O. oeni* la más utilizada. La FML consiste en la transformación del ácido málico contenido en el vino hacia ácido láctico como producto final. El mecanismo de transformación es muy simple, pues gracias a la enzima maloláctica formada por las BAL se produce una descarboxilación del ácido málico de cuatro átomos de carbono, desprendiéndose una molécula de anhídrido carbónico y otra de ácido L(+) láctico. La consecuencia de esta transformación es una importante caída de la acidez total del vino, estimada en unos 0,6 g/l de ácido tartárico (Hidalgo, 2011), y un aumento del pH, acompañado de cambios sensoriales y de la síntesis de varios compuestos que dan lugar a cambios tanto en la composición como en la

calidad del vino. Además la FML provee de estabilidad microbiológica al vino final (Vila-Crespo *et al.*, 2010).

La FML es un proceso deseable y beneficioso para los vinos tintos que vayan a destinarse a crianza ya que les aporta la estabilidad biológica necesaria para garantizar su conservación en el tiempo. Además les aportan sensaciones gustativas más suaves al disminuir, en ocasiones hasta el 50%, la acidez total del vino y reducir la cantidad de ácido málico, que aporta sensaciones ásperas y astringentes. La desacidificación biológica que se produce en la FML es en ocasiones la única solución viable en vinos cuya acidez málica es muy elevada, aunque conlleva la pérdida de parte del potencial aromático, como ocurre en algunos vinos jóvenes (Hidalgo, 2011).

Las BAL son las encargadas de llevar a cabo esta transformación. Se encuentran de forma natural en el vino en pequeñas cantidades, provenientes de la vendimia o de la maquinaria e instalaciones de la bodega. Para que arranque el proceso de FML son necesarias poblaciones de bacterias de alrededor de 10^6 UFC/ml (Ribéreau-Gayon, 2008). El vino es un sustrato poco favorable al desarrollo de estos microorganismos, ya que son sensibles a las altas concentraciones de etanol y a los pH bajos. A partir de 3-4% vol. de etanol la actividad de las BAL disminuye linealmente, hasta alcanzar un mínimo de 14-15% vol., a partir del cual se inhibe la FML. El valor óptimo de pH es de entre 4,2 y 4,5, siendo el mínimo entre 3,0 y 2,9 a partir de los cuales el crecimiento de BAL es muy limitado (Hidalgo, 2011). A esto hay que añadir que actualmente el cambio climático está produciendo cambios en la temperatura media anual y en las precipitaciones, lo que da lugar a vinos desequilibrados, con mayor contenido en azúcar, que implica concentraciones más elevadas de etanol y pH más elevados debido a la reducción de la acidez total (Vila-Crespo *et al.*, 2010).

Para controlar la FML, que generalmente tiene lugar espontáneamente una vez acabada la fermentación alcohólica, se puede llevar a cabo un control y mejora de las condiciones y factores que influyen en el proceso, tales como ampelográficos, físicos o químicos, o bien añadir inóculos seleccionados de BAL. La inoculación de BAL comerciales para inducir la FML puede asegurar fermentaciones más rápidas en algunos casos, pero debido al efecto inhibitorio del etanol, actualmente incrementado por el cambio climático, se están buscando nuevas técnicas que permitan lograr una FML rápida y completa (Vila-Crespo *et al.*, 2010).

Pueden aplicarse diferentes técnicas de inoculación de BAL en el vino: (i) adición de un volumen determinado de vino en pleno proceso de fermentación maloláctica; (ii) adición de lías sanas de vinos que ya la hayan realizado; (iii) adición de un inóculo de BAL tanto autóctonas como seleccionadas; (iv) adición de la enzima maloláctica; (v) utilización de levaduras que sean capaces de degradar también el ácido málico; o (vi) utilización de bacterias inmovilizadas, entre otras (Hidalgo, 2011).

Mediante el uso de BAL inmovilizadas se han obtenido rendimientos elevados en el desarrollo de la FML, que superan a los obtenidos con la inoculación de bacterias libres (Rossi & Clementi, 1984), además simplifica la eliminación de las células microbianas del producto final y ofrece la posibilidad de reutilizar el sistema de células inmovilizadas, reduciendo los costes de producción del vino. La inmovilización de las BAL puede mejorar su capacidad fermentativa al protegerlas de un medio tan

estresante como es el vino. Normalmente los soportes de inmovilización celular utilizados durante la FML en vinos son de origen orgánico y las bacterias usadas son *O. oeni* o especies de *Lactobacillus* (Genisheva *et al.*, 2012).

El ácido algínico es la base de los soportes de inmovilización para células más comúnmente utilizado. Se trata de un copolímero binario no ramificado de ácido α -L-gulurónico (G) unido por enlaces glicosídicos 1-4, y de su epímero en C-5, el ácido β -D-manurónico (M). Las sales y ésteres de este polisacárido se denominan alginatos, cuya mayor fuente de obtención son las algas pardas. La composición del alginato se basa en la unión en forma de bloques de los residuos M y G, dando lugar a tres tipos de bloques: bloques M homopoliméricos (M-M-M), bloques G homopoliméricos (G-G-G) y bloques heteropoliméricos MG de secuencia alterna (G-M-G-M) (Melvik & Dornish, 2004). La presencia de iones divalentes como Ca^{2+} , Ba^{2+} o Sr^{2+} puede conducir al entrecruzamiento de las moléculas de alginato o gelificación. Los alginatos también pueden precipitar o formar geles bajo condiciones ácidas. Los valores de pK_a para el ácido manurónico y el ácido gulurónico son 3,38 y 3,65 respectivamente, y como resultado los alginatos son polianiónicos a pH neutro.

La gelificación ocurre cuando un catión divalente toma parte en el enlace intercatenario entre bloques G dando lugar a una red tridimensional. La zona de unión entre los bloques G con frecuencia se designa por el llamado “modelo de caja de huevos” (Grant *et al.*, 1973). El proceso depende tanto del tipo de alginato como de la concentración de iones en el gelificante. Cuando la gelificación tiene lugar en presencia de un exceso de iones gelificantes, se ha propuesto un modelo de caja de huevos modificado, que implica más de dos cadenas de alginato en la zona de gelificación. Esto puede tener un impacto en la porosidad del gel. Si no existen contracciones del gel, debería haber más espacio entre las cadenas, conduciendo a un incremento de la porosidad. La proporción, así como la distribución de los dos monómeros determinan en gran medida las propiedades fisicoquímicas de los geles (Melvik & Dornish, 2004).

A pesar de que se ha estudiado la posibilidad de inmovilizar BAL como *O. oeni* en una matriz de alginato (Guzzon *et al.*, 2011), los geles formados por este bipolímero presentan la desventaja de tener una baja resistencia mecánica y pobre estabilidad química, que conduce a la fuga de las células atrapadas con proliferación activa en el medio. Esto hace que sea necesaria la búsqueda de alternativas para mejorar la resistencia de las perlas formadas por el gel. Una de las alternativas desarrollada es la elaboración de matrices de inmovilización mixtas de alginato como son los biocomposites inorgánicos de sílice (ALG-SI) (Callone *et al.*, 2008).

La importancia de los materiales silíceos en la inmovilización celular está determinada por las características químicas y físicas del sílice. La fuerza del enlace Si-O (452 kJ/mol) asegura la inercia y la estabilidad química; la elección de los precursores del gel así como de las condiciones de gelificación produce materiales con una porosidad adecuada para el transporte libre de sustratos y productos metabólicos y un atrapamiento celular estable. La mejora de las propiedades mecánicas en la encapsulación con este material inorgánico puede atribuirse a los efectos de la condensación de los silicatos, que conduce a la formación de una red de sílice extendida, donde el entrecruzamiento es de naturaleza covalente y por ello es más

estable que las interacciones electrostáticas o los puentes de hidrogeno en los geles de polímeros (Callone *et al.*, 2008)

La química del sol-gel es una técnica interesante para inmovilizar material biológico (Gill & Ballesteros, 2000), ya que permite el desarrollo de geles a temperatura ambiente empleando precursores de sílice. Existen dos rutas asociadas con el proceso sol-gel en presencia de precursores de sílice: (i) la ruta con alcóxidos; y (ii) la ruta acuosa (Livage, 1998).

Los alcóxidos de silicio (Si(OR)_4) contienen un grupo orgánico (R: $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_2\text{H}_5$, etc) que en contacto con 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 al gel (Coradin *et al.*, 2003).

Trivedi *et al.* (2006) desarrolló una ruta acuosa basada en el uso de sales de silicatos y sílice coloidal, ya que estos reactivos son más baratos y menos agresivos para las células que los precursores utilizados en la ruta con alcóxidos. De esta forma se superan algunas de las limitaciones en la aplicación industrial de la inmovilización utilizando este composite.

Recientemente se ha diseñado un proceso de coacervación para inmovilizar BAL en soportes mixtos de ALG-SI, basado en la mezcla de derivados de silicio con el alginato antes de la gelificación en presencia de Ca^{2+} (Simó, 2014). Como derivados de silicio se emplearon silicato de sodio y silicato coloidal, demostrada su eficacia para formar un gel en una ruta acuosa. La aplicación de los derivados de sílice en el proceso de inmovilización aumentó en un 32% la resistencia mecánica del soporte cuando se utilizaba una concentración de silicato de sodio y coloidal de 0,05 M y 0,91 M, respectivamente, y la polimerización se realizaba a un pH de 5,7. Bajo esas condiciones se obtuvo una conversión del ácido málico del 98% en 96 horas de FML. Además, Santamaría (2015) demostró que *O. eoni* inmovilizada en geles de ALG-Si era capaz de metabolizar mejor el ácido málico en vinos con grados alcohólicos superiores a 13% (v/v), en relación con las bacterias libres.

La estabilidad a largo plazo de los materiales usados para la inmovilización es un desafío clave para su producción y utilización a escala real (Blondeau *et al.*, 2012). La matriz utilizada para la encapsulación debe poseer la suficiente rigidez mecánica para mantener las perlas sin rotura durante un largo periodo de tiempo. La combinación de alginato y sílice a través del proceso de coacervación puede asegurar propiedades que superen los inconvenientes observados con el uso de geles de alginato de calcio, como una pobre estabilidad química, hinchazón o rotura de las perlas y sensibilidad frente a agentes quelantes (Rooke *et al.*, 2008).

Al eliminar los iones de Ca^{2+} con un agente quelante como EDTA, lactato o citrato, con frecuencia se degradan los enlaces de Ca^{2+} del gel de alginato. Esto puede conducir a la fuga de los materiales encapsulados y a la disolución de los polímeros de alginato (Gombotz *et al.*, 2012). Se ha observado que un soporte de alginato de calcio

puro se disuelve completamente en 0,5 horas al introducirlo en una solución de citrato de sodio 0,1 M con agitación suave (Zhang *et al.*, 2016).

4. Objetivos

Estudiar la estabilidad química del gel de ALG-SI como soporte de inmovilización para BAL frente a un vino tinto y a diversas soluciones modelo de compuestos quelantes de calcio, mezclas hidroalcohólicas de etanol y disoluciones acuosas a distinto pH.

5. Materiales y métodos

5.1. Preparación de la muestra de vino

Para la realización de todos los experimentos se empleó vino de la variedad Tinta de Toro que se mantuvo congelado a -20°C. Dicho vino no había realizado la FML y tenía una concentración de ácido málico de 3,0 g/l. Otros parámetros que se analizaron del vino inicial fueron el pH de 3,6 y el contenido alcohólico de 14% vol.

5.2. Inmovilización de las bacterias lácticas

Para la realización de los experimentos se utilizó la bacteria liofilizada *Oenococcus oeni* (LALVIN VP 41 MBR, Lallemant), que fue previamente hidratada en el doble volumen de agua que el peso utilizado. Las bacterias se inmovilizaron en dos soportes diferentes: (i) en un gel orgánico de alginato de calcio (ALG) y (ii) en un gel mixto orgánico-inorgánico de alginato-sílice (ALG-SI).

El procedimiento de inmovilización en el gel de ALG fue el siguiente. Las perlas de alginato se realizaron ajustando el pH de la disolución de alginato de sodio a 6,3 antes de añadir las BAL. Una vez preparado el gel con las bacterias, la suspensión se hizo gotear por gravedad a través de una jeringuilla de 10 ml a una altura de ~30 cm sobre una disolución de 200 ml de Ca₂Cl 0,2 M. Las perlas se dejaron en agitación a 260 rpm durante dos horas para que finalizase el proceso de gelificación y después se lavaron con 100 ml de agua destilada.

Como ejemplo para la preparación de 10 ml de gel de alginato cargado con BAL se tomaron:

- 0,2 g de alginato de sodio,
- 8 ml de agua destilada y
- 0,1 g de BAL hidratados en 2 ml de agua destilada.

Para la inmovilización de BAL en soporte mixto ALG-SI se empleó el proceso de coacervación basado en la mezcla de los derivados de silicio con alginato antes de la gelificación y en presencia de Ca²⁺ (Coradin *et al.*, 2003). Se siguió el método propuesto por Trivedi *et al.* (2006) con modificaciones propuestas por Simó *et al.* (2015), utilizando como derivados de silicio el silicato de sodio y el silicato coloidal, ya

que se ha demostrado su capacidad para formar geles empleando una ruta acuosa (Coradin *et al.*, 2003).

En el caso del gel mixto de ALG-SI se preparó la mezcla de silicato coloidal (Ludox HS40, Sigma) y silicato de sodio y se ajustó el pH a ~6,3 antes de añadir las BAL hidratadas. Tras ajustar el pH se añadieron el alginato y las bacterias y se ajustó nuevamente el pH a 6,3. Una vez preparado el gel con las bacterias se hizo gotear por gravedad a través de una jeringuilla de 10 ml a una altura de ~30 cm sobre una disolución de 200 ml de Ca_2Cl 0,2 M. Las perlas se dejaron en agitación a 260 rpm durante dos horas para que finalizase el proceso de gelificación y después se lavaron con 100 ml de agua destilada.

Como ejemplo, para preparar 10 ml de gel de ALG-SI cargado con bacterias se utilizó:

- 0,2 g de alginato de sodio,
- 1,245 ml de silicato de sodio 0,4 M,
- 1,66 ml de silicato coloidal ,
- 5,095 ml de agua destilada, y
- 0,1 g de BAL hidratadas en 2 ml de agua destilada.

5.3. Experimentos de estabilidad química

Se diseñaron una serie de ensayos para determinar la estabilidad química de los soportes de inmovilización de las bacterias frente al vino y a distintos factores (compuestos quelantes del calcio, etanol y pH), todos ellos consistentes en introducir 15 perlas de geles de ALG o ALG-SI cargadas de bacterias lácticas en 15 ml de vino o de las disoluciones modelo que se detallan a continuación:

- Para evaluar la estabilidad frente al vino se utilizó la muestra de vino descrita anteriormente.
- Para evaluar la estabilidad frente a compuestos quelantes del calcio se utilizó una disolución tampón de citrato de sodio 27,5 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 15 mM.
- Para evaluar la estabilidad frente al etanol se utilizaron mezclas hidroalcohólicas de distinta concentración (10%, 12%, 14% y 16%).
- Para evaluar la estabilidad frente al pH se utilizaron disoluciones de 3 g/l de ácido tartárico con pH 3,0, 3,3, 3,6 y 3,9. El pH se ajustó utilizando NaOH y HCl.

A distintos intervalos de tiempo se extrajeron muestras de las distintas disoluciones y del vino para determinar su contenido en alginato, mediante la determinación de polisacáridos totales. Paralelamente se repitió el experimento con el objetivo de determinar la modificación en el tamaño de las perlas de ALG y ALG-SI mediante su peso y su diámetro. Para ello se introdujeron 15 perlas cargadas de BAL en las mismas disoluciones que se han detallado anteriormente y a distintos intervalos de tiempo se

extrajeron para determinar su peso y su diámetro, devolviéndolas siempre después a la muestra.

5.4. Determinaciones analíticas de las muestras

La determinación de polisacáridos totales se llevó a cabo según el método propuesto por Segarra *et al.* (1995) con modificaciones. Para ello se utilizó un colorímetro (Spectronic Unicam 4001/4, Reino Unido). Se realizó una curva de calibrado para determinar la cantidad de polisacáridos totales utilizando para ello soluciones con concentración de alginato conocida entre 1 y 25 µg/ml de alginato de sodio (Figura 1).

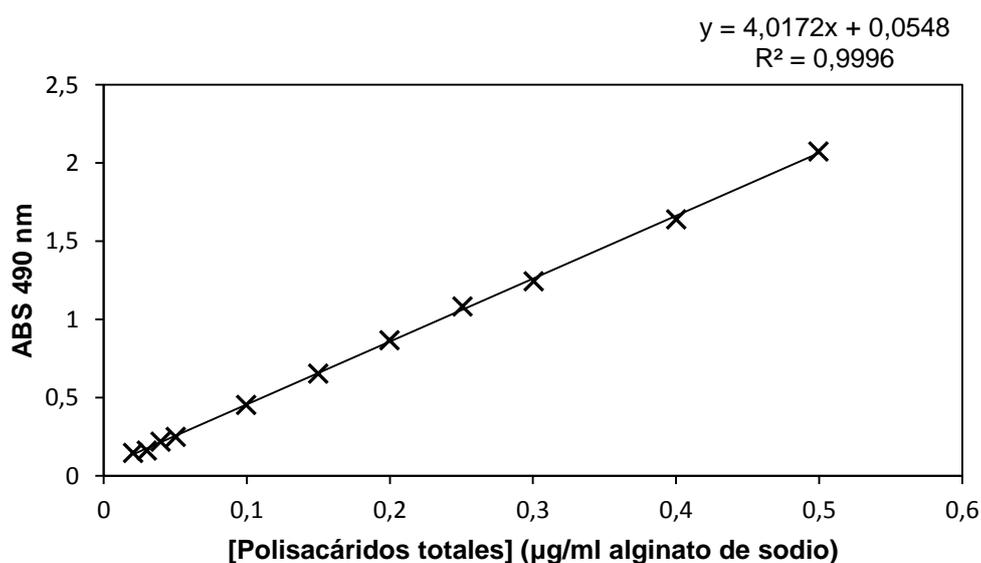


Figura 1. Relación entre la concentración de polisacáridos totales y la absorbancia en 490 nm.

Para determinar el diámetro de las perlas se utilizó el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, USA, 2016) analizando 30 perlas en cada punto de muestreo. También se determinó el peso de 30 perlas en cada punto de muestreo con ayuda de una balanza analítica.

5.5. Tratamiento estadístico de los datos

Para realizar el tratamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.II. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple para cada uno de los siguientes factores: (i) compuestos quelantes del calcio, y (ii) vino. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) multifactorial para los siguientes factores: (i) concentración de etanol (0, 10, 12, 14 y 16% vol.), y (ii) pH (3,0, 3,3, 3,6 y 3,9).

Los resultados obtenidos para cada factor en los diferentes procedimientos realizados para determinar la estabilidad química se han expresado utilizando un gráfico de dispersión para cada factor. Los factores estudiados fueron (i) contenido en polisacáridos totales en el vino o en las disoluciones modelo, (ii) incremento del diámetro de las perlas, e (iii) incremento del peso de las perlas.

- i. Polisacáridos totales: el contenido de alginato en cada solución a distintos intervalos de tiempo se ha expresado como la evolución del contenido en polisacáridos totales ($\mu\text{g/ml}$ alginato de sodio) utilizando la curva de calibrado construida (Figura 1).
- ii. Diámetro de las perlas: la variación en el tamaño de las perlas a distintos intervalos de tiempo se ha expresado como la evolución del incremento (positivo o negativo) porcentual de su diámetro, dando como 0% al diámetro inicial de las perlas, es decir en 0 horas.
- iii. Peso de las perlas: la variación en el peso de las perlas a distintos intervalos de tiempo se ha expresado como la evolución del incremento (positivo o negativo) porcentual de su peso, dando como 0% al peso inicial de las perlas, es decir en 0 horas.

6. Resultados y discusión

6.1. Estabilidad del soporte en un vino tinto

En la Figura 2a se observa un ligero incremento en el contenido en polisacáridos totales a las 4 h de exposición de los soportes de ALG y ALG-SI en el vino tinto. Este incremento puede deberse a la difusión del alginato no polimerizado del interior de la perla. El método utilizado para la formación de las perlas implica una polimerización del alginato desde el exterior al interior, a medida que va difundiendo el Ca^{2+} hacia interior. Esto provoca que la estructura del gel no sea homogénea en todo el diámetro del soporte, apareciendo moléculas de alginato que no forman zonas de unión estables con el Ca^{2+} , pudiendo estos polímeros liberarse del gel (Strand *et al.*, 2004). A partir de las 4 h de exposición se observa una estabilización en la liberación de los polímeros de alginato. Por otro lado, a las 168 h no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para el contenido en polisacáridos para ambos soportes (Figura 3a).

Para comprobar la homogeneidad del diámetro de las perlas de ALG y ALG-SI, se evaluó el diámetro de 30 perlas de cada tipo de soporte. Los coeficientes de variación de las medidas fueron muy bajos (3,8% y 2,9% para ALG y ALG-SI, respectivamente), lo que señala que la variabilidad en el diámetro de las perlas dentro de cada tipo de soporte es pequeña. Estos datos nos indican que el método de extrusión empleado permite obtener perlas de diámetro homogéneo. Por otro lado, la presencia de una red inorgánica de silicatos provocó un ligero incremento en el diámetro medio de las perlas ($3,54 \pm 0,10$, ALG-SI), estadísticamente significativo, en comparación con las perlas de ALG ($3,17 \pm 0,12$). El tamaño de las perlas formadas en un sistema de extrusión depende, entre otros factores, de la viscosidad de la solución a extruir (Brun-Graeppi *et al.*, 2011), y empíricamente se pudo comprobar que la presencia de silicatos incrementaba la viscosidad de la solución.

En la Figura 2b y 2c se observa una disminución en el diámetro y el peso de las perlas, respectivamente, con el tiempo de contacto con el vino, siendo más notable su disminución en las primeras 4 h. Estas perlas son hidrogeles constituidos

principalmente de agua (normalmente entre 96-99%) y tienden a deshidratarse en contacto con alcoholes como son el etanol y el isopropanol (Torres *et al.*, 2011).

Además el descenso del diámetro y peso de las perlas es menor en el soporte de ALG-SI en comparación con el ALG. A las 168 h de contacto, se observó una disminución del diámetro del 10,3% y del 15,2% para las perlas de ALG-SI y ALG, respectivamente (Figura 3b). Más acusada fue la diferencia observada en el peso para ambos soportes, siendo la disminución del 17,8% para ALG-SI, y del 37,2% para el ALG (Figura 3c). Se ha descrito que en los geles de ALG-SI, el componente inorgánico permite incrementar la dureza del gel (Coradin *et al.*, 2006), haciéndolo más resistente en soluciones con pH ácidos y altas concentraciones de etanol, como es el caso del vino. Este incremento en la resistencia del soporte de ALG-SI ha sido atribuido a (i) que las nanopartículas de silicato coloidal pueden dispersarse en la matriz de alginato como agente de carga y (ii) que la condensación de los silicatos forman un red de sílice donde el entrecruzamiento tiene lugar por enlaces covalentes que son más estables que las interacciones electrostáticas o los puentes de hidrógeno que tiene lugar en los geles de alginato (Coradin *et al.*, 2013).

En un intento de tener un conocimiento más preciso de las modificaciones observadas en la estabilidad de los soportes de ALG y ALG-Si en el vino se diseñaron los siguientes ensayos.

6.2. Estabilidad del soporte en mezclas hidroalcohólicas de etanol

En las diferentes concentraciones de etanol estudiadas (0, 10, 12, 14 y 16% vol.) se observa un incremento en el contenido de polisacáridos totales en el tiempo para los dos soportes (Figura 4a). Tal y cómo se comentó anteriormente en el apdo. 6.1., este incremento puede deberse a la difusión del alginato no polimerizado del interior de la perla (Strand *et al.*, 2004).

A un tiempo de exposición de 72 h, se realizó un análisis de varianza para comprobar el efecto que presentaba el tipo de soporte (ALG y ALG-SI) y la concentración de etanol sobre la liberación de alginato de las perlas. En la Tabla 1 se observa que ambos efectos y su interacción presentan diferencias estadísticamente significativas sobre el contenido de polisacáridos totales.

La media obtenida para la concentración de polisacáridos totales en el soporte de ALG-SI fue menor (0,10 $\mu\text{g/ml}$) a la observada para el soporte de ALG fue de 0,17 $\mu\text{g/ml}$. Mediante observación de los geles de ALG-Si con microscopia electrónica se ha evidenciado que en los poros de la matriz de alginato se encuentran alojadas estructuras inorgánicas procedentes de la polimerización de los silicatos que provocan una reducción de su tamaño de poro (Xu *et al.*, 2006).

Este fenómeno puede provocar una dificultad en la difusión del polímero no entrecruzado de alginato hacia el exterior de la perla. Se ha descrito que las propiedades de difusión de pequeñas moléculas como oxígeno, glucosa y aminoácidos no se encuentra modificadas por la presencia de una red inorgánica de sílice, si bien, dificulta el transporte de grandes moléculas como las proteínas seroalbúmina bovina y γ -globulina (Coradin *et al.*, 2003).

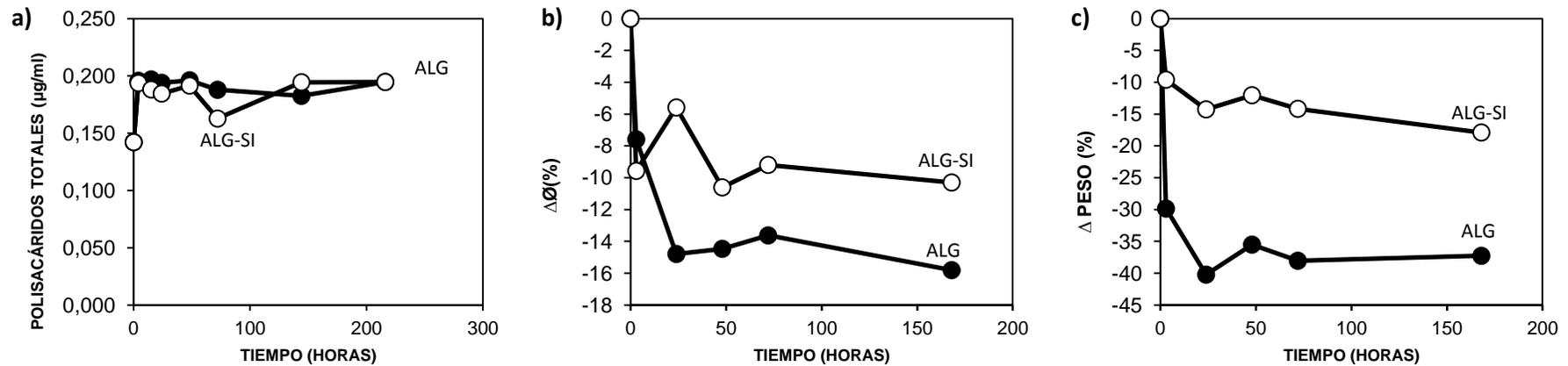


Figura 2. Evolución en el tiempo de la a) concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio), b) ΔØ (diámetro del soporte expresado en incremento porcentual (%)), y c) Δ PESO (peso del soporte expresado en incremento porcentual (%)) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en un vino.

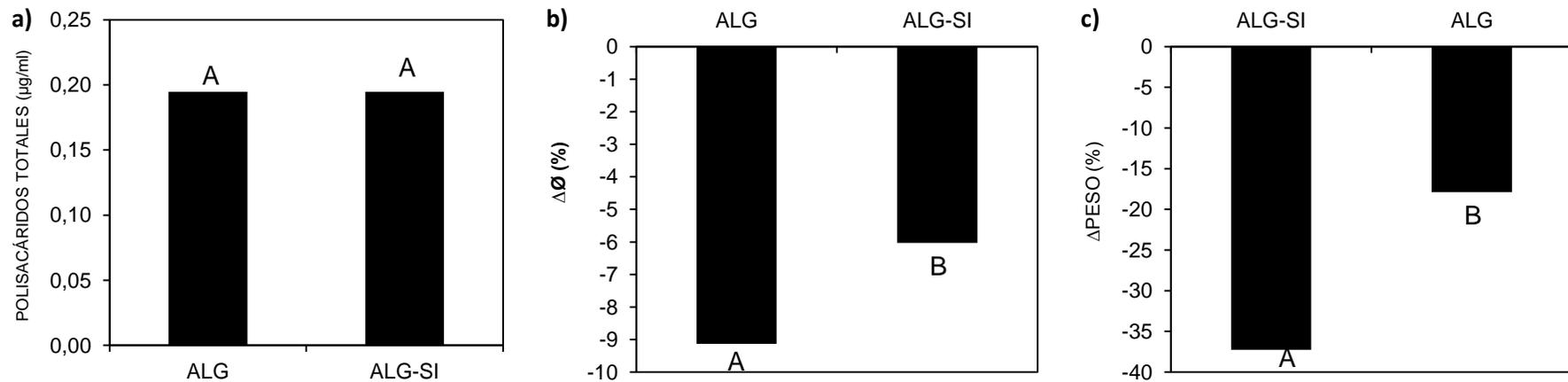


Figura 3. Comparación de a) concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio), b) ΔØ (diámetro del soporte expresado en incremento porcentual (%)), y c) Δ PESO (peso del soporte expresado en incremento porcentual (%)) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en un vino transcurridas 168 horas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($\alpha < 0,05$).

Por otro lado, se observa un incremento en este parámetro en las mezclas hidroalcohólicas de etanol. De este modo, la media obtenida en agua fue ligeramente menor (0,10 $\mu\text{g/ml}$) respecto a las ensayadas en las mezclas hidroalcohólicas (entre 0,14 y 0,15 $\mu\text{g/ml}$). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las disoluciones con etanol para 10-14% vol. (Figura 5).

De forma general el contenido de etanol provoca la disminución del diámetro de las perlas en los soportes de ALG y ALG-SI (Figura 4). En la solución que no contenía etanol (0% vol.) se observa un incremento para este parámetro. El porcentaje de cambio del diámetro frente al etanol del soporte es muy pequeño en relación con los otros estudios realizados (frente a vino, compuestos quelantes de calcio y pH), por lo que podemos decir que el etanol no provoca variaciones importantes en el tamaño del soporte. Torres et al., (2011) observó una disminución del 15,2% en el volumen de las perlas de ALG (diámetro inicial de 3,13 mm) después de 4 días de contacto en una mezcla hidroalcohólica de etanol del 20%. Estos autores sugieren que este comportamiento se debe a una solubilización del agua contenida en el gel en las mezclas hidroalcohólicas de etanol.

Para la variación del diámetro de las perlas introducidas en medios hidroalcohólicos, el ANOVA mostró que no existe un efecto estadísticamente significativo del tipo de soporte pero de la concentración de etanol en el medio (Tabla 2) (Figura 6). Se observa que existe una interacción entre los factores tipo de soporte y concentración de etanol que puede deberse a una alta variación en los resultados a pesar de haber realizado la media del incremento porcentual del diámetro con una muestra $n=30$.

El decremento porcentual medio del diámetro de las perlas es menor en las mezclas con una concentración de etanol más alta, a partir de 14% (Figura 6). Para las concentraciones más altas de etanol, sin embargo, no se observó un aumento de los polisacáridos totales en relación con las concentraciones más bajas estudiadas (Figura 5). Por ello, el mayor decremento del tamaño de las perlas podría tener origen en la difusión del agua contenido por el soporte hacia el medio exterior para compensar la concentración de etanol.

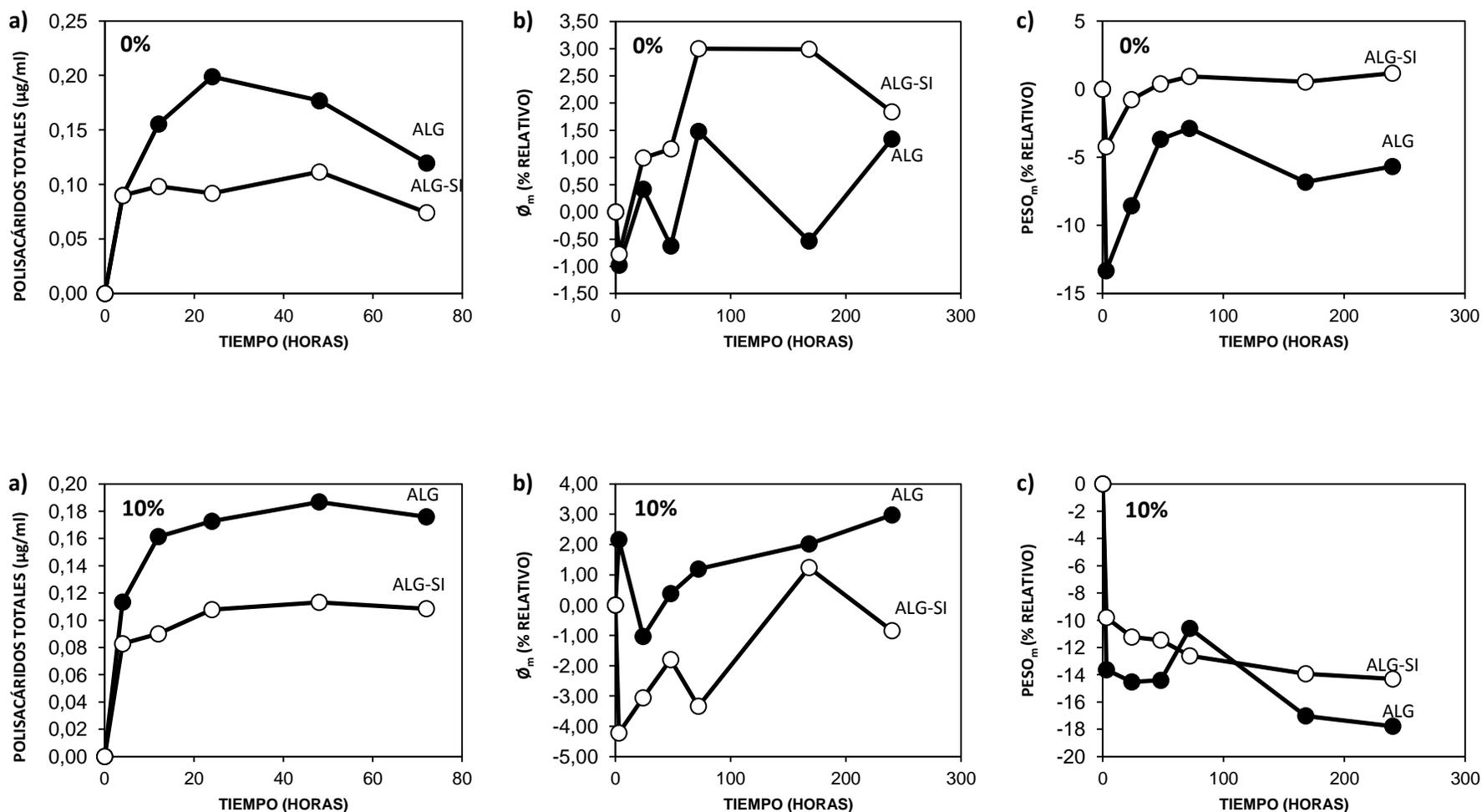


Figura 4. Evolución en el tiempo de a) la concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio), b) $\Delta\phi$ (diámetro del soporte expresado en incremento porcentual (%)), y c) Δ PESO (peso del soporte expresado en incremento porcentual (%)) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en soluciones hidroalcohólicas con una concentración de etanol de 0, 10, 12, 14 y 16% vol.

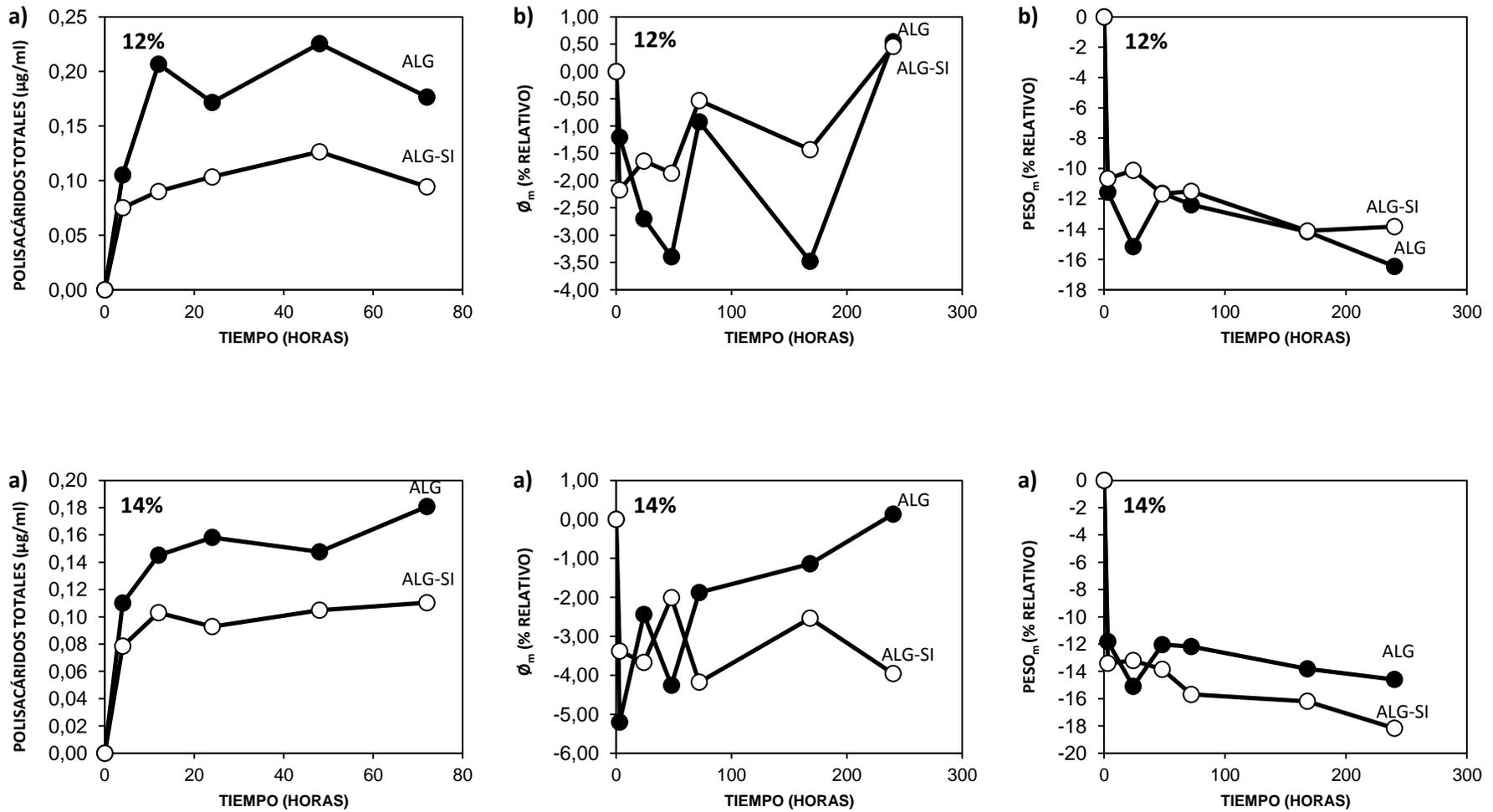


Figura 4. (Continuación)

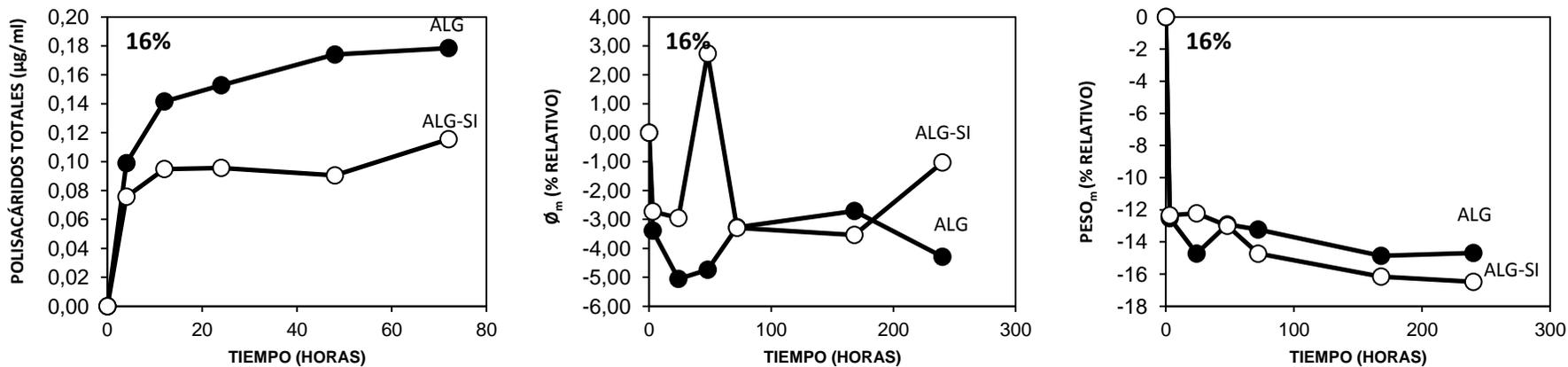


Figura 4. (Continuación)

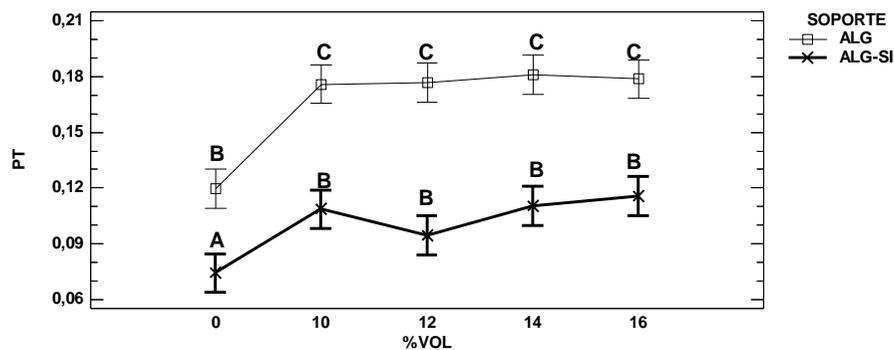


Figura 5. Gráfico de interacción para el estudio del efecto del tipo de soporte y la concentración de etanol sobre la cantidad de polisacáridos totales en tiempo 72 h. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($\alpha < 0,05$).

Tabla 1. ANOVA para el estudio del efecto del tipo de soporte y la concentración de etanol sobre la cantidad de polisacáridos totales para un tiempo de 72 h.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	0,0432041	1	0,0432041	413,82	0,0000
B:%VOL	0,0139731	4	0,00349327	33,46	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00143277	4	0,000358192	3,43	0,0201
RESIDUOS	0,00313212	30	0,000104404		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0617421	39			

Tabla 2. ANOVA para el estudio del efecto del tipo de soporte y la concentración de etanol sobre el incremento porcentual del diámetro de las perlas, en tiempo 72 h.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	52,853	1	52,853	3,33	0,0689
B:%VOL	842,813	4	210,703	13,29	0,0000
INTERACCIONES					
AB	575,36	4	143,84	9,07	0,0000
RESIDUOS	4549,26	287	15,8511		
TOTAL (CORREGIDO)	6009,22	296			

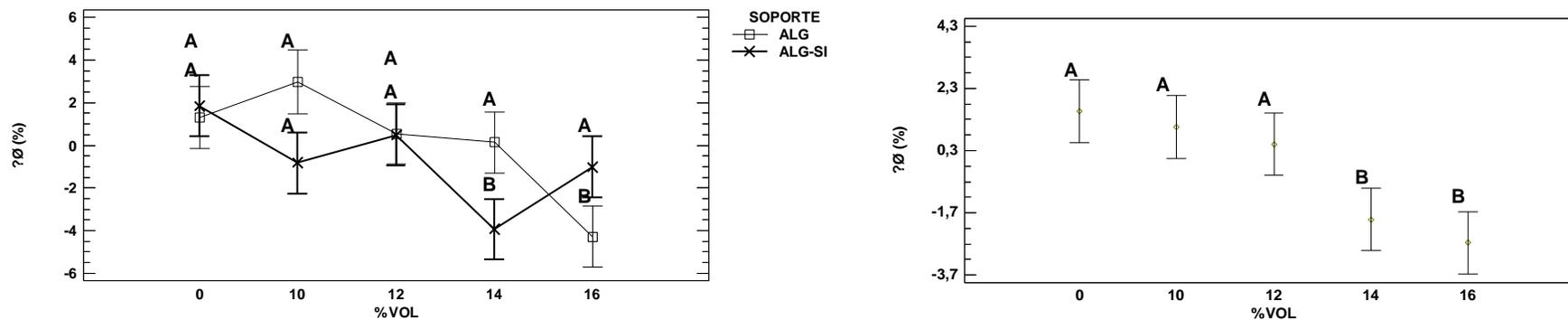


Figura 6. a) Gráfico de interacciones para el estudio del efecto del tipo de soporte y la concentración de etanol sobre el incremento porcentual del diámetro del soporte. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0,05$) y b) Valores medios del incremento porcentual del diámetro del soporte para la concentración de etanol, en tiempo 72 h. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0,05$).

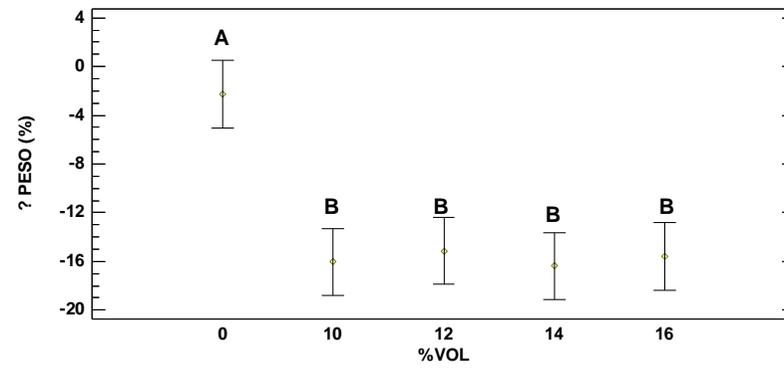


Figura 7. Valores medios del incremento porcentual del peso del soporte para el estudio del efecto concentración de etanol para un tiempo 72 h. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0,05$).

Por otro lado, el peso de las perlas también disminuyó en ambos soportes al introducirlos en las disoluciones con diferentes concentraciones de etanol (Figura 4). Este comportamiento está estrechamente relacionado con la pérdida de diámetro observado. No existe efecto estadísticamente significativo para el tipo de soporte ni interacción entre este y la concentración de etanol. Sin embargo el ANOVA realizado mostró que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de etanol sobre este parámetro (Tabla 3). En la Figura 7 se observa que existen diferencias significativas para el incremento porcentual del peso del soporte entre el medio que no contiene etanol (0%) y los medios hidroalcohólicos. El decremento del peso de las perlas introducidas en medios hidroalcohólicos podría tener el mismo origen que el decremento del diámetro, la difusión de agua.

Tabla 3. ANOVA para el estudio del efecto del tipo de soporte y la concentración de etanol sobre el incremento porcentual del peso de las perlas, en tiempo 72 h.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	11,4636	1	11,4636	2,04	0,1838
B:%VOL	589,916	4	147,479	26,23	0,0000
INTERACCIONES					
AB	70,4555	4	17,6139	3,13	0,0651
RESIDUOS	56,2195	10	5,62195		
TOTAL (CORREGIDO)	728,054	19			

6.3. Estabilidad del soporte en disoluciones acuosas a distinto pH

La Figura 8 muestra la evolución de los polisacáridos totales en el tiempo para muestras que contenían perlas de geles de ALG y ALG-SI a diferentes pH. Se observa que con el transcurso del tiempo la difusión de polisacáridos fue mayor para todos los pH estudiados (3,0, 3,3, 3,6 y 6,9) y para los dos tipos de soporte. Para estudiar el efecto del soporte y el pH sobre el contenido en polisacáridos totales se realizó un ANOVA multifactorial transcurridas 48 horas (Tabla 4). Se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre el uso de los diferentes soportes y entre los distintos valores de pH, así como una interacción entre ambos factores. El aumento en la concentración de polisacáridos totales fue menor en las disoluciones que contenían perlas formadas por un gel de ALG-SI, probablemente debido a una menor porosidad del mismo, tal y como se discutió en el apdo. 6.2. También se observa una tendencia a disminuirse la liberación de polisacáridos a medida que incrementamos el valor de pH (desde 3,0 a 3,9) (Figura 10).

Se observa también que en el intervalo de pH estudiado el incremento porcentual del diámetro y peso de las perlas es alto para las perlas formadas por geles de ALG (diámetro ~50% mayor que el inicial y aumento de peso del ~180% para pH 3,9 transcurridas 72 horas), mientras que en las perlas que contenían el componente inorgánico (ALG-SI) el incremento para ambos parámetros es menor.

El ANOVA multifactorial realizado transcurridas 72 horas para comprobar el efecto del tipo de soporte y del pH sobre el diámetro (Tabla 4) mostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de soportes y entre los diferentes pH estudiados. Los incrementos porcentuales medios obtenidas para cada pH fueron:

17,3% para pH 3, 22,8% para pH 3,3, 29,8% para pH 3,6 y 39,8% para pH 3,9. Además existe una interacción entre el tipo de soporte y el pH.

Tabla 4. ANOVA para el estudio del efecto de del tipo de soporte y el pH sobre el contenido en polisacáridos totales, en tiempo 48 h.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	0,0033894	1	0,0033894	47,97	0,0000
B:pH	0,00317255	3	0,00105752	14,97	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00217487	3	0,000724957	10,26	0,0002
RESIDUOS	0,00169581	24	0,0000706586		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0104326	31			

Tabla 5. ANOVA para el estudio del efecto del tipo de soporte y el pH sobre el incremento porcentual del diámetro de las perlas, en tiempo 72 h.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	10029,5	1	10029,5	378,96	0,0000
B:pH	17036,3	3	5678,77	214,57	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1762,39	3	587,464	22,20	0,0000
RESIDUOS	6113,6	231	26,4658		
TOTAL (CORREGIDO)	34912,3	238			

Tabla 6. ANOVA para el estudio del efecto de del tipo de soporte y el pH sobre el incremento porcentual del peso de las perlas, en tiempo 72 h.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:SOPORTE	8402,67	1	8402,67	556,26	0,0000
B:pH	21177,9	3	7059,3	467,33	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2615,12	3	871,706	57,71	0,0000
RESIDUOS	120,845	8	15,1056		
TOTAL (CORREGIDO)	32316,5	15			

Dentro del rango de pH estudiado, los mayores incrementos de tamaño y peso de las perlas, para ambos soportes, se han producido en el pH más básico (3,9), sin embargo a pH neutros (~7) los incrementos fueron notablemente menores (Figura 4. b) 0%). Este hecho puede corresponderse con un comportamiento no lineal del efecto del pH sobre las matrices de inmovilización. Mumper *et al.* (1994), en estudios de estabilidad de geles de ALG expuestos a disoluciones acuosas ácidas, observó una reducción del tamaño de las perlas al reducirse el pH de la disolución de 4 a 1. No se conoce exactamente el mecanismo que provoca que bajos pH contraigan los geles de ALG. Sin embargo, a valores de pH menores de los pK_a para el ácido manurónico y el ácido gulurónico (3,38 y 3,65 respectivamente), los grupos carboxílicos de las moléculas de ALG se encuentran sin disociar (Wu *et al.*, 2010), formando una estructura de gel mucho más compacta debido a la reducción de las repulsiones electrostáticas entre los polímeros de ALG (You *et al.*, 2001).

El incremento de los parámetros diámetro y peso de las perlas formadas por un gel de ALG al ser introducidas en disoluciones de pH ácidos han sido estadísticamente

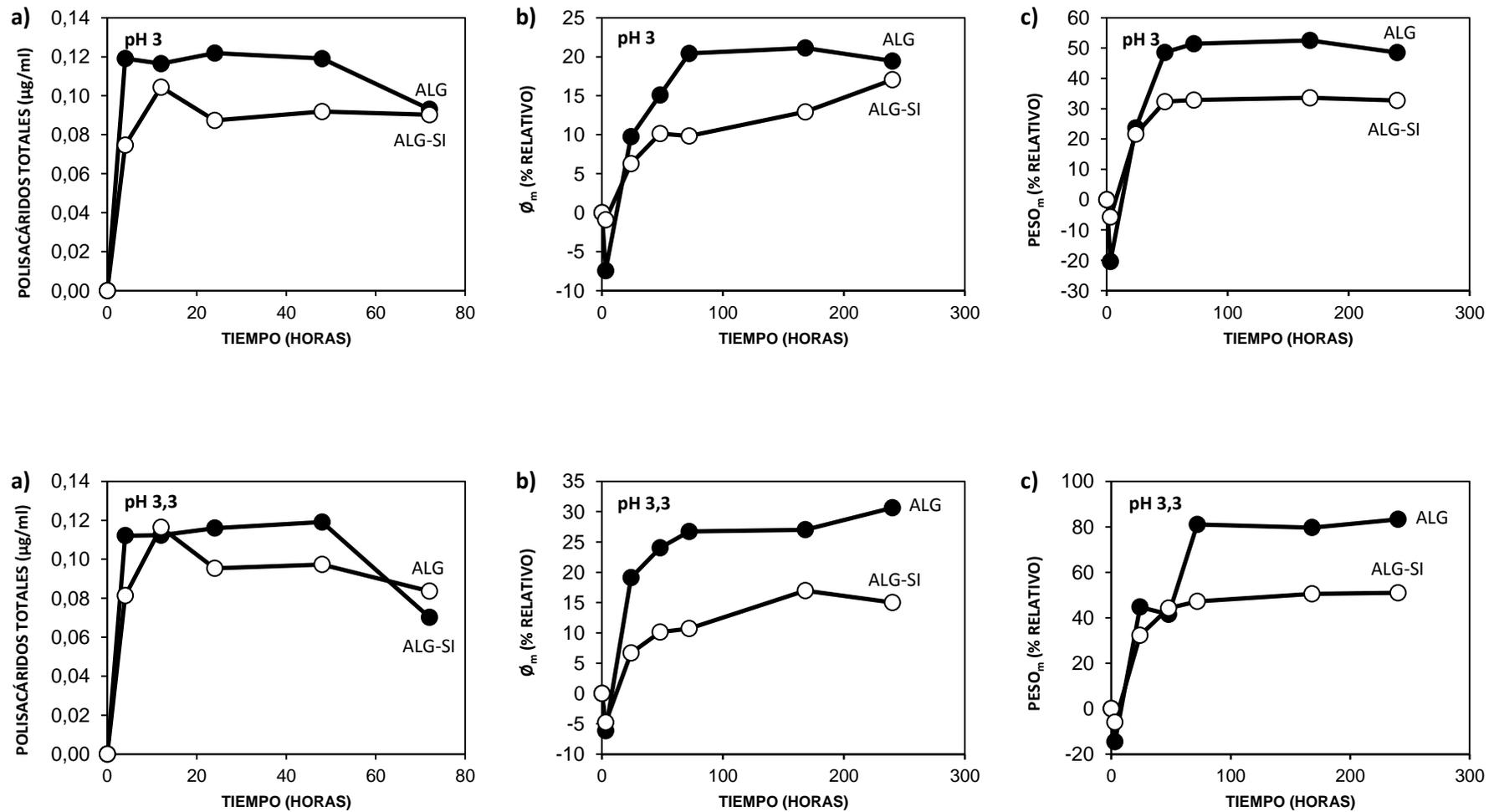


Figura 8. Evolución en el tiempo de a) la concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio), b) $\Delta\phi$ (diámetro del soporte expresado en incremento porcentual (%)), y c) Δ PESO (peso del soporte expresado en incremento porcentual (%)) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en soluciones con pH 3, 3,3, 3,6 y 3,9.

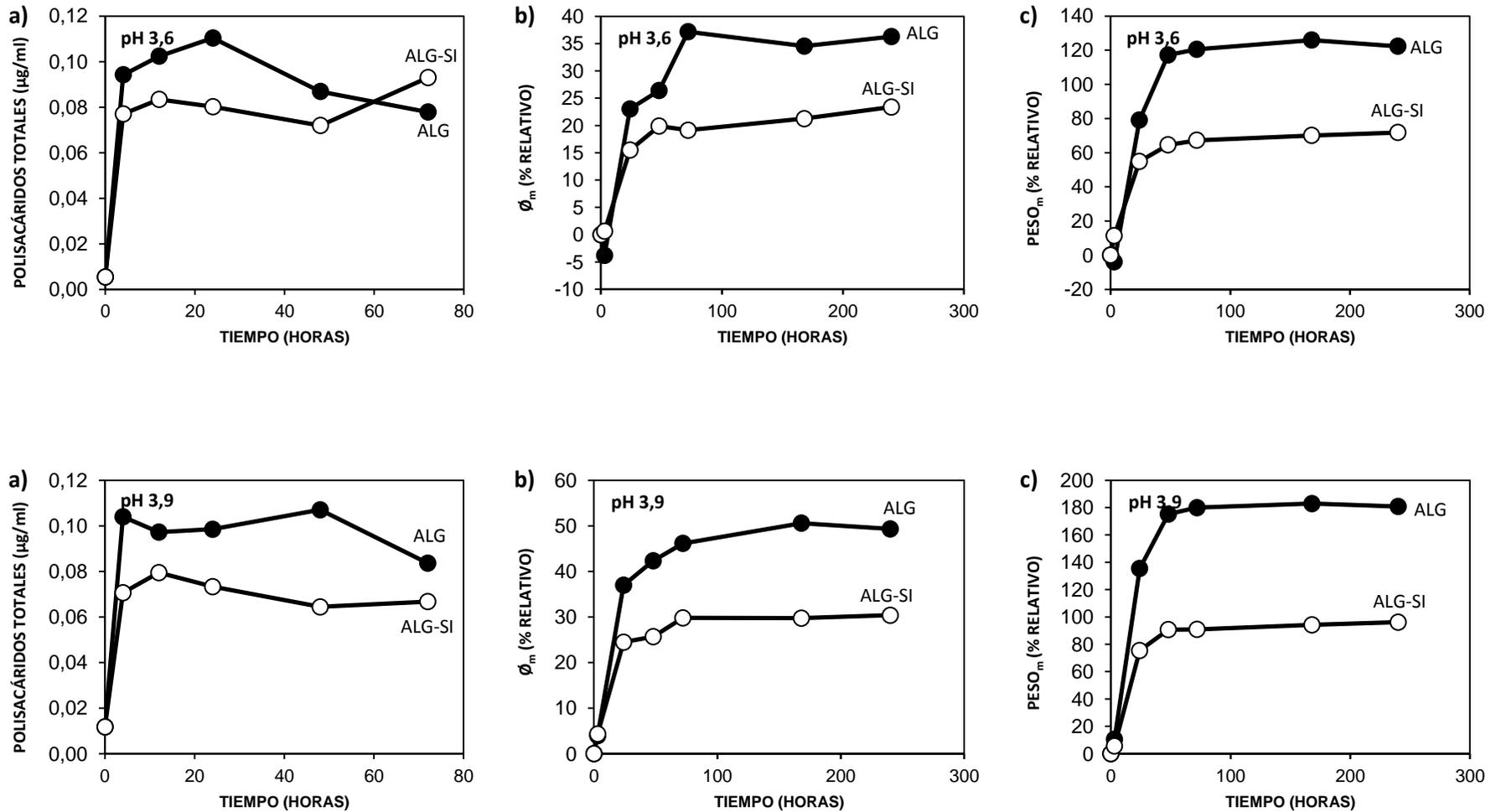


Figura 8. (Continuación)

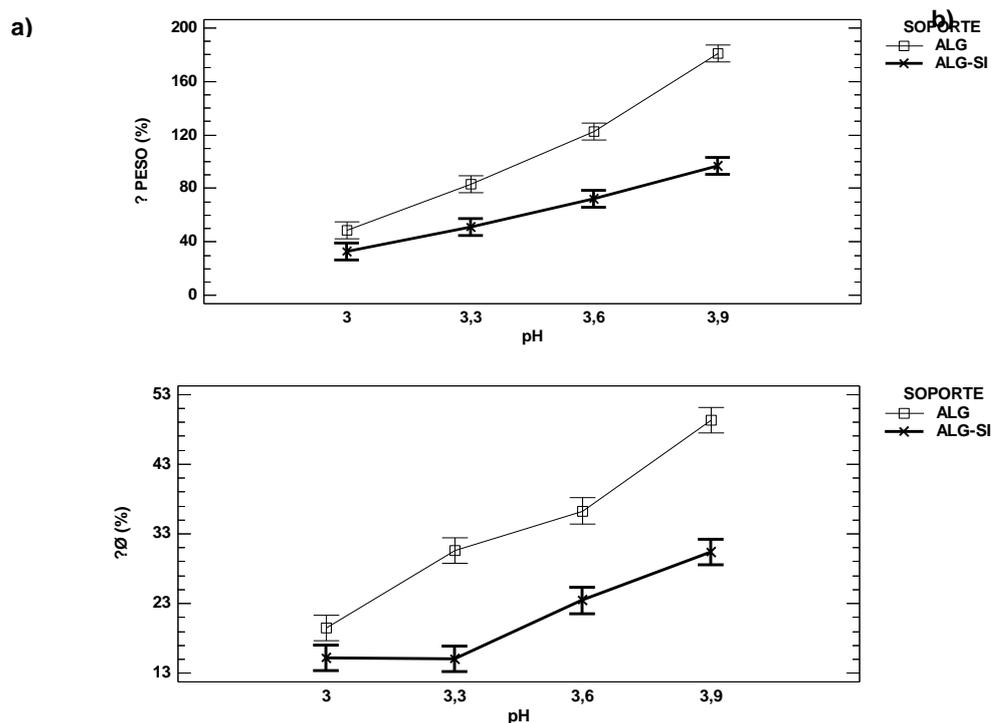


Figura 9. a) Interacciones y 95,0% Intervalos de confianza para el estudio del efecto del tipo de soporte y el pH sobre el incremento porcentual del diámetro del soporte. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0,05$), y b) Interacciones y 95,0% Intervalos de confianza para el estudio del efecto del tipo de soporte y el pH sobre el incremento porcentual del peso del soporte.

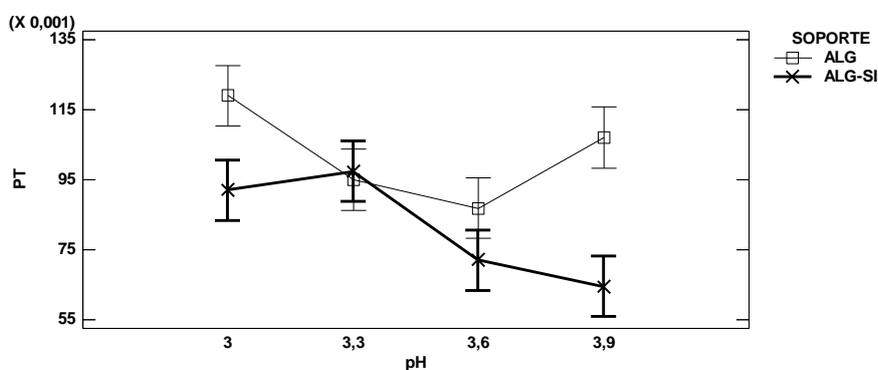


Figura 10. Gráfico de interacciones para el estudio del efecto del tipo de soporte y el pH sobre el contenido en polisacáridos totales.

mayores que los de las perlas formadas por un gel de ALG-SI, es decir, las perlas de ALG han aumentado más su tamaño y peso que las de ALG-SI. Debido a la estructura del componente inorgánico, las perlas de ALG-SI son más rígidas y menos sensibles a las modificaciones que provoca el pH sobre el soporte.

En la Figura 9 se observan las diferencias que existen entre los incrementos de tamaño y peso a diferentes pH. Tanto el tamaño como el peso de ambos soportes se

incrementaron con el aumento del pH pero las diferencias entre los dos tipos de soportes son menos acusadas a pH ácidos que a pH menos ácidos dentro del intervalo estudiado.

Cada vez se producen vinos más desequilibrados por efecto del cambio climático, con pH más elevados (Vila-Crespo *et al.*, 2010). Los geles de ALG son muy sensibles a las modificaciones producidas por valores de pH ~ 4, lo que da lugar a riesgo de rotura de las perlas y liberación del material inmovilizado. El uso de geles que contengan un componente inorgánico como el sílice presenta una importante ventaja en la inmovilización de BAL para realizar FML, ya que son menos sensibles a estas modificaciones y se reduce el riesgo de rotura de las perlas por excesivo hinchamiento.

6.4. Estabilidad del soporte en disoluciones acuosas con compuestos quelantes de calcio

Tanto las perlas formadas con geles de ALG como las de ALG-SI se degradaron frente al efecto de quelantes de calcio (citrato de sodio 27,5 mM y EDTA 15 mM). A partir de 3 horas tras la suspensión de las perlas no fue posible la manipulación de las mismas ni, por tanto, la determinación del diámetro y el peso.

En la Figura 11 se observa el aumento de la concentración en polisacáridos totales para ambos soportes frente una disolución que contiene agentes quelantes de calcio. Este aumento en el contenido de polisacáridos en la disolución se debe a que los compuestos quelantes de calcio eliminan los iones de Ca^{2+} y degradan los enlaces del gel de alginato (Gombotz *et al.*, 2012). El ANOVA realizado (Figura 12) mostró que no existen diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0,05$) para la concentración de polisacáridos totales, tamaño del diámetro o peso de las perlas entre los dos soportes de inmovilización después de 3 h de tratamiento.

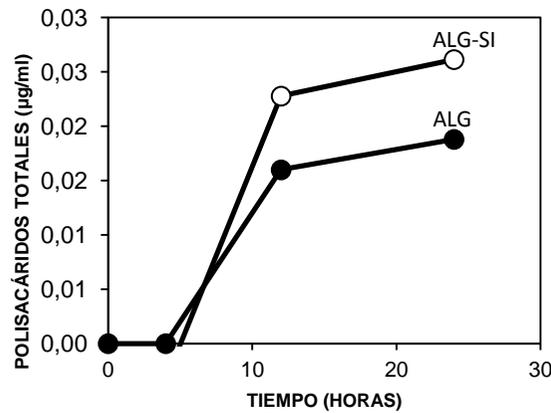


Figura 11. Evolución de la concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en una disolución tampón de citrato de sodio 27,5 mM y EDTA 15 mM.

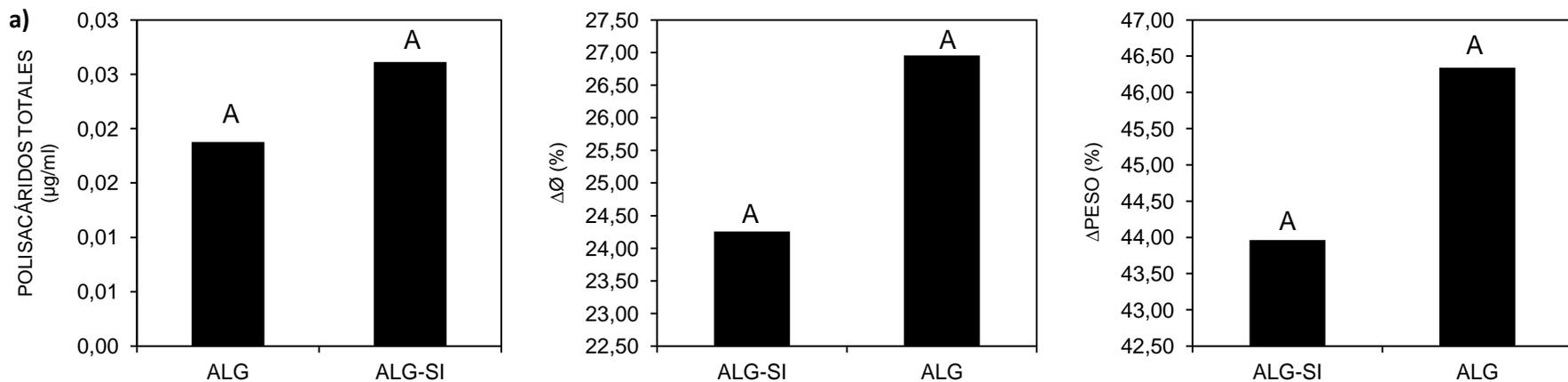


Figura 12. Comparación de a) concentración de polisacáridos totales (µg/ml alginato de sodio), b) $\Delta\emptyset$ (diámetro del soporte expresado en incremento porcentual (%)), y c) Δ PESO (peso del soporte expresado en incremento porcentual (%)) para soportes de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-SI) en una disolución tampón de citrato de sodio 27,5 mM y EDTA 15 mM transcurridas 3 horas. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias ($\alpha > 0,05$).

7. Conclusiones

El comportamiento del gel de alginato-sílice frente al gel de alginato en el vino se ha relacionado con el comportamiento observado en los distintos factores estudiados. Los agentes quelantes de calcio, el contenido en etanol y los pH ácidos afectan a la estabilidad química de ambos soportes, si bien para los dos últimos el gel de ALG-SI presentó un aumento en la estabilidad estadísticamente significativo.

El uso de geles de alginato-sílice como soporte para la inmovilización de bacterias lácticas y su aplicación a la fermentación maloláctica en vinos tintos presenta diferencias ventajosas frente al uso de geles de alginato de sodio. Sin bien, dada la complejidad que presenta el vino en su composición, son necesarios más estudios que aborden la estabilidad química de este soporte, teniendo en cuenta la interacción existente entre los factores estudiados, la estabilidad operacional del soporte y su efecto sobre las características organolépticas de los vinos.

Bibliografía

- Blondeau M, Coradin T. Living Materials from Sol-Gel Chemistry: Current Challenges and Perspectives. *J Mater Chem*. 2012; 22: 22335-22343.
- Brun-Graepi AKAS, Richard C, Bessodes M, Scherman D, Merten OW. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. *J Control Release*. 2011; 149(3): 209-224.
- Callone E, Campostrini R, Carturan G, Cavazza A, Guzzon R. Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *J Mater Chem*. 2008; 18(40): 4839.
- Coradin T, Nassif N, Livage J. Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003; 61(5-6): 429-34.
- Coradin T, Allouche J, Boissière M, Livage J. Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology. *Curr Nanosci*. 2006; (2): 1-11.
- Guzzon R, Carturan G, Krieger-Weber S, Cavazza A. Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. *Ann Microbiol*. 2011; 61(1): 381-390.
- Genisheva Z, Macedo S, Mussatto S, Teixeira JA, Oliveira JM. Production of white wine by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on grape pomace. *J Inst Brew*. 2012; 118: 163-173.
- Gill I, Ballesteros A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol*. 2000; 18(7): 282-96.
- Gombotz WR, Wee SF. Protein Release from Alginate Matrices. *Adv Drug Delivery Rev*. 201; 64: 194-205.

- Grant GT, Morri ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Lett.* 1973; 32: 195-198.
- Hidalgo Togores J. *Tratado de Enología*. Vol. 1. 2ª ed. Madrid: Mundi-Prensa Libros; 2011.
- Livage J. Sol-gel synthesis of heterogeneous catalysts from aqueous solutions. *Catal Today.* 1998; 41: 3-19.
- Melvik JE, Dornish M. Alginate as a carrier for cell immobilisation. In: Nedovic V, Willaert R. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. 1ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2004. p 33-51
- Mumper RJ, Hoffman AS, Puolakkainen P, Bouchard LS, Gombotz WR. Calcium alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1): stabilisation of TGF- β 1 by the addition of polyacrylic acid within acid treated beads. *J Control Rel.* 1994; 30: 241-251
- Ribérau Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. *Tratado de Enología*. Vol. 1. 1ª ed. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur; 2003.
- Rooke JC, Léonard A, Su BL. Targeting Photobioreactors: Immobilisation of Cyanobacteria within a Porous Silica Gel Using Biocompatible Methods. *J Mater Chem.* 2008; 18:1333-1341.
- Rossi J, Clementi F. L-Malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. *Am J Enol Vitic.* 1984; 36: 100–102.
- Santamaría, N. Caracterización enológica de bacterias lácticas inmovilizadas en matrices de alginato-sílice [Trabajo Fin de Grado]. Universidad de Valladolid; 2015.
- Segarra I, Lao C, López-Tamames E, De La Torre-Boronat MC. Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am J Enol Vitic.* 1995; 46: 564-570.
- Simó G. Microencapsulación de *Oenococcus oeni* en un soporte mixto de sílice-alginato. Aplicación a la fermentación maloláctica de vinos tintos [Trabajo Fin de Máster]. Universidad de Valladolid; 2014.
- Strand, Berit L, Skjåk-Bræk, Gåserød O. Microcapsule formulation and formation. In: Nedovic V, Willaert R. *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*. 1ª ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2004. p 33-51.
- Torres LG, Velasquez A, Brito-Arias MA. Ca-alginate spheres behavior in presence of some solvents and water-solvent mixtures. *Adv Biosci Biotechnol.* 2011; 2(01): 8.
- Trivedi UJ, Bassi AS, Zhu J. Investigation of phenol removal using sol-gel/alginate immobilized soybean seed hull peroxidase. *Can J Chem Eng.* 2006; 84: 239-247.
- Vila-Crespo J, Rodríguez-Nogales JM, Fernández-Fernández E, Hernández-Moral MC. Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate

conditions. In: Méndez-Vilas A. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Vol. 2. 1ª ed. Badajoz: Formatex Research Center; 2010. p 920-929.

Wu C, Zhu Y, Chang J, Zhang Y, Xiao Y. Bioactive inorganic-materials/alginate composite microspheres with controlables drug-delivery ability. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 2010; 94(1): 32-43.

Xu SW, Jiang ZY, Lu Y, Wu H, Yuan WK. Preparation and catalytic properties of novel alginate-silica dehydrogenase hybrid biocomposite beads. Ind Eng Chem Res. 2006; 45(2): 511-517.

You JO, Park SB, Park HY, Haam S, Chung CH, Kim WS. Preparation of regular sized Ca-alginate microspheres using membrane emulsification method. J Microencapsul. 2001; 18(4): 521-532.

Zhang B-B, Wang L, Charles V, Rooke JC, Su B-L. Robust and Biocompatible Hybrid Matrix with Controllable Permeability for Microalgae Encapsulation. ACS Appl Mater Interfaces. 2016; 8: 8939-8946.