



**COINOCULACIÓN DE BACTERIAS  
LÁCTICAS ENCAPSULADAS EN  
BIOCOMPOSITOS DE ALGINATO-SÍLICE  
PARA EL DESARROLLO DE LA  
FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINOS  
TINTOS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Curso: 2017/18

**Alumno: VIRGINIA VILLACORTA FRONTELA**  
**Tutor: JOSE MANUEL RODRIGUEZ NOGALES**  
**Cotutor: Guillermo Simó Hernando**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid



## TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen .....	4
1. Summary .....	4
2. Antecedentes.....	5
3. Objetivos.....	8
4. Materiales y métodos.....	8
4.1. Preparación de muestras .....	8
4.2. Desarrollo y seguimiento de la FA.....	11
4.3. Desarrollo y seguimiento de la FML .....	11
4.3.1. Inmovilización de las BAL .....	12
4.4. Control analítico .....	13
4.5. Tratamiento estadístico de datos.....	14
5. Resultados y discusión .....	14
5.1. Seguimiento de la FA .....	14
5.2. Seguimiento de la FML.....	17
5.3. Análisis químico de los vinos.....	24
6. Conclusión.....	27
7. Bibliografía.....	28



## 1. Resumen

La fermentación maloláctica (FML) es una etapa crucial en la elaboración del vino tinto, y en algún vino blanco, cuyo inicio y finalización sigue siendo un reto bajo las condiciones actuales de vinificación.

En el presente trabajo se pretende evaluar el impacto de la encapsulación de *Oenococcus oeni* en geles mixtos de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si) en el desarrollo de la FML bajo condiciones de pH y grado alcohólico (GA) poco favorables para su inicio y finalización. Se ensayaron dos momentos para la inoculación de las bacterias (tanto en estado libre como encapsuladas). En el primero se realizó una inoculación de forma secuencial de las bacterias una vez terminada la fermentación alcohólica (FA), por el contrario en el segundo caso se coinocularon las levaduras y las bacterias al inicio de la FA. Se realizó un seguimiento de la FA y la FML, y una caracterización analítica de los distintos vinos una vez acabada la FML. La inoculación de las bacterias encapsulada en geles de ALG-Si en el vino, una vez acabada la FA, logró completar la FML en los vinos elaborados con mostos con una alta concentración en azúcares, mientras las bacterias en estado libre y las encapsuladas en ALG no pudieron finalizar el proceso fermentativo. La inoculación simultánea de levaduras y bacterias encapsuladas en ALG-Si permitió una reducción significativa del tiempo necesario para completar la FML en mostos con una alta concentración en azúcares y bajo pH, sin una modificación notable en la composición físico-química de los vinos (en comparación con la inoculación secuencial).

## 1. Summary

Malolactic fermentation (MLF) is a crucial stage in the winemaking of red wine, and in some white wine, whose start and end remain a challenge under the current conditions of winemaking.

The aim of this study is to evaluate the impact of the encapsulation of *Oenococcus oeni* in gels of alginate (ALG) and alginate-silica (ALG-Si) in the development of MLF under conditions of pH and alcoholic degree unfavourable for its initiation and completion. Two times were tested for bacterial inoculation (both free and encapsulated bacteria). In the first one, a sequential inoculation of the bacteria was carried out once the alcoholic fermentation (AF) was finished, on the contrary, in the

second trial the yeasts and bacteria were co-inoculated at the beginning of AF. A control of AF and MLF, and an analytical characterization of the different wines once MLF was finished were carried out. Sequential inoculation of ALG-Si encapsulated bacteria in wine successfully completed MLF in wines made with musts with a high concentration of sugars, while freehand ALG encapsulated bacteria could not complete the fermentation process. Simultaneous inoculation of yeasts and ALG-Si encapsulated bacteria allowed a significant reduction of the time necessary to complete MLF in musts with a high concentration of sugars and low pH, without a notable change in the physico-chemical composition of wines (in comparison with sequential inoculation).

## 2. Antecedentes

La FML supone la transformación del ácido L-málico contenido en el vino en ácido L-láctico. Los agentes que desarrollan la FML son las bacterias ácido-lácticas (BAL) y en especial la especie *O. oeni* (Bauer & Dicks, 2004). Este proceso es difícil de controlar y el desarrollo de las BAL en el vino es complicado ya que es un sustrato poco favorable para su crecimiento y metabolismo (alta concentración de etanol, bajo pH, pocos nutrientes y posible presencia de agentes inhibidores (sulfuroso, polifenoles, ácidos grasos liberados de las levaduras, residuos químicos, etc.)). Actualmente las condiciones de vinificación son más estresantes para las BAL (Reguant et al., 2010), ya que el cambio climático que estamos viviendo está provocando en las regiones vitivinícolas cálidas un aumento de los azúcares en el mosto de uva, lo que a su vez da lugar a vinos desequilibrados con un mayor GA (Vila-Crespo et al., 2006). En las regiones frías, los vinos presentan un bajo pH y un moderado incremento de la concentración de etanol que limitan la capacidad fermentativa de las BAL (Lasik, 2013). Debido a estas circunstancias surge la necesidad de mejorar las condiciones para la adaptación de *O. oeni* a este ambiente estresante en un intento de mejora del proceso de la FML.

La FML se desarrolla tradicionalmente tras la FA (figura 1), sin embargo, para que arranque la conversión del ácido L-málico son necesarias poblaciones de bacterias de alrededor de  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml de vino (Blouin & Peynaud, 2004). Tras la FA se produce un periodo de latencia de las BAL, que suele oscilar entre una y tres semanas, en el que debido a la baja población de BAL no se produce la transformación del ácido L-málico. Una vez que termina la FA, la FML puede suceder espontáneamente por las BAL presente en el vino; sin embargo, este desarrollo es

impredecible. La FML no siempre se lleva a cabo, o no se hace en el momento adecuado ni en condiciones óptimas, ya que son muchos los factores que influyen en el crecimiento y desarrollo de las BAL del vino y, como consecuencia, en la transformación maloláctica.

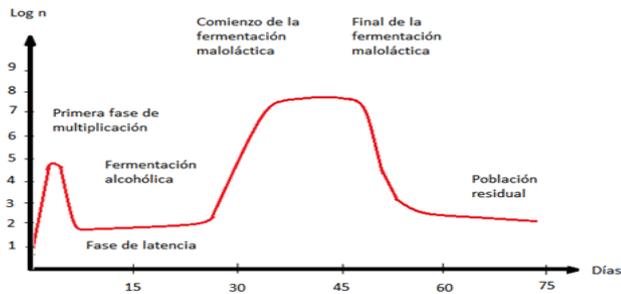


Figura 1. Evolución de la población de bacterias lácticas durante la vinificación (Hidalgo, 2011).

Se han propuesto varias tecnologías para mejorar el desarrollo de la FML utilizando BAL, principalmente *O.oeni*, debido a su buena adaptación a pH bajos y altas concentraciones de etanol (Wibowo et al., 1985). La inducción de la FML inoculando altos niveles de BAL seleccionadas, permite tanto un mejor control del proceso como garantizar que se llevará a cabo durante el tiempo requerido para la producción del vino (Gao & Fleet, 1994; Formisyn et al., 1997; Maicas et al., 1999). A pesar de los avances que se han realizado en los últimos años en la selección de adecuadas cepas de *O. oeni*, el inicio y la finalización de la FML siguen siendo un reto bajo las condiciones actuales de vinificación (Betteridge et al., 2015).

Puede resultar útil la inoculación de BAL inmovilizadas en altas concentraciones ya que se puede reducir o eliminar su fase de latencia (Hidalgo, 2011), minimizando el riesgo de contaminaciones microbianas y acortando la duración de la FML. También, la matriz de inmovilización puede mejorar la tolerancia de las BAL a las condiciones extremas del vino. Además, el empleo de BAL inmovilizadas permite su simple reutilización durante varios ciclos seguidos (Kurayama et al., 2012). Finalmente, se posibilita el inicio o la parada de la FML en un instante determinado sin que ello suponga un aspecto negativo en la calidad del vino (Simó et al., 2017a; Kourkoutas et al., 2004).

Principalmente para la inmovilización de las bacterias se han empleado las técnicas de atrapamiento en geles y de inmovilización en la superficie de un soporte

sólido, generalmente empleando matrices orgánicas (ALG, carragenato, quitosano, material celulósico, virutas de madera, etc.). El soporte más popular empleado para la inmovilización de células es el basado en el ácido algínico. Se trata de un polisacárido obtenido a partir de algas marinas que está formado por dos monómeros: el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G) y el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) que se distribuyen en secciones constituyendo homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM-) o heteropolímeros en los que los bloques M y G se alternan (-MGMG-) (Lupo et al., 2012). El proceso de gelificación del ALG se produce en presencia de cationes multivalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Coradin et al., 2001), que actúan como núcleos de unión entre los G-bloques de las moléculas de ALG produciéndose así un entrecruzamiento molecular que da como resultado una estructura en forma de caja de huevos (Lupo et al., 2012). La relación de bloques M y bloques G, la longitud de la secuencia de éstos últimos o el peso molecular son factores críticos que influyen en las propiedades del gel resultante (Ramos, 2013). Presenta además la ventaja de que es un gel fácil de preparar, económico y las condiciones de inmovilización son suaves (Vila-Crespo et al., 2006).

En la aplicación de bacterias inmovilizadas en el vino se ha estudiado la posibilidad de encapsular *O. oeni* en una matriz de ALG (Guzzon et al., 2011), pero se trata de un biopolímero con unas propiedades mecánicas poco consistentes y con una baja estabilidad química, limitando su aplicabilidad comercial. Una alternativa para solucionar esta problemática es la elaboración de biocompositos de ALG-Si, ya que el componente inorgánico permite incrementar la dureza del gel y mejorar su estabilidad química (Coradin et al., 2006). Previos estudios han demostrado la buena capacidad del soporte de inmovilización de ALG-Si para encapsular BAL y para realizar la FML. Además, la inclusión de una red inorgánica de material síliceo en el gel de ALG de calcio permitió mejorar sensiblemente sus características mecánicas (Simó et al., 2017b) y su actividad metabólica en vinos de alta graduación alcohólica, bajo pH y a bajas temperaturas de fermentación (Simó et al., 2017c).

Otra técnica enológica estudiada para mejorar la FML es la coinoculación de levaduras y bacterias durante la FA (inoculación simultánea). Recientemente, la literatura menciona la posibilidad de realizar simultáneamente la inoculación de las levaduras responsables de la FA junto con las bacterias inductoras de la FML en el mosto (Guzzon et al., 2011). Las bacterias pueden de esta forma adaptarse mejor a la creciente concentración de etanol y crecer en un medio con una gran cantidad de nutrientes (Zhang et al., 2006), sin desembocar necesariamente en la producción de

excesivas cantidades de ácido acético (Beelman & Kunkee, 1985). En este caso, es necesario tener en cuenta las posibles interacciones entre las levaduras y las bacterias utilizadas (King & Beelman, 1986). Algunos autores afirman que ciertas levaduras poseen la habilidad de inhibir a las BAL puesto que tienen un impacto negativo en la desacidificación y producción de vinos de calidad (Wibowo et al., 1988; Gilis et al., 1996), por lo que para el empleo de este tipo de inoculación es preciso la selección de cepas microbianas compatibles.

Desde un punto de vista técnico, el vino coinoculado estaría rápidamente listo para los procesos posteriores, como el trasiego, la clarificación y la adición de SO<sub>2</sub>, mejorando la estabilidad microbiana y la eficiencia de la vinificación (Jussier et al., 2006).

### 3. Objetivos

El objetivo perseguido con el presente estudio es comparar el comportamiento fermentativo de las BAL libres e inmovilizadas (en geles de ALG y ALG-Si) inoculadas en dos tiempos distintos: (i) al final de la FA (inoculación secuencial) y (ii) al inicio de la FA (coinoculación) en mostos con distinto °Brix y pH.

## 4. Material y métodos

### 4.1. Preparación de muestras

Para la realización de los ensayos se empleó mosto tinto de la variedad Cabernet Sauvignon de la vendimia 2016. Dicho mosto tenía un pH de 3,8 y un °Brix de 20,8% vol. Se ajustó el pH (3,0 y 3,8) y el °Brix (20,8 y 25,3) del mosto para obtener las diferentes muestras sobre las cuales se llevó a cabo el estudio (tabla 1). La corrección del °Brix se realizó mediante la adición de sacarosa al mosto de partida. La corrección de la acidez del vino se llevó a cabo mediante la adición de HCl concentrado.

El estudio consistió en el seguimiento de la FML de forma paralela en: (i) muestras en las cuales se realizó la inoculación de las BAL una vez acabada la FA (inoculación secuencial) y (ii) muestras en las cuales se realizó la inoculación de las BAL al comienzo de la FA (inoculación simultánea o coinoculación).

La inoculación de las BAL, para la FML, se llevó a cabo con tres tipos de inóculos diferentes: (i) BAL inmovilizadas en cápsulas de ALG; (ii) BAL inmovilizadas en cápsulas de ALG-Si y (iii) BAL libres (sin inmovilizar).

Para el seguimiento de las fermentaciones se realizaron muestras por duplicado. Por lo tanto las muestras de partida fueron un total de 30 (4x3x2+6controles) en el caso de la inoculación secuencial de levaduras y bacterias y un total de 60 muestras en el caso de la inoculación simultánea, 30 muestras para el seguimiento de la FA mediante pesada y 30 similares para el seguimiento de la FML, evitando así la pérdida de peso durante la toma de muestra de para el seguimiento de la FML (tabla 1). Se realizaron ensayos control (i) sin inoculación de bacterias y (ii) con inoculación de cápsulas de ALG y ALG-Si sin BAL para ambos regímenes de inoculación.

Las fermentaciones tuvieron lugar en matraces Erlenmeyer de 100 ml en los cuales se introdujeron 50 ml de mosto estéril (esterilización por frío con una membrana de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ). A cada matraz se colocó una válvula Müller en la cual se introdujo un pequeño volumen de ácido sulfúrico concentrado, cuyo fin fue captar los compuestos volátiles distintos al  $\text{CO}_2$  liberados durante la fermentación. Todo el material fue previamente esterilizado mediante el uso de autoclave (121°C durante 20 minutos).

Tabla 1: Muestras para seguimiento de las fermentaciones.

INOCULACIÓN SECUENCIAL (Inocular BAL acabada la FA)				INOCULACIÓN SIMULTÁNEA (Inocular BAL al principio de la FA)				INOCULACIÓN SIMULTÁNEA (Inocular BAL al principio de la FA)			
Nº muestra	Tipo de Inoculo	°Brix	pH	Nº muestra	Tipo de Inoculo	°Brix	pH	Nº muestra	Tipo de Inoculo	°Brix	pH
1	ALG	20,8	3,0	31	ALG	20,8	3,0	61	ALG	20,8	3,0
2	ALG	20,8	3,0	32	ALG	20,8	3,0	62	ALG	20,8	3,0
3	ALG-Si	20,8	3,0	33	ALG-Si	20,8	3,0	63	ALG-Si	20,8	3,0
4	ALG-Si	20,8	3,0	34	ALG-Si	20,8	3,0	64	ALG-Si	20,8	3,0
5	BAL LIBRE	20,8	3,0	35	BAL LIBRE	20,8	3,0	65	BAL LIBRE	20,8	3,0
6	BAL LIBRE	20,8	3,0	36	BAL LIBRE	20,8	3,0	66	BAL LIBRE	20,8	3,0
7	ALG	20,8	3,8	37	ALG	20,8	3,8	67	ALG	20,8	3,8
8	ALG	20,8	3,8	38	ALG	20,8	3,8	68	ALG	20,8	3,8
9	ALG-Si	20,8	3,8	39	ALG-Si	20,8	3,8	69	ALG-Si	20,8	3,8
10	ALG-Si	20,8	3,8	40	ALG-Si	20,8	3,8	70	ALG-Si	20,8	3,8
11	BAL LIBRE	20,8	3,8	41	BAL LIBRE	20,8	3,8	71	BAL LIBRE	20,8	3,8
12	BAL LIBRE	20,8	3,8	42	BAL LIBRE	20,8	3,8	72	BAL LIBRE	20,8	3,8
13	ALG	25,3	3,0	43	ALG	25,3	3,0	73	ALG	25,3	3,0
14	ALG	25,3	3,0	44	ALG	25,3	3,0	74	ALG	25,3	3,0
15	ALG-Si	25,3	3,0	45	ALG-Si	25,3	3,0	75	ALG-Si	25,3	3,0
16	ALG-Si	25,3	3,0	46	ALG-Si	25,3	3,0	76	ALG-Si	25,3	3,0
17	BAL LIBRE	25,3	3,0	47	BAL LIBRE	25,3	3,0	77	BAL LIBRE	25,3	3,0
18	BAL LIBRE	25,3	3,0	48	BAL LIBRE	25,3	3,0	78	BAL LIBRE	25,3	3,0
19	ALG	25,3	3,8	49	ALG	25,3	3,8	79	ALG	25,3	3,8
20	ALG	25,3	3,8	50	ALG	25,3	3,8	80	ALG	25,3	3,8
21	ALG-Si	25,3	3,8	51	ALG-Si	25,3	3,8	81	ALG-Si	25,3	3,8
22	ALG-Si	25,3	3,8	52	ALG-Si	25,3	3,8	82	ALG-Si	25,3	3,8
23	BAL LIBRE	25,3	3,8	53	BAL LIBRE	25,3	3,8	83	BAL LIBRE	25,3	3,8
24	BAL LIBRE	25,3	3,8	54	BAL LIBRE	25,3	3,8	84	BAL LIBRE	25,3	3,8
Control (25)	ALG VACÍAS	20,8	3,8	Control (55)	ALG VACÍAS	20,8	3,8	Control (85)	ALG VACÍAS	20,8	3,8
Control (26)	ALG VACÍAS	20,8	3,8	Control (56)	ALG VACÍAS	20,8	3,8	Control (86)	ALG VACÍAS	20,8	3,8
Control (27)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8	Control (57)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8	Control (87)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8
Control (28)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8	Control (58)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8	Control (88)	ALG-Si VACIAS	20,8	3,8
Control (29)	SIN INÓCULO	20,8	3,8	Control (59)	SIN INÓCULO	20,8	3,8	Control (89)	SIN INÓCULO	20,8	3,8
Control (30)	SIN INÓCULO	20,8	3,8	Control (60)	SIN INÓCULO	20,8	3,8	Control (90)	SIN INÓCULO	20,8	3,8

## 4.2. Desarrollo y seguimiento de la FA

Tras preparar todos los matraces y las válvulas, se llevó a cabo la inoculación de las levaduras en el mosto estéril. Para ello se hidrataron levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae* (Lalvin Clos® YSEO®, Lallemand). La dosis de levadura adicionada en cada matraz fue de 0,015g siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

En el presente estudio, el seguimiento de la FA se llevó a cabo mediante diferencia de pesada. Gracias a la colocación de las válvulas Müller se pudo realizar el seguimiento de la pérdida de peso de los matraces durante la FA, debido al desprendimiento de CO<sub>2</sub> como producto de la fermentación. La FA se consideró finalizada cuando cesó la pérdida de peso (Suarez & Iñigo, 1990b).

Este seguimiento se llevó a cabo en las 30 muestras preparadas para la inoculación secuencial, muestras 1-30, y en las muestras 31-60 en el caso de la inoculación simultánea.

## 4.3. Desarrollo y seguimiento de la FML

Para el desarrollo de la FML se inocularon BAL liofilizadas del género *O.oeni* (Lalvin VP41 MBR®, Lallemand) en cada una de las muestras. Se seleccionó la cepa VP41 por ser altamente tolerante, la cual puede funcionar muy bien aún bajo condiciones difíciles de elaboración tales como alcohol elevado como también bajo pH (Lerm et al., 2010). La carga bacteriana, tanto en estado inmovilizado como libre, que se empleó fue de  $\sim 10^7$  UFC/ml de mosto/vino. Antes de su uso las BAL liofilizadas fueron rehidratadas siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez arrancada la FA, en las muestras sometidas a inoculación simultánea, muestras 31-90, se realizó la inoculación de las BAL a los 3 días en cada uno de los inóculos estudiados, para dar comienzo a la FML. En las muestras sometidas a inoculación secuencial, la adición de las BAL no se llevó a cabo hasta dar por terminada la FA. El seguimiento de la FML se realizó mediante la medida del consumo del ácido L-málico. Para ello, se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ l de cada uno de los matraces y se conservaron en un microtubo a -20°C hasta su medida.

#### 4.3.1. Inmovilización de las BAL

Las BAL se inmovilizaron en dos soportes diferentes: en un gel orgánico de ALG y en un gel mixto orgánico-inorgánico de ALG-Si. Los procedimientos seguidos para la inmovilización se describen a continuación:

- El procedimiento de inmovilización en el gel de ALG fue el siguiente. Las cápsulas de ALG se realizaron ajustando el pH de la disolución de alginato de sodio a 6,3 antes de añadir las BAL. Para la preparación de 10 ml de gel de ALG cargado con BAL se tomaron 0,2 g de alginato de sodio, 8 ml de agua destilada y 0,1 g de BAL rehidratadas. La suspensión se hizo gotear por gravedad mediante una jeringuilla estéril de 10 ml sobre unos 200 ml de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  0,2 M estéril. Se dejó en agitación a 260 rpm durante 2 h para que finalizase el proceso de gelificación. Se obtuvieron unas cápsulas de unos 3 mm y se lavaron con unos 100 ml de agua destilada, eliminando así las BAL que quedaron en la superficie. Todas estas operaciones se realizaron en condiciones estériles. La carga bacteriana de las cápsulas fue  $\sim 3 \cdot 10^9$  UFC/g de gel.
- Para la inmovilización de las BAL en soportes mixtos de ALG-Si se empleó un proceso de coacervación basado en la mezcla de los derivados de sílice con el ALG antes de la gelificación en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (Coradin et al., 2003). Se siguió el método propuesto por Trivedi et al. (2006) con modificaciones propuestas por Simó et al. (2017b), utilizando como derivados de sílice silicato de sodio y silicato coloidal, ya que se ha demostrado su capacidad para formar geles empleando una ruta acuosa (Coradin et al., 2003). Se preparó una mezcla de silicato coloidal (Ludox HS40, Sigma-Aldrich) y silicato de sodio y se ajustó el pH a 6,3. A esta mezcla se añadió alginato de sodio y las bacterias rehidratadas y se ajustó nuevamente el pH a 6,3. Esta mezcla final se hizo gotear por gravedad a través de una jeringuilla, siguiendo un proceso similar al descrito anteriormente. Para la preparación de 10 ml de gel de ALG-Si cargado con BAL se mezclaron 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. Bajo estas condiciones se obtuvo unas cápsulas con una carga bacteriana de  $\sim 3 \cdot 10^9$  UFC/g de gel.

#### 4.4. Control analítico

Finalmente, tras dar por finalizada la FML de las muestras, se realizó una analítica básica de cada una de ellas centrándonos en los siguientes parámetros:

##### a) **Azúcares reductores**

La determinación de los azúcares reductores se realizó siguiendo el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de glucosa (Miller, 1959). Se basa en una técnica colorimétrica centrada en cuantificar los azúcares reductores producidos durante la fermentación. Emplea ácido 3,5-dinitrosalicílico para la hidrólisis de azúcares presentes en una muestra, basándose en la reducción del DNS (color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de las absorbancias mediante un espectrofotómetro a 575nm. Como se trata de vinos tintos se deben decolorar previamente con carbón activo.

##### b) **Acidez volátil**

La determinación se basa en la separación por destilación directa y parcial del vino de una fracción del ácido acético contenido en él y posterior valoración con NaOH 0,01 N (García, 1990) (OIV-MA-AS313-02).

##### c) **pH**

La determinación del grado de acidez o alcalinidad de la dilución, se basa en la medida de la concentración en ion hidrógeno hidratado mediante una solución conductora de electricidad como un mosto o vino (OIV-MA-AS313-15).

##### d) **Ácido málico**

La determinación cuantitativa del ácido málico se realizó mediante un kit enzimático (Tecnología Difusión Ibérica, Barcelona, Ref.: 2402). 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).

##### e) **Índice Polifenoles Totales (IPT)**

Técnica analítica basada en la obtención del IPT por la medida de la absorbancia del vino a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de

onda (Zamora, 2003). Previamente las muestras fueron centrifugadas (5 min/4000 rpm), eliminando así las partículas en suspensión que podrían interferir en las medidas espectrofotométricas (OIV-OENO 574-2017).

#### f) **Color**

La determinación de las características cromáticas de las muestras se realizó siguiendo el método rápido. Las características cromáticas de un vino, se deducen de su espectro de absorción que presenta un mínimo a 420 nm y un máximo a 520 nm, estas medidas permiten definir su intensidad colorante y su tonalidad. Previamente las muestras fueron centrifugadas (5 min/4000 rpm), eliminando las partículas en suspensión que podrían interferir en las medidas espectrofotométricas (OIV-MA-AS2-07B).

### **4.5. Tratamiento estadístico de datos**

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

## **5. Resultados y discusión**

### **5.1. Seguimiento de la FA**

Para poder entender los resultados obtenidos en el seguimiento de la FA, comenzaremos explicando la diferencia que existe entre los vinos estudiados. Esta diferencia vendrá marcada en función de si la FA y la FML se realizaron de forma secuencial o simultánea. Partiremos de cuatro tipos de mosto, variando el pH y el °Brix, y a su vez cada tipo lo dividiremos en base al régimen de inoculación, secuencial o simultánea.

Para el seguimiento de la FA se llevó a cabo la medida de la concentración de CO<sub>2</sub> producido en las diferentes muestras, hasta observar una estabilización de la medida. El final de la FA se comprobó mediante un análisis de los azúcares reductores, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.

En la figura 2, se observa la producción de CO<sub>2</sub> frente a los días de duración de la FA, para la inoculación secuencial. Se puede apreciar como a partir del segundo día de fermentación comienzan a subir las producciones de CO<sub>2</sub>, coincidiendo con el principio de la fase tumultuosa de la FA, momento en que las levaduras tienen una actividad de transformación máxima (Hidalgo, 2011). Además, se observa como las muestras con menor °Brix (muestras A y B) han completado la FA a los 8 días, por el contrario a mayores concentraciones de azúcares el tiempo es superior, aproximadamente 10 días, como era de esperar. De igual forma, estas muestras con mayor cantidad de azúcares (25,3 °Brix) (muestras C y D) han sufrido un mayor desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

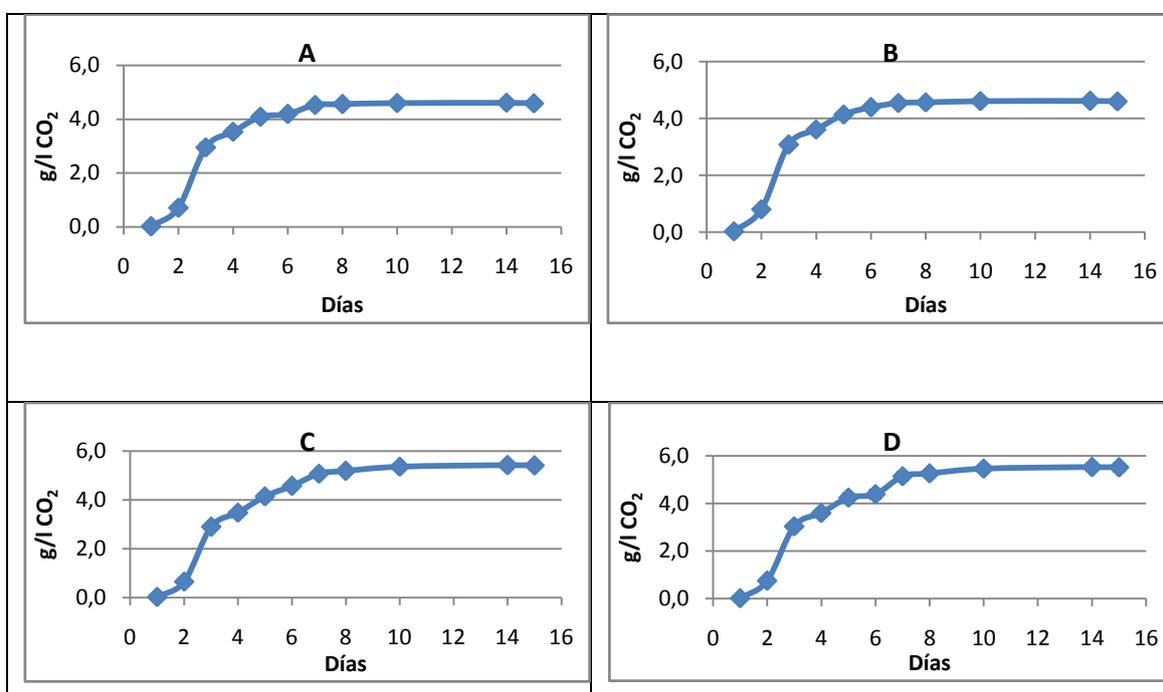


Figura 2: Producción de CO<sub>2</sub> durante la vinificación de los mostos A-D con inoculación secuencial de levaduras y bacterias(libre y encapsuladas en geles de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si)). A (20,8°Brix-pH 3,0), B (20,8°Brix-pH 3,8), C (25,3°Brix-pH 3,0), D (25,3°Brix-pH 3,8).

En la figura 3 se observa la producción de CO<sub>2</sub> frente a los días de duración de la FA, para el caso de la inoculación simultánea. En este caso, tres días después de la inoculación de las levaduras se realizó la inoculación de las BAL para los tres tipos de inóculos, BAL encapsuladas en ALG, BAL encapsuladas en ALG-Si y BAL libres, por lo que se presentan las tres series de datos para cada mosto. Se puede apreciar como al igual que en las inoculaciones secuenciales, las producciones de CO<sub>2</sub> son más significativas a partir del segundo día de la FA coincidiendo con el principio de la fase

tumultuosa. Las cinéticas de la FA con inoculación simultánea fueron similares a las encontradas con la inoculación secuencial. Podemos observar como las muestras han completado la FA a los 8-10 días. Se puede, por lo tanto afirmar que la coexistencia de levaduras con BAL libres o encapsuladas no afectó a la cinética fermentativa, hecho que ya fue observado por otros autores empleando bacterias libres (Krieger et al., 2006; Tristezza et al., 2016; Abrahamse & Bartowsky, 2012; Knoll et al., 2012).

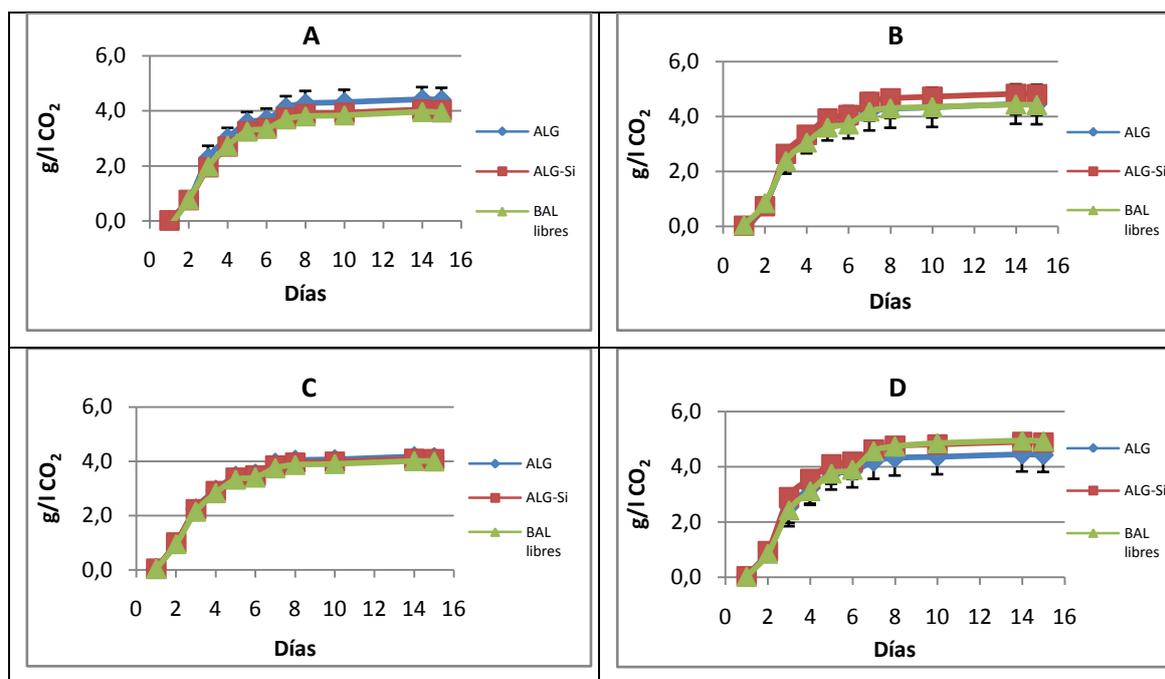


Figura 3: Producción de CO<sub>2</sub> durante la vinificación de los mostos A-D con inoculación simultánea de levaduras y bacterias (libre y encapsuladas en geles de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si)). A (20,8°Brix-pH 3,0), B (20,8°Brix-pH 3,8), C (25,3°Brix-pH 3,0), D(25,3°Brix-pH 3,8).

Sin embargo, varios estudios revelan que la capacidad de las BAL para inhibir la FA tiene un impacto adverso sobre la producción y la calidad del vino, por el agotamiento de ciertos nutrientes o factores de supervivencia requeridos por la levadura (Alexandre et al., 2004). La degradación de la pared celular de la levadura por la actividad extracelular de la  $\beta$ -1,3-glucanasa de las bacterias también se ha estudiado como otro factor que contribuye a la inhibición de la FA (Guilloux-Benatier et al., 2000). Por todo ello, se hace evidente que la selección de una combinación adecuada de levadura-bacteria juega un papel importante para una FA exitosa con el objetivo de evitar una competencia por nutrientes y la síntesis de metabolitos con posibles propiedades inhibitorias (Alexandre et al., 2004; Guzzon et al., 2013). Los resultados obtenidos, han corroborado que las cepas de levadura y bacterias utilizadas en este estudio fueron compatibles con una coinoculación simultánea.

## 5.2. Seguimiento de la FML

Para realizar el seguimiento de la FML de los mostos/vinos se evaluaron los niveles de ácido L-málico. En la figura 4 se observa la concentración de ácido L-málico frente a los días de duración de la FML, para la inoculación secuencial.

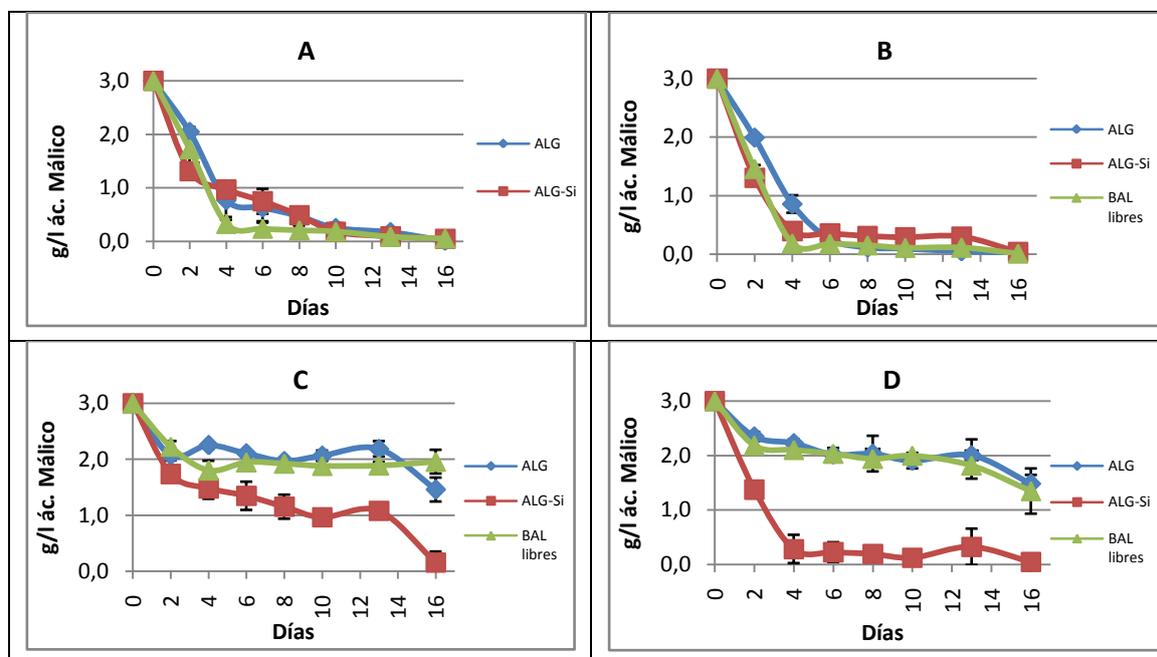


Figura 4: Consumo de ácido L-málico en los vinos inoculados con BAL libres y encapsuladas en geles de alginato de calcio (ALG) y alginato-silíce (ALG-Si) después de la FA (inoculación secuencial): A (20,8° Brix-pH 3,0), B (20,8° Brix-pH 3,8), C (25,3° Brix-pH 3,0), D (25,3° Brix-pH 3,8).

La cinética de la FML observada después de la FA (inoculación secuencial) depende en gran medida de la composición del mosto y del tipo de inóculo (libre o encapsulado). Las FML se pueden atribuir al inóculo de bacterias empleado ya que en los vinos control los niveles de ácido L-málico no cambiaron con respecto al valor inicial (datos no mostrados). Podemos observar que la cinética de la FML fue muy similar para los tres tipos de inóculos en los vinos procedentes de mostos con menor °Brix (muestras A y B) llegando en todos los casos a su finalización.

En el caso del vino procedente del mosto C, caracterizado por un alto contenido de azúcar y un pH bajo, se observó una reducción lenta de la concentración de ácido L-málico. Bajo estas condiciones estresantes, solo las bacterias encapsuladas en ALG-Si pudieron completar la FML, consumiéndose más del 95% de ácido L-málico presente en el vino después de 16 días de fermentación. Sin embargo, el ácido L-málico no se agotó completamente en los vinos inoculados con bacterias encapsuladas en ALG y libres, logrando bajas conversiones de ácido L-málico del 48%

y 35%, respectivamente, después de 16 días. Por el contrario, la disminución más rápida de ácido L-málico se evaluó durante la vinificación del mosto B, con bajo contenido de azúcar y pH alto. La cinética del consumo de ácido L-málico fue similar en los tres tratamientos de FML, logrando conversiones de ácido L-málico de 96-98% después de 8 días.

Además, el aumento del pH de 3,0 a 3,8 en el mosto con un alto contenido de azúcar (muestra D) solo mejoró significativamente la cinética de consumo de ácido L-málico inoculando bacterias encapsuladas en ALG-Si, elevando la conversión de ácido L-málico del 51% (muestra C) al 91% (muestra D) después de 4 días. Sin embargo, el aumento del pH del mosto no mejoró ni la cinética de la FML de las bacterias encapsuladas en ALG ni las bacterias libres. Por otro lado, la reducción del contenido de azúcar de 25,3 a 20,8 °Brix en el mosto con un pH bajo (muestra A) mejoró la velocidad de consumo de ácido L-málico utilizando bacterias encapsuladas y libres. Después de 4 días, las conversiones de ácido L-málico aumentaron del 25%, 51% y 40% (muestra C) al 41%, 68% y 90% (muestra A) usando bacterias encapsuladas en ALG y ALG-Si, y bacterias libres, respectivamente.

En la figura 5, se observa la concentración de ácido L-málico frente a los días de duración de la FML, para la inoculación simultánea de levaduras y bacterias (libres y encapsuladas).

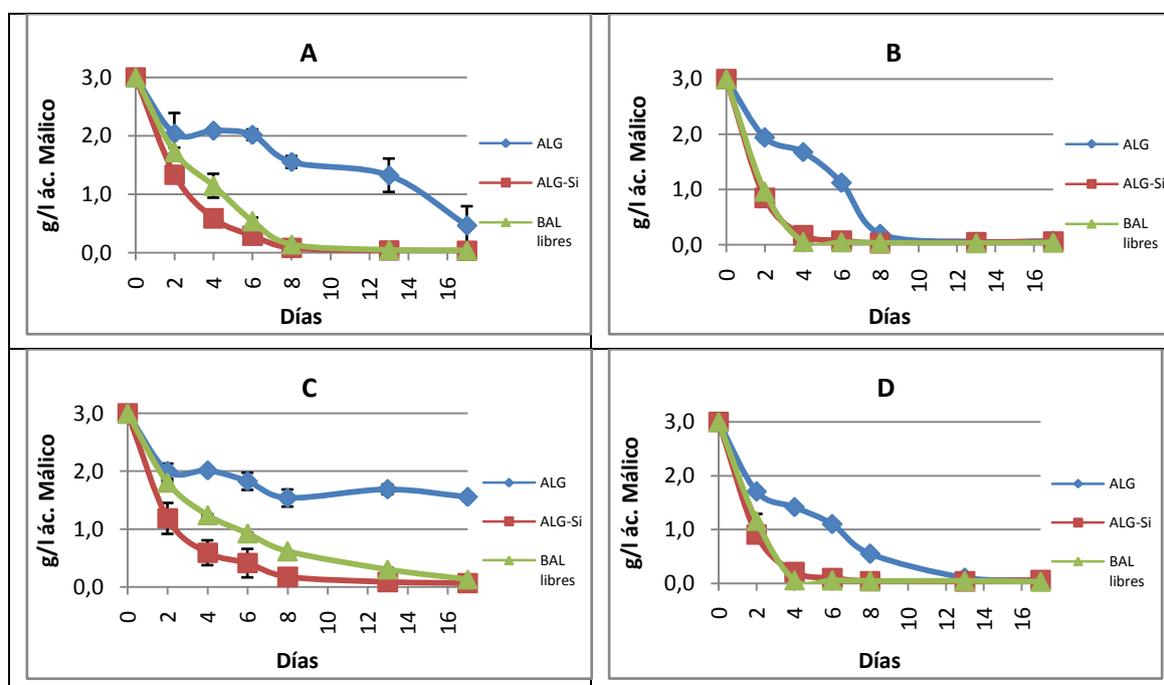


Figura 5: Consumo de ácido L-málico en los mostos/vinos inoculados con BAL libres y encapsuladas en geles de alginato de calcio (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si) al inicio de la FA (inoculación simultánea): A (20,8° Brix-pH 3,0), B (20,8° Brix-pH 3,8), C (25,3° Brix-pH 3,0), D (25,3° Brix-pH 3,8).

Podemos observar como los resultados obtenidos han sido muy diversos en función de la composición del mosto y del tipo de inóculo (BAL libres o encapsuladas). Si analizamos el tipo de inóculo utilizado, las BAL inmovilizadas en cápsulas de ALG-Si y en forma libre han finalizado la FML en todos los casos. Cabe destacar que al igual que en casos anteriores, *O. oeni* ha metabolizado más rápidamente el ácido L-málico a un pH menos extremo (pH 3,8, muestras B y D). Por el contrario, en el caso de las BAL inmovilizadas en cápsulas de ALG, la FML solo se ha completado a pH 3,8, no llegando a término para un pH más ácido. Además, podemos observar cómo pese a no finalizar la FML en las muestras con pH 3,0 (muestras A y C), las cápsulas de ALG funcionan mejor con grado alcohólico bajo (muestra A).

En el mosto C, donde las condiciones de vinificación son menos favorables, la inoculación simultánea mejoró notablemente el agotamiento de ácido L-málico del mosto inoculado con bacterias libres y ALG-Si. Las conversiones de ácido L-málico analizadas después de 8 días aumentaron del 61% y 36% (inoculación secuencial) a 94% y 79% (inoculación simultánea) con bacterias encapsuladas en ALG-Si y libres, respectivamente. La inoculación simultánea con bacterias libres y encapsuladas con ALG-Si dio como resultado un consumo completo de ácido L-málico en 17 y 13 días, respectivamente. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, cuando las bacterias encapsuladas en ALG-Si fueron inoculadas en régimen secuencial, requirieron hasta 16 días para completar el proceso de FML, mientras que las bacterias libres no pudieron completar con éxito la conversión de ácido L-málico (figura 4C). En las muestras A, B y D, la dinámica de la FML en el régimen simultáneo fue similar usando bacterias libres y encapsuladas con ALG-Si, donde el consumo completo del ácido L-málico requirió 8, 6 y 6 días respectivamente.

La inoculación simultánea ha supuesto un adelanto en la fecha de finalización de la FML, respecto al vino correspondiente elaborado de forma secuencial. Este acortamiento en la duración de la FML puede ser debido a que las bacterias pueden adaptarse mejor a la creciente concentración de etanol y crecer en un medio con una gran cantidad de nutrientes (Zhang *et al.*, 2006), sin desembocar necesariamente en la producción de excesivas cantidades de ácido acético (Beelman & Kunkee, 1985). Este acortamiento de tiempo se va a traducir en una serie de beneficios como son una rápida estabilización microbiológica, evitando el desarrollo de otros microorganismos alterantes en el vino (Krieger *et al.*, 2006). Por otro lado se encuentra la ventaja económica, ya que esta reducción de tiempo permite sacar al mercado vinos jóvenes en fechas más tempranas.

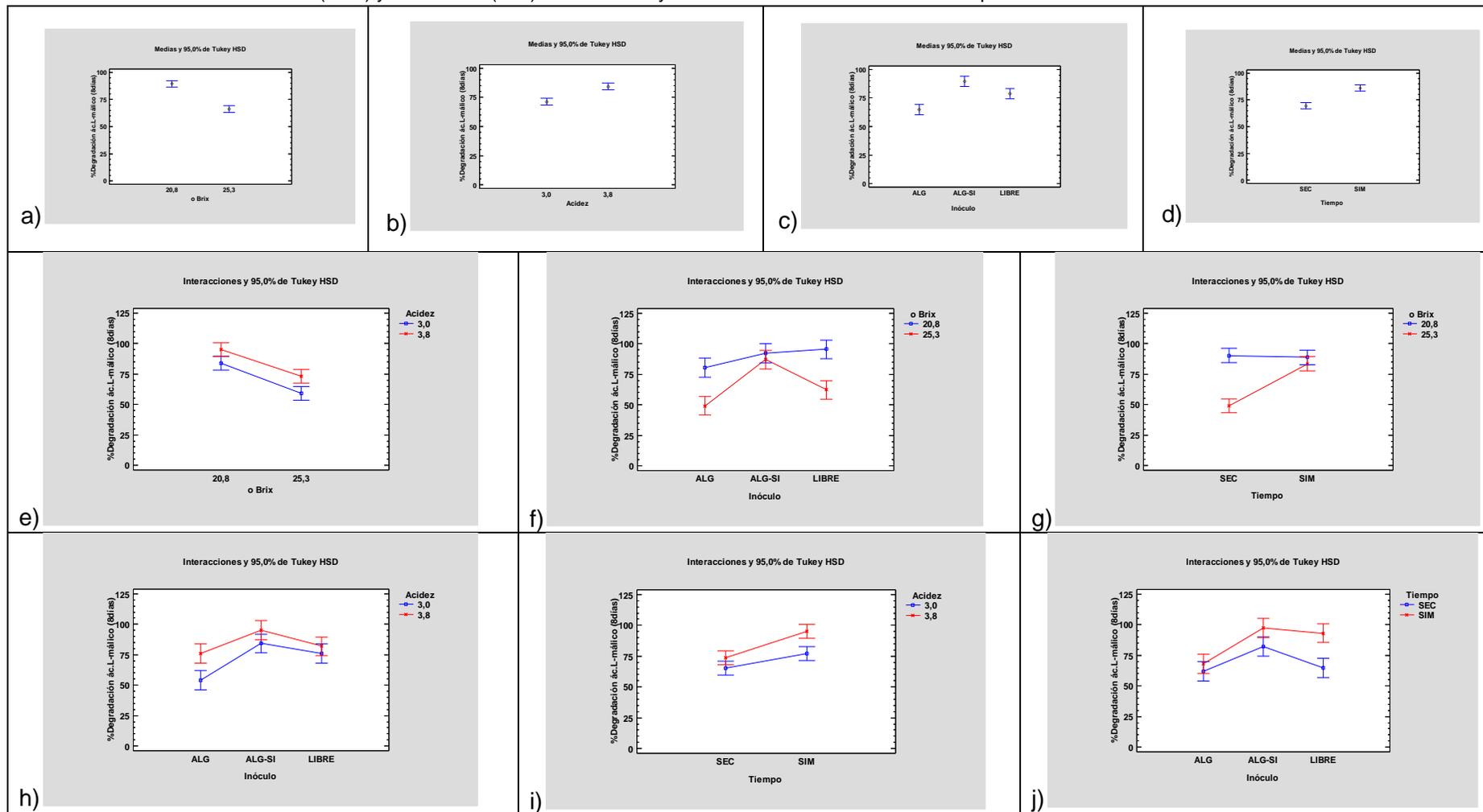
El efecto de la composición del mosto ( $^{\circ}$ Brix y pH), tipo de inóculo (bacterias encapsuladas o libres) y el momento de la inoculación (secuencial y simultánea) sobre la conversión de ácido L-málico se analizó a los 8 días después de la inoculación de las bacterias.

En la figura 6 se presenta el promedio del % de degradación de ácido L-málico en función del  $^{\circ}$ Brix (a), el pH (b), el tipo de inóculo (BAL libres o encapsuladas) (c) y el momento de la inoculación bacteriana (secuencial o simultánea) (d). Como puede verse en la tabla 2, existen diferencias estadísticamente significativas sobre el % de ácido L- málico a los 8 días, para los 4 factores principales presentados, con un 95,0% de nivel de confianza. Además los gráficos (e)-(j) de la figura 6 reflejan las interacciones entre los diferentes factores. Tan solo tres de las seis interacciones muestran un efecto estadísticamente significativo sobre el % de degradación de ácido L-málico con un 95,0% de nivel de confianza (tabla 2).

Tabla 2: Significancia estadística para cada uno de los factores y sus interacciones con 95,0% de nivel de confianza.

EFFECTOS PRINCIPALES	Valor-P
A: $^{\circ}$ Brix	0,0000
B:pH	0,0001
C:Tipo de inóculo	0,0000
D:Tiempo de inoculación	0,0000
INTERACCIONES	Valor-P
AB	0,6688
AC	0,0007
AD	0,0000
BC	0,0940
BD	0,1102
CD	0,0162

Figura 6: Promedio del % de degradación de ácido L- málico a los 8 días de inoculación con BAL libres y encapsuladas en geles de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si) usando una inoculación secuencia (SEC) y simultánea (SIM) de levaduras y bacterias en mostos de distinta composición.



El mayor promedio de conversión de ácido L-málico a los 8 días se logró en los vinos producidos con mostos con un bajo contenido de azúcar (conversión del 90%) en comparación con los vinos procedentes de mostos con un alto contenido de azúcar (conversión del 66%) (figura 6a). La vinificación de mostos con alto contenido de azúcar produce vinos con alto contenido alcohólico, lo que puede causar problemas con el desarrollo de la FML (Zapparoli et al., 2009). El etanol, es uno de los factores más importantes que afectan negativamente al metabolismo de las BAL (Lerm et al., 2010; Sumbly et al., 2014), causando la rotura de la estructura de la membrana celular y alteraciones de la fluidez de la membrana (Betteridge et al., 2015). Recientemente, el análisis transcriptómico y proteómico de *O. oeni* reveló que sus categorías funcionales más afectadas por el etanol son el transporte de metabolitos y la biogénesis de la pared celular y la membrana (Olguín et al., 2015).

Con respecto al pH del mosto (figura 6b), se observó una disminución de la conversión promedio de ácido L-málico del 84% al 71%, al reducirse el pH de 3,8 a 3,0. Según varios autores, el crecimiento de *O. oeni* y el desarrollo de la FML están influenciados negativamente por valores de pH inferiores a 3,5 (Betteridge et al., 2015; Rosi et al., 2003), mientras que se logra una mayor actividad maloláctica en vinos con pH alrededor de 3,5-4,0 (Bauer & Dicks, 2004). Recientes estudios han demostrado que las categorías funcionales de *O. oeni* más afectadas por el pH del vino son el transporte de membrana y el metabolismo de los aminoácidos y de los carbohidratos (Liu et al., 2017). Solieri et al. (2010), indicaron que valores bajos de pH de 3,0-3,2 son el factor principal que afecta a la FML, independientemente de la concentración de etanol (10-13%). En estudios realizados en vinos Riesling y Chardonnay se ha observado que la reducción del pH de 3,8 a 3,2 (vinos con un 9,8% de etanol), aumentó significativamente la duración de la FML hasta 34 días, mientras que a pH 3,2 y 11,8% de etanol se observó una FML parcial (Knoll et al. 2011).

El tipo de inóculo afectó significativamente a la conversión promedio de ácido L-málico (figura 6c), proporcionando los mejores resultados utilizando bacterias encapsuladas en ALG-Si (90%). Peores resultados se obtuvieron con las bacterias libres (79%) y encapsuladas en ALG (65%). En el mosto con alto contenido de azúcares, el rendimiento de las bacterias encapsuladas con ALG-Si fue superior (87%) al de las bacterias libres (62%). Sin embargo, ambos tipos de inóculo mostraron un rendimiento similar (93-95%) en el mosto bajo en azúcares (figura 6f).

La encapsulación de bacterias y levaduras en matrices porosas se ha aplicado como una herramienta para mejorar sus actividades catalíticas en la producción de bebidas alcohólicas (Kourkoutas et al., 2004). Un estudio reciente ha destacado que la encapsulación de *O. oeni* en biocompuestos de ALG-Si mejoró notablemente su actividad maloláctica en comparación con las bacterias encapsuladas en ALG y las libres (Simó et al., 2017b). La inclusión del material silíceo en las cápsulas de ALG aumentó la tolerancia de las bacterias en el ambiente estresante del vino (bajo pH, alto etanol y bajos nutrientes) y a bajas temperaturas de fermentación (Simó et al., 2017c). Rodríguez-Nogales et al. (2013) observaron un aumento significativo en la eficacia de la FML en vinos con un alto contenido en etanol inoculados con *O. oeni* encapsulada en un gel de polivinil alcohol. El éxito de la FML en vinos de alto contenido alcohólico inoculados con BAL encapsuladas podría atribuirse a varios factores. Por un lado, la matriz del hidrogel podría ofrecer protección contra las duras condiciones ambientales del vino, como el alcohol, el pH, los inhibidores, etc. (Kosseva, 2011; Kourkoutas et al., 2010). Además, se ha evidenciado un aumento en el nivel de los ácidos grasos saturados de la membrana celular de las bacterias encapsuladas en geles de ALG en respuesta al estrés con etanol, proporcionando una mejor tolerancia al alcohol de las células (Junter & Jouenne, 2004). Por otro lado, se ha indicado que el contacto célula-célula en matrices con una alta densidad celular mejoró la resistencia celular frente al etanol (Norton et al., 1995). Finalmente, también se ha observado una mayor protección de las células encapsuladas en geles de ALG debido a la existencia de polímeros de ALG no gelificados que ayudan a estabilizar la capa de hidratación de las BAL (Sun et al., 2007).

La inoculación simultánea tuvo una influencia positiva en la conversión promedio del ácido L-málico, aumentando este parámetro del 70% (régimen secuencial) al 86% (régimen simultáneo) (figura 6d). Estos resultados evidenciaron que la inoculación simultánea es el régimen de inoculación más eficiente, lo que confirma lo observado por otros autores (Abrahamse & Bartowsky, 2012; Antalick et al., 2013; Homich et al., 2016; Izquierdo-Cañas et al., 2014; Tristezza et al., 2016; Versari et al., 2016). Esta práctica mejoró notablemente el comportamiento de la FML en mostos con un alto contenido de azúcar, donde se logró una conversión málica media del 83% en comparación con el 49% obtenido por régimen secuencial. Sin embargo, este comportamiento no se observó en el mosto con un bajo contenido en azúcar donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa para el promedio de la conversión de ácido L-málico entre ambos regímenes de inoculación (figura 6g).

La inoculación simultánea dio como resultado una estrategia válida para permitir un período de adaptación bacteriana a la concentración gradual de etanol producida durante la FA (Zapparoli et al., 2009). Durante este período, *O. oeni* puede activar algunos mecanismos celulares para adaptarse a las condiciones desfavorables del vino, tales como la modificación de la composición de ácidos grasos de su membrana (Maitre et al., 2014), la síntesis de proteínas de estrés (Maitre et al., 2012) y la reubicación de proteínas citosólicas en la membrana (Olguín et al., 2015). Recientemente, Margalef-Català et al. (2016), observaron la importancia de la regulación de la traducción, la absorción de nitrógeno, la biosíntesis de la pared celular y los mecanismos de mantenimiento redox, como metabolismos clave involucrados en la protección de *O. oeni* al estrés del vino durante el período de adaptación antes del inicio de la FML. Se observaron diferencias en el rendimiento de las bacterias encapsuladas en ALG-Si y libres entre ambos regímenes de inoculación (figura 6j). Cuando se inocularon las bacterias después de la FA, se encontró la mayor conversión media de ácido L-málico inoculando bacterias encapsuladas en ALG-Si. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las bacterias libre y encapsuladas en ALG-Si en un régimen de inoculación simultáneo.

### 5.3. Análisis químico de los vinos

En la tabla 3 se presenta el promedio de la composición básica de los vinos después de la FML en función de la composición del mosto (°Brix y pH), tipo de inóculo y sistema de inoculación (inoculación secuencial o simultánea).

Tabla 3: Composición básica de los vinos inoculando con BAL libres y encapsuladas en geles de alginato (ALG) y alginato-sílice (ALG-Si) usando una inoculación simultánea y secuencia.

		Grado alcohólico (%)	Azúcares reductores (g/l)	Acidez volátil (g/l)	pH final	Índice de polifenoles totales	Intensidad de color	Tonalidad
°BRIX	20,8	11,79±0,07 <sup>a</sup>	3,12±1,2 <sup>a</sup>	0,20±0,05 <sup>a</sup>	3,41±0,27 <sup>a</sup>	19±0 <sup>a</sup>	3,68±0,33 <sup>a</sup>	0,79±0,10 <sup>a</sup>
	25,3	14,78±0,06 <sup>b</sup>	4,62±0,98 <sup>b</sup>	0,24±0,05 <sup>b</sup>	3,37±0,12 <sup>a</sup>	19±1 <sup>a</sup>	2,75±0,38 <sup>b</sup>	1,08±0,16 <sup>b</sup>
pH	3,0	13,25±1,56 <sup>a</sup>	4,43±1,57 <sup>a</sup>	0,23±0,06 <sup>a</sup>	3,12±0,12 <sup>a</sup>	19±1 <sup>a</sup>	3,20±0,72 <sup>a</sup>	0,97±0,25 <sup>a</sup>
	3,8	13,32±1,58 <sup>b</sup>	3,32±0,71 <sup>b</sup>	0,21±0,05 <sup>b</sup>	3,65±0,09 <sup>b</sup>	19±1 <sup>b</sup>	3,23±0,45 <sup>a</sup>	0,90±0,13 <sup>b</sup>
INÓCULO	ALG	13,26±1,59 <sup>a</sup>	3,74±1,3 <sup>a</sup>	0,21±0,07 <sup>a</sup>	3,32±0,30 <sup>a</sup>	19±1 <sup>a</sup>	3,14±0,62 <sup>a</sup>	0,91±0,16 <sup>a</sup>
	ALG-Si	13,29±1,63 <sup>a</sup>	4,21±1,57 <sup>a</sup>	0,22±0,05 <sup>a</sup>	3,38±0,31 <sup>b</sup>	19±1 <sup>b</sup>	3,36±0,60 <sup>a</sup>	0,87±0,15 <sup>a</sup>
	LIBRE	13,3±1,59 <sup>a</sup>	3,67±1,17 <sup>a</sup>	0,22±0,05 <sup>a</sup>	3,47±0,30 <sup>c</sup>	19±1 <sup>c</sup>	3,14±0,59 <sup>a</sup>	1,02±0,25 <sup>b</sup>
TIEMPO	SECUENCIAL	13,28±1,54 <sup>a</sup>	4,00±1,40 <sup>a</sup>	0,23±0,05 <sup>b</sup>	3,35±0,29 <sup>a</sup>	19±1 <sup>a</sup>	3,31±0,56 <sup>a</sup>	0,97±0,21 <sup>a</sup>
	SIMULTÁNEA	13,29±1,59 <sup>a</sup>	3,75±1,29 <sup>a</sup>	0,21±0,06 <sup>a</sup>	3,43±0,30 <sup>b</sup>	19±1 <sup>b</sup>	3,11±0,62 <sup>a</sup>	0,91±0,19 <sup>a</sup>

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el **grado alcohólico** de los vinos en función del °Brix y el pH del mosto, siendo los menores valores los correspondientes a los vinos elaborados con los mostos con 20,8 °Brix y pH 3,0. Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de inóculo o el régimen de inoculación.

Para los **azúcares reductores** también existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del grado alcohólico y el pH, siendo los menores valores los correspondientes a 20,8 °Brix y pH 3,8. Por el contrario, no se observó un efecto estadísticamente significativo en función del tipo de inóculo, o del tiempo en el que se realice la inoculación. Todos los vinos pueden considerarse "secos" debido a que sus niveles de azúcar se reducen a menos de 5 g/l.

Los niveles de **acidez volátil** observados no fueron de importancia tecnológica ni legal, ya que los umbrales sensoriales y los niveles legales máximos para el ácido acético oscilan alrededor de 1 g/l (Jussier et al., 2006). Para la acidez volátil si existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del °Brix, el pH y el momento de inoculación de las BAL, observándose los menores valores los correspondientes a 20,8 °Brix, pH 3,8 e inoculación simultánea. Por el contrario, el análisis de varianza mostró que no existe un efecto estadísticamente significativo en función del tipo de inoculación.

Por un lado, Zapparoli et al. (2009), observaron un aumento significativo de ácido acético proporcional al contenido de azúcar del mosto, probablemente causado por el metabolismo de la levadura. Esto puede explicarse por el hecho de que la levadura en condiciones de estrés produce niveles más altos de ácido acético (Erasmus et al., 2004). Por otra parte, Azzolini et al. (2010) no encontraron ninguna relación entre el ácido acético y el pH en los vinos elaborado por inoculación simultánea. Según nuestro estudio y otros estudios realizados previamente con BAL no inmovilizadas (Abrahamse & Bartowsky, 2012; Cañas et al., 2012; Homich et al., 2016; Knoll et al., 2011; Rosi et al., 2003; Tristezza et al, 2016; Versari et al., 2016), la inoculación simultánea no provocó un incremento de la acidez volátil (respecto a la inoculación secuencial) a pesar del metabolismo heterofermentativo de *O. oeni* capaz de consumir las hexosas del mosto y producir ácido acético. Nuestros resultados también son consistentes con los obtenidos en un estudio reciente con *S. cerevisiae* y *O. oeni* coinmovilizados en geles de alginato donde el régimen de inoculación (simultánea o secuencial) no afectó a la acidez volátil (Bleve et al., 2016).

Para el **pH final** únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del pH inicial del mosto, el tipo de inóculo y el momento de inoculación de las BAL, siendo los menores valores los correspondientes a pH 3,0, cápsulas de ALG-Si e inoculación simultánea. Estas diferencias no presentaron importancia tecnológica, a excepción de las encontradas en función del pH inicial del mosto. Jussier et al. (2006) no encontraron diferencias significativas con respecto a los valores finales del pH del vino entre inoculación secuencial y simultánea.

El contenido de **polifenoles**, la **tonalidad** de color y los valores de **intensidad** son factores importantes en la evaluación de la calidad del vino.

Para el índice de polifenoles totales si existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del pH, el tipo de inóculo y el momento de inoculación de las BAL, siendo los menores valores los correspondientes a pH 3,8, cápsulas de ALG-Si o ALG (pues no se muestran diferencias entre ambos tipos de inmovilización), y en los vinos elaborados por inoculación simultánea. Por el contrario, no se observó un efecto estadísticamente significativo en función del grado alcohólico de las muestras. Por otro lado, para la intensidad de color solo existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del °Brix, siendo los menores valores los correspondientes a 25,3 °Brix. Por el contrario, no se encontró un efecto estadísticamente significativo para el resto de los parámetros. Finalmente, para la tonalidad si existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras en función del °Brix, la acidez inicial y el tipo de inóculo, siendo los menores valores los correspondientes a los vinos procedentes de mostos con 20,8 °Brix y pH 3,8, y para las bacterias encapsuladas. Por el contrario, no se mostró un efecto estadísticamente significativo en función del tiempo en el que se realiza la inoculación de bacterias.

En general, las diferencias observadas en el índice de polifenoles totales y el color del vino debido a la composición del mosto de uva, el tipo de inóculo y el tiempo de inoculación fueron menores. Otros estudios no han encontrado cambios significativos en el índice de polifenoles totales, la intensidad de color y la tonalidad en vinos elaborados mediante inoculación secuencial y simultánea (Abrahamse & Bartowsky, 2012; Versari et al., 2016). A priori, el uso de BAL encapsuladas en hidrogeles para desarrollar la FML podría diluir los metabolitos y modificar el color del vino, ya que las cápsulas de ALG y ALG-Si son hidrogeles formados por agua (aproximadamente 96-99%) y tienden a deshidratarse en presencia de etanol (Simó et

al., 2017b). Además, se ha descrito que los geles ALG tienen cierta capacidad para adsorber polifenoles (Massalha et al., 2007). Sin embargo, en nuestro estudio no observamos diferencias notables en el IPT y en las características cromáticas del vino en función del tipo de inóculo. Resultados similares se han encontrado con un estudio llevado a cabo por Bleve et al. (2016) con *S. cerevisiae* y *O.oeni* coinmovilizados en geles de alginato.

## 6. Conclusión

Las principales conclusiones de este estudio se muestran a continuación:

- La cinética de la FA no se vio modificada por la inoculación simultánea de levaduras y bacterias (libres o encapsuladas).
- Las cinéticas de la FML con BAL encapsuladas en ALG-Si y libres fueron similares en los vinos de bajo GA independientemente del régimen de inoculación empleado (inoculación secuencial o simultánea)
- La inoculación secuencial de las BAL encapsuladas en ALG-Si permitió la finalización de la FML en vinos con un alto GA, mientras que con BAL libres y encapsuladas en ALG el desarrollo de la FML fue parcial.
- La inoculación simultánea de BAL encapsuladas en ALG-Si redujo notablemente la duración de la FML en las condiciones menos favorables de vinificación (alto GA y bajo pH). Además, con este régimen de inoculación las BAL libres pudieron completar la FML en los vinos de alto GA.
- El régimen de inoculación simultáneo no incrementó la acidez volátil de los vinos y no modificó sensiblemente los otros parámetros enológicos estudiados.

Para una aplicación industrial de las BAL encapsuladas en ALG-Si son necesarios más estudios que aborden otras cuestiones como su estabilidad operacional, su efecto sobre la composición volátil y las características organolépticas del vino bajo condiciones reales de vinificación.

## 7. Bibliografía

- Abrahamse, C. E., & Bartowsky, E. J. (2012). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: Influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 255–265.
- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: Current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 141-154.
- Antalick, G., Perello, M. C., & De Revel, G. (2013). Co-inoculation with yeast and LAB under winery conditions: Modification of the aromatic profile of Merlot wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(2), 223–232.
- Azzolini, M., Tosi, E., Vagnoli, P., Krieger, S., & Zapparoli, G. (2010). Evaluation of technological effects of yeast-bacterial co-inoculation in red table wine production. *Italian Journal of Food Science*, 22(3), 257–263.
- Bauer, R., & Dicks, L. M. T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 25(2), 74–88.
- Beelman, R.B., & Kunkee, R.E. (1985). Inducing simultaneous malolactic - alcoholic fermentations in red table wines. *Proceedings of the Australian Society of Viticulture and Oenology. Seminar on Malolactic Fermentation*. Urrbrae, South Australia: Australian Wine Research Institute, pp. 97–112.
- Betteridge, A., Grbin, P., & Jiranek, V. (2015). Improving *Oenococcus oeni* to overcome challenges of wine malolactic fermentation. *Trends in Biotechnology*, 33(9), 547–553.
- Bleve, G., Tufariello, M., Vetrano, C., Mita, G., & Grieco, F. (2016). Simultaneous alcoholic and malolactic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* cells co-immobilized in alginate beads. *Frontiers in Microbiology*, 7, 943.
- Blouin, J., & Peynaud, E. (2004). *Enología práctica. Conocimientos y elaboración del vino*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Cañas, P. M. I., Pérez-Martín, F., Romero, E. G., Prieto, S. S., & Herreros, M. de los L. P. (2012). Influence of inoculation time of an autochthonous selected malolactic bacterium on volatile and sensory profile of Tempranillo and Merlot wines. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 245–254.
- Chaplin, M. F. (1986). *Monosaccharides. Carbohydrate analysis*. Ed. IRL Press, Oxford, Reino Unido, pp. 2–36.
- Coradin, T., Mercey, E., Lisnard L. & Livage, J. (2001). Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation. *Chemical communications*, 0, 2496–2497.

- Coradin, T., Nassif, N., & Livage, J. (2003). Silica-alginate composites for microencapsulation. *Applied microbiology and biotechnology*, 61(5-6), 429–434.
- Coradin, T., Allouche, J., Boissière M. & Livage, J. (2006). Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology. *Current Nanoscience*, 2, 1-11.
- Erasmus, D. J., Cliff, M., & Van Vuuren, H. J. J. (2004). Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(4), 371–378.
- Formisyn, P., Vaillant, H., Laintreibeccq, F. & Bourgois, J. (1997). Development of an enzymatic reactor for initiating malolactic fermentation in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 345-351.
- Gao, C., & Fleet, G.H. (1994). The degradation of malic acid by high density cell suspensions of *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Microbiology*, 76, 632–637.
- García, B. J. (1990). Técnicas analíticas para vinos. Ed. GAB, Barcelona, España, pp. 20-21.
- Gilis, J. F., Delia-Dupuy, M. L., & Strehaiano, P. (1996). Etude qualitative et quantitative des interactions entre *Saccharomyces cerevisiae* et *Leuconostoc oenos*. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 3, 151–157.
- Guilloux-Benatier, M., Pageault, O., Man, A., & Feuillat, M. (2000). Lysis of yeast cells by *Oenococcus oeni* enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 193–197.
- Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S. & Cavazza, A. (2011). Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. *Annals of Microbiology*, 62(1), 381–390.
- Guzzon, R., Villega, T. R., Pedron, M., Malacarne, M., Nicolini, G., & Larcher, R. (2013). Simultaneous yeast-bacteria inoculum. A feasible solution for the management of oenological fermentation in red must with low nitrogen content. *Annals of Microbiology*, 63(2), 805–808.
- Hidalgo Togores, J. (2011). Tratado de Enología. Ed. Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.
- Homich, L. J., Scheinberg, J. A., Elias, R. J., & Gardner, D. M. (2016). Effects of co-inoculation on wine-quality attributes of the high-acid, red hybrid variety chambourcin. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(2), 245–250.
- Izquierdo-Cañas, P. M., Romero, E. G., Pérez-Martín, F., Seseña, S., & Palop, M. L. (2014). Sequential inoculation versus co-inoculation in Cabernet Franc wine fermentation. *Food Science and Technology*, 21(3), 203-212.

- Junter, G.A., & Jouenne, T. (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome... or the cart before the horse. *Biotechnology Advances*, 22(8), 633–658.
- Jussier, D., Morneau, A. D., & De Orduña, R. M. (2006). Effect of simultaneous inoculation with yeast and bacteria on fermentation kinetics and key wine parameters of cool-climate Chardonnay. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 221–227.
- King, S.W., & Beelman, R.B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 53–60.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Rauhut, D., & Du Toit, M. (2011). Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2077–2086.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M., & Rauhut, D. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1143–1153.
- Kosseva, M. R. (2011). Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 1089–1118 .
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., & Koutinas, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, 21 (4), 377-397.
- Kourkoutas, Y., Manojlović, V., & Nedović, V. A. (2010). Immobilization of microbial cells for alcoholic and malolactic fermentation of wine and cider. En *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, pp. 327–343.
- Krieger, S., Suárez, C., Heras, J.N., & Palacios, A. (2006). Fermentación maloláctica, más allá de la conversión de málico en láctico. *Viticultura y Enología Profesional*, 102, 5-14.
- Kurayama, F., Suzuki, S., Bahadur, N., Furusawa, T., Ota, H., Sato, M., & Suzuki, N. (2012). Preparation of aminosilane–alginate hybrid microcapsules and their use for enzyme encapsulation. *Journal of Materials Chemistry*, 22(30), 15405-15411.
- Lasik, M. (2013). The application of malolactic fermentation process to create good-quality grape wine produced in cool-climate countries: a review. *European Food Research and Technology*, 237(6), 843–850.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., & du Toit, M. (2010). Malolactic fermentation: The ABC's of MLF. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 186–212.

- Liu, L., Zhao, H., Peng, S., Wang, T., Su, J., Liang, Y., & Wang, H. (2017). Transcriptomic analysis of *Oenococcus oeni* SD-2a response to acid shock by RNA-Seq. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1586.
- Lupo B., González C. & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3 (1), 130-151.
- Maicas, S., Gil, J.V., Pardo, I., & Ferrer, S. (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Research International Journal*, 32, 491-496.
- Maitre, M., Weidmann, S., Rieu, A., Fenel, D., Schoehn, G., Ebel, C., & Guzzo, J. (2012). The oligomer plasticity of the small heat-shock protein Lo18 from *Oenococcus oeni* influences its role in both membrane stabilization and protein protection. *The Biochemical Journal*, 444(1), 97–104.
- Maitre, M., Weidmann, S., Dubois-Brissonnet, F., David, V., Covés, J., & Guzzoa, J. (2014). Adaptation of the wine bacterium *Oenococcus oeni* to ethanol stress: Role of the small heat shock protein lo18 in membrane integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(10), 2973–2980.
- Margalef-Català, M., Araque, I., Bordons, A., Reguant, C., & Bautista-Gallego, J. (2016). Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* adaptation to wine stress conditions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1554.
- Massalha, N., Basheer, S., & Sabbah, I. (2007). Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 46, 6820–6824.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Norton, S., Watson, K., & D'Amore, T. (1995). Ethanol tolerance of immobilized brewers' yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), 18–24.
- OIV-MA-AS313-02: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos (1), (2018). Método determinación acidez volátil.
- OIV-MA-AS313-15: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos (1), (2018). Método determinación pH.
- OIV-OENO 574-2017: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Resolución de la revisión del método de determinación de los polifenoles.
- OIV-MA-AS2-07B: Organización Internacional de la Viña y del Vino. Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos (1), (2018). Método determinación características cromáticas.

- Olguín, N., Champomier-Vergès, M., Anglade, P., Baraige, F., Cordero-Otero, R., Bordons, A., & Reguant, C. (2015). Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock. *Food Microbiology*, 51, 87–95.
- Ramos, A. I. (2013). Generación de microportadores basados en mezclas de alginato de sodio y fibrinógeno. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá, Colombia.
- Reguant, C., Rozès, I., Olguín, N., Bordas, M., & Bordons, A. (2010). Nuevos retos para *Oenococcus oeni* como consecuencia del cambio climático. *Acenología*. [http://www.acenologia.com:80/cienciaytecnologia/oenococcus\\_cambio\\_c](http://www.acenologia.com:80/cienciaytecnologia/oenococcus_cambio_c) (consultado el 24 de septiembre de 2017)
- Rodríguez-Nogales, J. M., Vila-Crespo, J., & Fernández-Fernández, E. (2013). Immobilization of *Oenococcus oeni* in lentikats® to develop malolactic fermentation in wines. *Biotechnology Progress*, 29(1), 60–65.
- Rosi, I., Fia, G., & Canuti, V. (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(3), 194–199.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017a). Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 170, 1-14.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017b). Highly efficient malolactic fermentation of red wine using encapsulated bacteria in a robust biocomposite of silica-alginate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (25), 5188-5197.
- Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017c). Silica-alginate encapsulated bacteria to enhance malolactic fermentation performance in a stressful environment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23, 342–349.
- Solieri, L., Genova, F., De Paola, M., & Giudici, P. (2010). Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 285–298.
- Suarez, J.A., & Iñigo, B. (1990b). Las levaduras vínicas y el proceso fermentativo. *Microbiología Enológica. Fundamentos de la vinificación*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, España, pp. 57-286.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8111-8132.

- Sun, Z. J., Lv, G. J., Li, S. Y., Yu, W. T., Wang, W., Xie, Y. B., & Ma, X. (2007). Differential role of microenvironment in microencapsulation for improved cell tolerance to stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(6), 1419–1427.
- Tristezza, M., di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G., & Grieco, F. (2016). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 406–412.
- Trivedi, U. J., Bassi, A. S. & Zhu J. (2006). Investigation of phenol removal using sol-gel/alginate immobilized soybean seed hull peroxidase. *Canadian Journal Chemistry Engineering*, 84, 239–247.
- Versari, A., Patrizi, C., Parpinello, G. P., Mattioli, A. U., Pasini, L., Meglioli, M., & Longhini, G. (2016). Effect of co-inoculation with yeast and bacteria on chemical and sensory characteristics of commercial Cabernet Franc red wine from Switzerland. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91(4), 876–882.
- Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández E., & Hernández-Moral, M.C. (2006). Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. Editorial Formatex, Badajoz, España.
- Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C. R., Fleet, G. H., & Lee, T. H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 302–313.
- Wibowo, D., Fleet, G.H., Lee, T.H. & Eschenbruch, R.E. (1988). Factors affecting the induction of malolactic fermentation in red wines with *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, 64,421-428.
- Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. AMV Ediciones, Madrid, España.
- Zapparoli, G., Tosi, E., Azzolini, M., Vagnoli, P., & Krieger, S. (2009). Bacterial inoculation strategies for the achievement of malolactic fermentation in high-alcohol wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 30(1), 49–55.
- Zhang, J., Smith, K.M., Tackaberry, T., Sun, X., Carpenter, P., Slugoski, M.D., Robins, M.J., Nielsen, L.P., Nowak, I., Baldwin, S.A., Young, J.D., & Cass, C.E. (2006). Characterization of the transport mechanism and permeant binding profile of the uridine permease Fui1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(38), 28210-21.