



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

Estudio de la estabilidad de bacterias lácticas encapsuladas en geles de sílice-alginato para desarrollar la fermentación maloláctica en vinos tintos.

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2016/2017

Alumno: Diego Madrigal del Burgo

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor: Guillermo Simó Hernando

Septiembre de 2017

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

Tabla de contenido

1.	Resumen.....	2
1.	Summary.....	2
2.	Introducción	3
3.	Objetivos del proyecto.....	7
4.	Materiales y métodos	7
4.1.	Preparación de las muestras de vino	7
4.2.	Inmovilización de BAL en geles de alginato de calcio y sílice-alginato.....	9
4.3.	Desarrollo de la FML.....	9
4.4.	Estabilidad de la matriz de inmovilización	10
4.5.	Estabilidad operacional.....	11
4.6.	Tratamiento estadístico de los datos.....	11
5.	Resultados y discusión.....	11
5.1.	Estabilidad química del soporte durante el desarrollo de la FML	11
5.1.1.	Evolución del peso de las cápsulas.....	12
5.1.2.	Evolución del diámetro de las capsulas durante el desarrollo de la FML ...	15
5.1.3.	Evolución de la concentración de polisacáridos totales en vino durante el desarrollo de la FML.....	18
5.2.	Estabilidad operacional del soporte	20
6.	Conclusiones.....	26
7.	Bibliografía	27

1. Resumen

En el presente trabajo se analiza la estabilidad química de las cápsulas de alginato y alginato-sílice con bacterias lácticas inmovilizadas en vinos con distinto pH y grado alcohólico, evaluando la modificación de su peso y volumen, y la pérdida de alginato durante el desarrollo de la FML. Además, se estudia la estabilidad operacional de *O. oeni* inmovilizada en las cápsulas de alginato-sílice realizando cinco FML consecutivas en vinos con distinto pH y grado alcohólico, y evaluando su capacidad fermentativa. Los resultados alcanzados muestran que la inclusión de derivados de sílice incrementó la estabilidad química de las cápsulas de alginato en vinos con condiciones extremas de pH y grado alcohólico. Además, la bacteria *O. oeni* encapsulada en geles de alginato-sílice fue capaz de realizar la FML durante cinco ciclos consecutivos en vinos con alto grado alcohólico y bajo pH, mientras que su contrapartida soluble no fue capaz.

1. Summary

In the present work the chemical stability of the alginate and alginate-silica capsules with lactic acid bacteria immobilized in wines with different pH and alcoholic level is analyzed, evaluating the modification of their weight and volume, and the loss of alginate during the development of the FML. In addition, the operational stability of *O. oeni* immobilized in the alginate-silica capsules is studied by performing five consecutive MLFs in wines with different pH and alcohol content, and evaluating their fermentative capacity. The results show that the inclusion of silica derivatives increased the chemical stability of alginate capsules in wines with extreme pH and alcoholic conditions. In addition, the *O. oeni* bacterium encapsulated in alginate-silica gels was able to perform MLF for five consecutive cycles in wines with high alcohol and low pH, while their soluble counterpart was not able.

2. Introducción

El mayor uso de combustibles fósiles y los cambios en el uso del suelo son los principales factores que están contribuyendo a la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera, como dióxido de carbono, metano y dióxido de nitrógeno. El aumento de estos gases ha aumentado la capacidad atmosférica para la retención de la radiación infrarroja procedente de la superficie terrestre, produciéndose un incremento de la temperatura a nivel mundial. Debido a ello, el cambio climático está provocando cambios en la temperatura media anual y fluctuaciones en el calendario de lluvias (Vila-Crespo et al., 2006).

Estos cambios afectan a la viticultura, principalmente al crecimiento de las plantas y al desequilibrio de la madurez de la uva, ya que la variabilidad climática marca importantes diferencias en la calidad de los mostos al comparar las cosechas de otros años. Para poder obtener la óptima madurez en aromas y polifenoles en los mostos, los enólogos deben retrasar la vendimia, lo que conlleva trabajar con uvas de alto contenido de azúcar y alto pH, dando vinos bastante alcohólicos y poco ácidos (Vila-Crespo et al., 2006).

Estos cambios en la uva provocados por el cambio en el clima, afectan directamente a las etapas posteriores a fermentación del mosto, para transformarse en vino. Durante la fermentación alcohólica (FA) la levadura *Saccharomyces cerevisiae* transforma los azúcares del mosto en etanol y CO₂ durante el proceso. La mayoría de los vinos tintos y algunos blancos y rosados, realizan una segunda fermentación (fermentación maloláctica, FML), que le va a otorgar al vino una mayor calidad y una diversidad de aromas que no se obtienen con la primera fermentación.

La FML es un proceso complejo que se lleva a cabo en el vino debido principalmente a tres razones: (1) para provocar una desacidificación del vino que conlleva un aumento del pH, (2) para contribuir a la estabilidad microbiana mediante el empobrecimiento de nutrientes en el medio y a la presencia de inhibidores microbianos formados por las BAL y (3) para mejorar el perfil aromático del vino (Davis et al., 1988, Kunkee, 1991, Maicas et al., 1999, Liu, 2002, Ugliano et al., 2003).

La principal reacción de la FML se define como la conversión del ácido L-málico, un ácido dicarboxílico, en ácido L-láctico, un ácido monocarboxílico, con la producción de CO₂. La reacción es catalizada por bacterias lácticas (LAB), incluyendo los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Wibowo et al., 1985). De estos géneros, la bacteria *Oenococcus oeni* es la que mejor se adapta a los ambientes

desfavorables del vino, como pueden ser condiciones de alto contenido de etanol, pH bajo y presencia de dióxido de azufre (SO₂) (Wibowo et al., 1985, Davis et al., 1988, Drici-Cachon et al. 1996, LonvaudFunel, 1999).

La FML es un proceso delicado y difícil de controlar, que tradicionalmente tiene lugar de forma espontánea en los vinos. Esto se debe a que el desarrollo de las BAL en el vino es lento y complicado, porque el vino no es un buen sustrato para el crecimiento y metabolismo de estas bacterias. Además la evolución de las BAL en el vino no es predecible, lo que ha incitado el uso de cultivos iniciadores malolácticos, los cuales son bastante útiles en la elaboración de vino.

El uso de cultivos iniciadores para inducir la FML mediante el uso de bacterias malolácticas seleccionadas, principalmente *O. oeni* y *Lactobacillus sp.*, puede en algunos casos asegurar una fermentación más rápida, reducir el posible deterioro por otra microbiota alterante y controlar y seleccionar la cepa o las cepas responsables de la FML. Para la selección de dichos cultivos iniciadores hay que tener en cuenta ciertos parámetros que afectan a (1) la actividad bacteriana: como son el etanol, el pH, la temperatura de fermentación o el dióxido de azufre y (2) otros que afectan a la calidad sensorial y a la seguridad alimentaria del vino (producción de aminas biógenas y carbamato de etilo) (Torriani et al., 2011). Sin embargo, el aumento del grado alcohólico del vino debido al cambio climático provoca que las BAL tengan aún mayores dificultades para crecer y desarrollar la FML (Lerm et al., 2010), con lo que los cultivos iniciadores no son totalmente eficaces. Por estos motivos es necesario buscar otras alternativas para mejorar las condiciones de desarrollo de *O. oeni* bajo las actuales condiciones de vinificación.

El efecto inhibitorio del etanol es tan importante que algunos autores han centrado sus estudios en este aspecto para lograr una buena FML. Una propuesta es la coinoculación de levaduras con bacterias seleccionadas antes de la FA (Tritezza et al., 2016, Versari et al., 2016). De esta manera las bacterias pueden aclimatarse a la creciente concentración de etanol generada durante la FA en presencia de una gran cantidad de nutrientes y sin que exista una producción excesiva de ácido acético. Algunos investigadores aconsejan una inoculación de las BAL antes de la terminación total de la FA, ya que existe una menor cantidad de SO₂ libre y una gran cantidad de compuestos carbónicos procedentes de la fase de crecimiento de las levaduras. Si bien bajo estas condiciones es posible la existencia de un efecto inhibitorio de dicho metabolitos sobre el crecimiento de las BAL (Alexandre et al., 2004).

Otra alternativa a la fermentación con BAL nativas o seleccionadas son las técnicas de inmovilización celular. La inmovilización celular se definió como "el confinamiento físico o la localización de células intactas en una cierta región del espacio con la preservación de alguna actividad catalítica deseada" (Karel et al, 1985). Se ha demostrado que la inmovilización de células, es decir, cualquier técnica que limita las migraciones libres de células, es favorable para aumentar las tasas de fermentación de los alimentos (Scott, 1987).

Teniendo en cuenta la relación entre las bacterias y el soporte, las técnicas de inmovilización celular se han clasificado en diferentes categorías: (1) inmovilización en la superficie de un soporte sólido por adsorción física debido a fuerzas electrostáticas o por unión covalente entre la membrana celular y el soporte; (2) atrapamiento en una matriz porosa; (3) autoagregación por floculación o con agentes reticulantes, y (4) contención celular con ayuda de membranas (microencapsulación y contención entre membranas microporosas)

Estas técnicas de inmovilización son muy útiles y tienen una serie de ventajas para el desarrollo de FML, a destacar las siguientes (Simó et al., 2017a, 2017b, Vila-Crespo et al., 2006):

- Incrementa la estabilidad y la actividad de las BAL frente a las estresantes condiciones del vino (alta concentración de etanol, bajo pH y bajos nutrientes)
- Permite el manejo de la FML con BAL seleccionadas.
- Permite el empleo de altas densidades celulares lo que incrementa la productividad de la FML y reduce el riesgo de contaminación microbiana en el vino al acelerarse el inicio de la FML.
- Posibilita el diseño de sistemas de FML en continuo.
- Reduce el coste de recuperación y reutilización de las bacterias inmovilizadas.

Sin embargo, esta alternativa puede presentar algunas desventajas como son las siguientes:

- Existencia de problemas de difusión (debidos al soporte de inmovilización) de los sustratos y productos entre las bacterias encapsuladas y el vino, que disminuyan la actividad metabólica de las BAL.
- Pérdida parcial o total de la actividad biocatalítica durante el proceso de inmovilización.

- Parcial o total liberación de las BAL inmovilizadas al vino por una ruptura o degradación del soporte de inmovilización.
- Posible contaminación microbiana por reutilización de las BAL inmovilizadas en distintos lotes y en sistemas en continuo.

Se han probado diferentes materiales como soporte de inmovilización celular para el desarrollo de la FML, como poliacrilamida, k-carragenano, pectato de calcio, quitosano, esponja de celulosa, alginato cálcico, virutas de roble y material celulósico deslignificado. En relación con las técnicas de inmovilización aplicadas a la inducción de la FML en el vino, se han probado dos de las principales categorías de inmovilización (atrapamiento e inmovilización en la superficie de un portador sólido) (Simo et al., 2017b).

El atrapamiento en geles de alginato es el método de inmovilización más empleado para las BAL, debido a que es un método sencillo, barato y no tóxico para las bacterias (Stolarsewicz et al., 2011). Sin embargo, se ha descrito que los geles de alginato de calcio son sensibles a algunas moléculas quelantes comúnmente existentes en los alimentos, tales como citratos, fosfatos y lactatos y otros cationes antigelificantes como Na^+ y Mg^{2+} , reduciendo su estabilidad química (Melvik et al., 2004).

Una alternativa para mejorar la estabilidad del gel de alginato de calcio es el diseño de biocomposites de sílice-alginato (Coradin et al., 2003, Callone et al., 2008, Bruyamt et al., 2008). El proceso sol-gel permite diseñar biocompuestos alginato-sílice, que tienen las ventajas de los polímeros orgánicos (biocompatibilidad, flexibilidad y elasticidad) y de los inorgánicos (dureza y estabilidad química y térmica). Con este proceso se forma una red covalente de sílice que se obtiene por policondensación de silanoles y siloxanos (Coradin et al., 2003).

Existen tres tipos de interacciones en los compuestos de sílice-alginato preparado a través del proceso sol-gel: (1) reticulación covalente por policondensación de los precursores de sílice, (2) reticulación iónica por reacción de complejación entre los grupos carboxilo de alginato y los cationes divalentes, (3) e interacción intermolecular de los grupos silanos con el alginato por enlaces de puente de hidrógeno (Liu et al., 2013, Coradin et al., 2003).

Recientemente, se ha informado que la bacteria *O. oeni* encapsulada en un biocomposite de sílice-alginato realiza con éxito la FML en el vino (Simo et al., 2017a). Este estudio explora un nuevo enfoque para la inmovilización de *O. oeni* en

biocomposites de sílice-alginato usando rutas acuosas basadas en redes poliméricas de sílice y alginato de calcio. Hasta ahora no se había trabajado con estas estrategias para la inmovilización de BAL en cápsulas de sílice-alginato y su implementación en la FML.

La inclusión de sílice en el gel de alginato mejoró el comportamiento fermentativo de *O. oeni* encapsulado, la robustez mecánica, la capacidad de retención de bacterias y la estabilidad de las cápsulas a diferentes valores de pH y concentraciones de etanol en soluciones acuosas y en vino tinto. Posteriormente se comprobó la mayor capacidad fermentativa de *O. oeni* encapsulada en dichos biocomposites (en comparación con su contrapartida no inmovilizada) bajo extremas condiciones de vinificación a altas concentraciones de etanol (13-16%), bajo pH (3,0-3,3) y bajas temperaturas de fermentación (13-15°C) (Simó et al., 2017b).

3. Objetivos del proyecto

1. Estudiar la estabilidad química de los biocomposites de sílice-alginato en vinos con distintas condiciones de pH y grado alcohólico.
2. Conocer la estabilidad operacional de *O. oeni* encapsulada en biocomposites de sílice-alginato.

4. Materiales y métodos

4.1. Preparación de las muestras de vino

El vino de partida que se usó para la realización de los ensayos, fue un vino tinto congelado de la variedad Tinta de Toro. Este vino no realizó la FML, su grado alcohólico (GA) fue de 13,55% vol., pH de 3,55 y una concentración de 1,8 g/L de ácido L-málico. Para la realización del ensayo se ajustó la concentración de ácido L-málico a 3 g/L para facilitar la observación de la degradación del ácido. Además se añadieron nutrientes para las BAL, levaduras inactivas (ACTI-ML, Lallemand) a una dosis de 20 g/hL. Estas levaduras inactivas proporcionan importantes factores de crecimiento a las bacterias (especialmente aminoácidos, péptidos, vitaminas y elementos esenciales). Posteriormente, a partir de este vino base se obtuvieron seis vinos distintos (V1-V6) modificando su pH y GA (Ver Tabla 1).

Para modificar el GA, se llevó a cabo una destilación del vino con un rotavapor, para reducir su contenido en alcohol hasta el 12% vol. El ajuste del pH de los vinos se realizó con ácido clorhídrico al 5% o NaOH 1M.

Tabla 1. Tipo de inóculo empleado para el desarrollo de la FML (BAL encapsuladas en alginato o alginato-sílice y BAL en estado libre) en vinos de distintas características de pH y GA (V1-V6).

Vino	Características	Tipo de inóculo	Número de muestras
V1	pH 3,0 GA 13,0%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3
V2	pH 3,3 GA 13,0%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3
V3	pH 3,6 GA 13,0%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3
V4	pH 3,4 GA 12,0%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3
V5	pH 3,4 GA 13,5%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3
V6	pH 3,4 GA 15,0%	ALGINATO	3
		SÍLICE-ALGINATO	3
		BACTERIAS LIBRES	3

Los vinos se esterilizaron por filtración con un filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0,2 µm de diámetro de poro. Una vez esterilizados los vinos, se prepararon muestras por triplicado de 10 mL de vino en tubos Falcon estériles, en los cuales posteriormente se introducirán las BAL libres o inmobilizadas en dos soportes.

4.2. Inmovilización de BAL en geles de alginato de calcio y sílice-alginato

Para la inmovilización de *O. oeni* en los geles de alginato de calcio y sílice-alginato, se ha empleado los métodos propuestos por Simó et al. (2017a).

Se utilizó una ruta acuosa basada en la mezcla de derivados de sílice (silicato sódico y sílice coloidal) con alginato antes de la gelificación en presencia de Ca^{2+} (Coradin et al., 2003).

Para la encapsulación de *O. oeni* en los geles de sílice-alginato en condiciones asépticas, se ajustó el pH a 6,29 de una solución acuosa de silicato sódico 0,06 M y 1,23 M de sílice coloidal (Ludox HS40, Sigma, España) con HCl al 37,5%. A continuación, se añadió alginato sódico a la solución de sílice hasta obtener una concentración final del 2% (p/v). Finalmente, las bacterias *O. oeni* (LALVIN VP 41 MBR, Lallemand, Francia), previamente hidratadas, se añadieron a una concentración de 3×10^9 ufc/g de gel. Las cápsulas de sílice-alginato se realizaron goteando esta suspensión desde una jeringa estéril de 10 mL (BD Pastipak, España) en 200 mL de una solución estéril de CaCl_2 0,2 M bajo agitación continua (260 rpm). Las cápsulas se mantuvieron en esta solución durante 2 h y se lavaron con agua estéril (100 mL). El procedimiento para el atrapamiento de las bacterias en gel de alginato fue similar al descrito anteriormente, pero omitiendo la adición de derivados de sílice (Simó et al, 2017).

4.3. Desarrollo de la FML

Se realizaron 54 FML con vinos (V1-V6) con diferente grado alcohólico y pH y con tres tipos de inóculos (bacterias encapsuladas en geles de alginato de calcio y sílice-alginato y bacterias libres) (Ver Tabla 1).

Para el desarrollo de las FML la concentración de capsulas empleada fue de 0,03 g/mL de vino que corresponde a una carga de bacterias de 9×10^7 ufc/mL de vino. En el caso de las FML inoculadas con BAL libre se añadió las misma dosis de bacterias (9×10^7 ufc/mL de vino). La FML se condujo 22°C y cada 24 horas se tomó una alícuota de 100 μL de vino para medir la concentración de ácido L-málico. Estas alícuotas se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis. El seguimiento de la FML se realizó analizando periódicamente el contenido en ácido L-málico de los vinos experimentales con ayuda de un kit enzimático (TDI, España) por duplicado.

Este proceso se llevó a cabo en condiciones estériles. El material utilizado durante todo el procedimiento es estéril o bien se ha esterilizado a 121°C durante 20 minutos. El experimento se ha realizado en una cámara de flujo laminar y siempre con un mechero encendido para tener una correcta esterilidad en el ambiente.

Para realizar el análisis del contenido de ácido L-málico de las alícuotas, se llevó a cabo un muestreo de cada una en una placa de 96 pocillos que se analizó con un espectrofotómetro automático. En cada pocillo se añadía 5 µL de vino y 200 µL de reactivos y 5 µL de enzima del kit enzimático (TDI, España). La placa con las muestras de vino, se colocó en el espectrofotómetro y se realizó la medida automática a 490 nm.

4.4. Estabilidad de la matriz de inmovilización

Se estudió la estabilidad química de las matrices de inmovilización sumergiendo 20 cápsulas de alginato o sílice-alginato (con BAL inmovilizadas) en 10 mL de vino de distintas características (V1-V6) y se evaluó la modificación de su diámetro y peso durante 25 días. También se determinó la liberación de alginato al vino después de 14 días. Ambos experimentos se llevaron a cabo con cada tipo de vino (V1-V6) y se ensayaron por triplicado (36 muestras cada ensayo).

Para evaluar el diámetro de las 20 cápsulas de cada experimento, se realizó una foto de las mismas sobre un fondo blanco y con una regla. Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ 1.47v (National Institute of Health, Estados Unidos). La modificación de peso se realizó midiendo el peso de las 20 perlas con ayuda de una báscula analítica (AS 220/C/2, Polonia).

Para cuantificar la pérdida de alginato de los soportes se lleva a cabo la medida cuantitativa de los polisacáridos, mediante el método de extracción y análisis de los polisacáridos totales propuesto por Segarra et al. (1995).

4.5. Estabilidad operacional

Se estudió la estabilidad operacional de las matrices de inmovilización sumergiendo 20 cápsulas de sílice-alginato (con BAL inmovilizadas) o BAL sin encapsular en 10 mL de vino y se evaluó la capacidad fermentativa de las bacterias encapsuladas y libres. Se evaluó concretamente la capacidad de las bacterias de degradar el ácido L-málico, durante un periodo de 5 días. El proceso se repitió 5 veces utilizando las mismas cápsulas y BAL durante todo el proceso. Para realizar el cambio del vino, éste se centrifugó junto con las BAL (4 min a 4000r.p.m) y se eliminó el vino sobrenadante con cuidado de no perder el sedimento. Seguidamente se añadieron otros 10 mL de vino estéril para la siguiente FML. En el caso de las cápsulas, se desechó el vino a través de un colador donde se quedaron retenidas las cápsulas. Después, éstas se añadieron de nuevo en el tubo Falcon con 10 mL de vino estéril nuevo. El experimento se realizó con cada tipo de vino (V1-V6) y se ensayaron por triplicado (36 muestras).

4.6. Tratamiento estadístico de los datos

Se empleó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII-X64, para realizar el tratamiento estadístico de los datos. En las figuras, los datos han sido representados como su media y la barra de error indica el error estándar de los datos.

5. Resultados y discusión

A continuación se mostrarán y discutirán los distintos resultados obtenidos en los cuatro ensayos realizados en el laboratorio.

5.1. Estabilidad química del soporte durante el desarrollo de la FML

Para una aplicación industrial de las cápsulas de sílice-alginato (ALG-SIL) cargadas con *O. oeni* es necesario conocer su estabilidad a lo largo del tiempo que se desarrolle la FML. Por ello en esta primera parte del apartado de resultados se presentarán los resultados obtenidos de los efectos del GA y pH del vino en la estabilidad de los soportes de alginato de calcio (ALG) y sílice-alginato (ALG-SIL) utilizados durante la experiencia. Para ello, se evaluó el peso y el diámetro de las cápsulas cargadas con las bacterias a diferentes tiempos de desarrollo de la FML.

5.1.1. Evolución del peso de las cápsulas

Efecto del pH:

A continuación se presentan los resultados de la evolución del peso de las cápsulas de ALG y ALG-SIL en los vinos con distinto pH y GA.

En la figura 1 se observa una gran merma en el peso de las 20 capsulas de alginato a lo largo del tiempo de experimentación. Cabe destacar que la pérdida de peso es muy importante durante los primeros días y depende del pH del vino, siendo más pronunciada a pH más bajos.

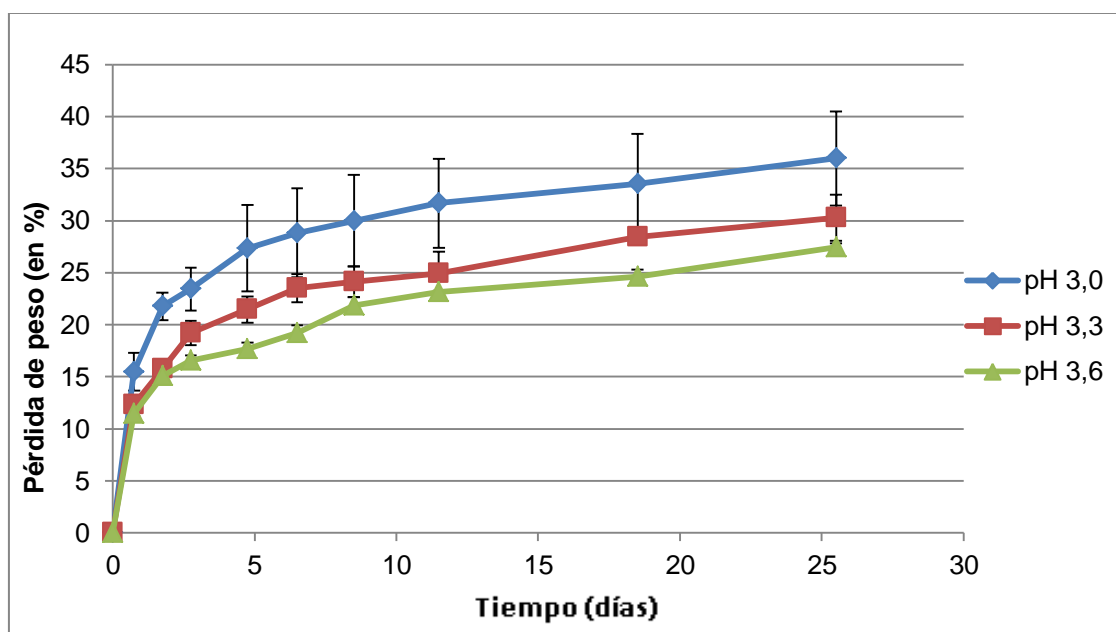


Figura 1. Evolución del peso de las cápsulas de alginato de calcio en vinos con distinto pH durante el desarrollo de la FML.

En la figura 2 se observa una mayor merma del peso de las cápsulas de sílice-alginato que estaban en los vinos con un pH más ácido (3,3 y 3,0). Sin embargo la diferencia de la pérdida de peso entre los tres vino no es muy desigual, lo que induce a pensar que la inclusión de material silíceo en el gel de alginato homogeneiza el comportamiento de las cápsulas frente al pH del vino.

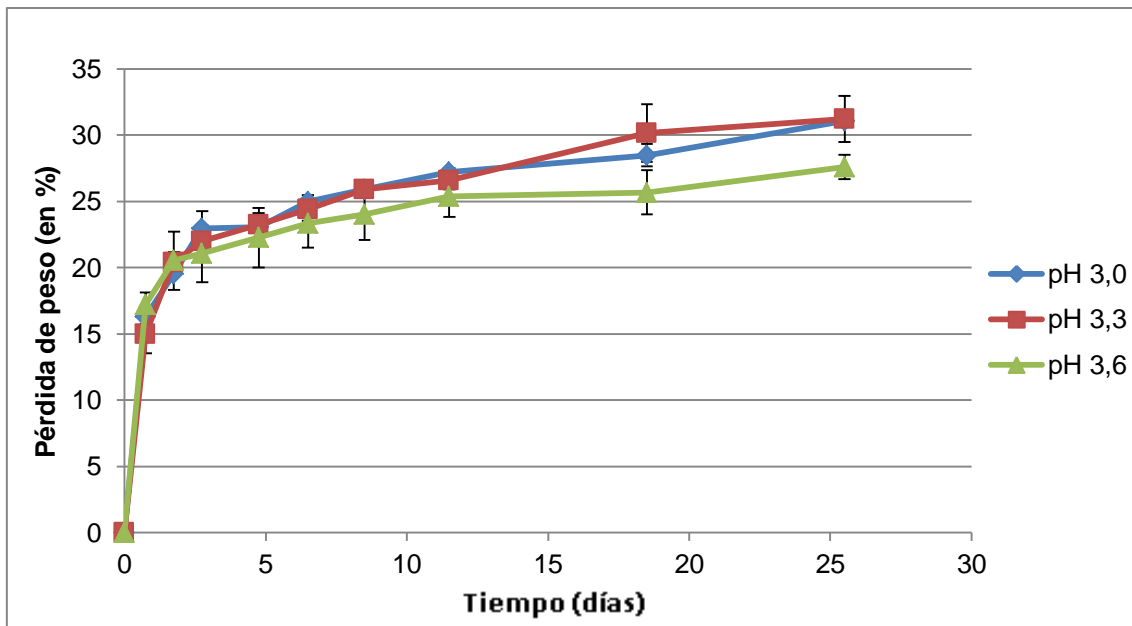


Figura 2. Evolución del peso de las cápsulas de sílice-alginato en vinos con distinto pH durante el desarrollo de la FML.

Si comparamos el comportamiento de los dos tipos de soportes en función del pH, se puede ver que la merma de peso es algo menor en las cápsulas de ALG-SIL a pH ácidos (3,0-3,3). En cambio a valores de pH 3,6 la merma es similar en los dos tipos de soporte.

Efecto del etanol:

En la figura 3 se observa una mayor pérdida de peso en las cápsulas a medida que aumenta el GA del vino. Los vinos con mayor GA (13,5% y 15,0%) merman una mayor cantidad de peso que las cápsulas de GA al 12,0%. Según Torres et al. (2011), esto se debe principalmente a una deshidratación de las cápsulas provocada por los alcoholes que contiene el vino.

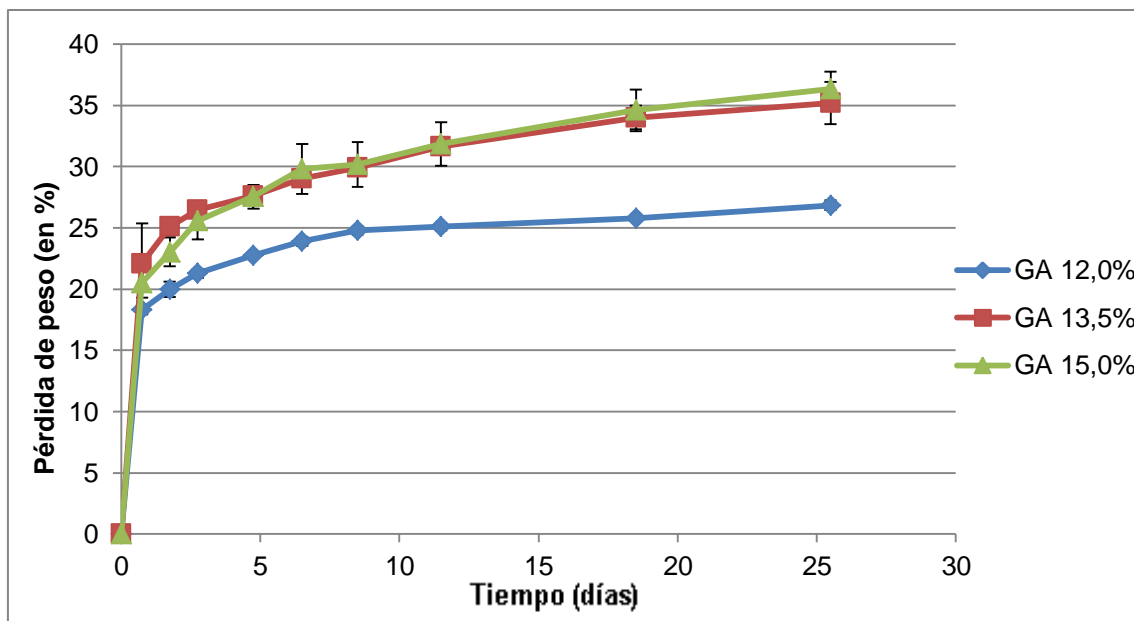


Figura 3. Evolución del peso de las cápsulas de alginato de calcio en vinos con distinto GA durante el desarrollo de la FML.

En la figura 4 se observa una menor pérdida de peso de las cápsulas ALG-SIL en comparación con la figura 3. Además, no se observan diferencias en la evolución de la pérdida de peso de las cápsulas de ALG-SI en función del GA del vino; y también que la pérdida de peso de estas capsulas es menor que las de ALG. Este comportamiento de las cápsulas de ALG-SIL puede indicarnos que al añadir un componente inorgánico, provoca una mayor resistencia a la deshidratación.

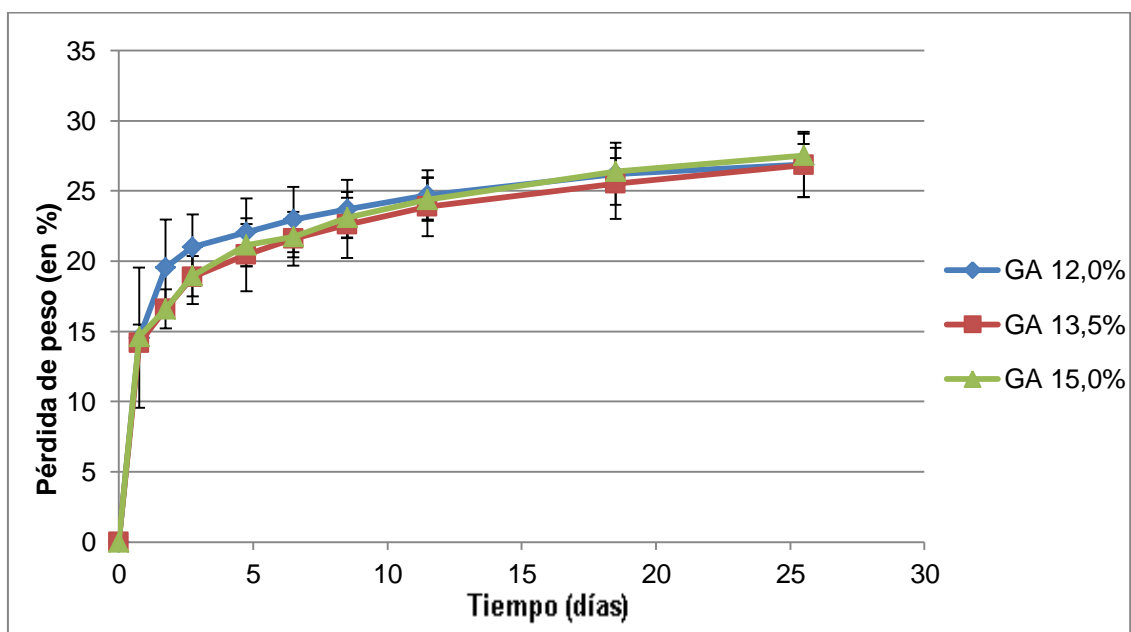


Figura 4. Evolución del peso de las cápsulas de sílice-alginato en vinos con distinto GA durante el desarrollo de la FML.

Estos resultados que se han obtenido, son muy similares a los del estudio de Simó et al. 2017b, que realizó una monitorización de la pérdida de peso de ambos tipos de cápsulas a las 168 horas de su exposición al vino (pH 3,2; 14,0% GA). Se demostró que existían unas pérdidas de peso del 37,26% para las cápsulas de ALG y del 17,88% para las de ALG-SIL.

5.1.2. Evolución del diámetro de las capsulas durante el desarrollo de la FML

Efecto del pH:

Como se puede observar en la figura 5 los vinos con pH más ácidos (3,0 y 3,3) tienen una mayor merma en el diámetro de las cápsulas, a medida que se desarrolla la FML. Esto se correlaciona con la pérdida de peso de las cápsulas, es decir, a mayor pérdida de peso, mayor pérdida de diámetro.

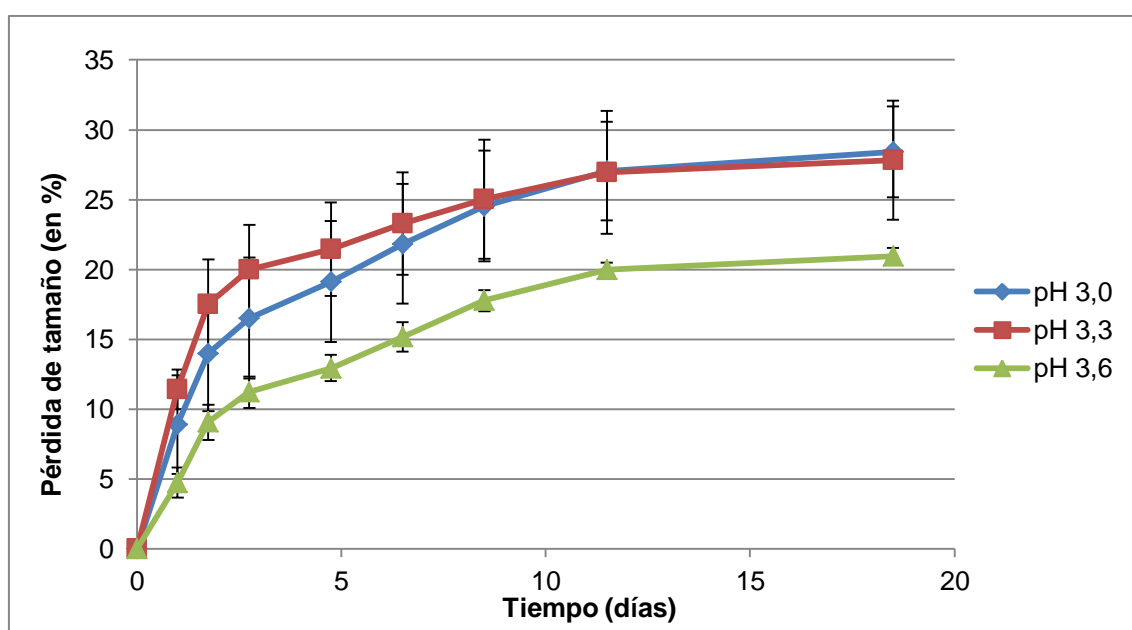


Figura 5. Evolución de la reducción del diámetro de las perlas de alginato de calcio en vinos con distinto pH durante el desarrollo de la FML.

En la figura 6 se observa la misma tendencia que en la figura 5, las cápsulas de ALG-SIL que estaban en los vinos con pH menor (3,0-3,3), tienen una mayor pérdida de tamaño. En comparación con las cápsulas de ALG, estas tienen una menor merma de su tamaño. En el caso de las de ALG se pierde más de un 25% del tamaño inicial y en las de ALG-SIL son de hasta el 21%, a pH bajos. Los resultados de pérdida de

tamaño en este caso también se ver relacionados con la pérdida de peso de las cápsulas, a mayor pérdida de peso, mayor pérdida de diámetro.

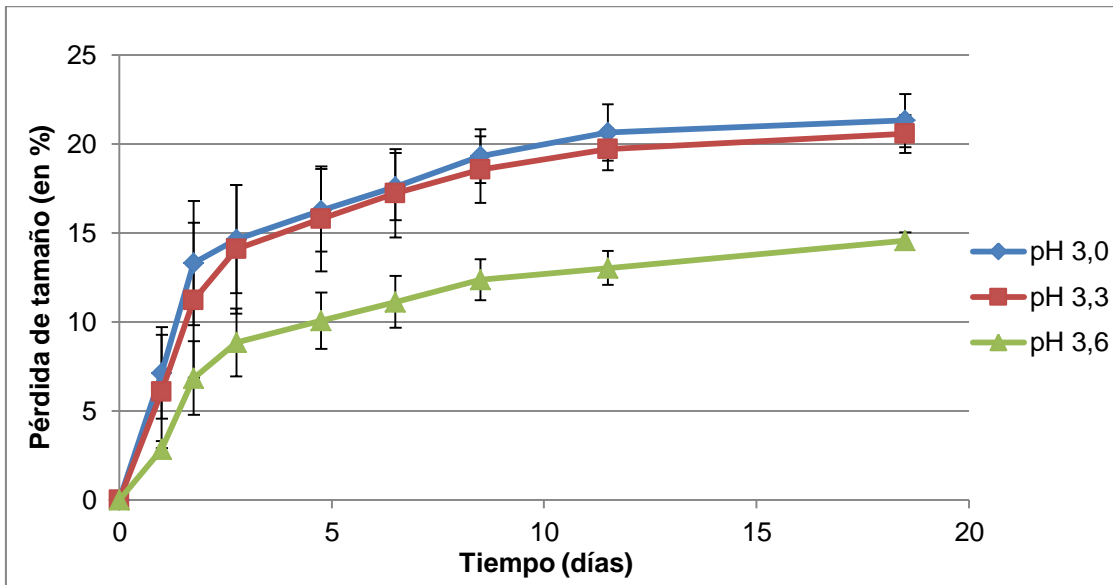


Figura 6. Evolución de la reducción del diámetro de las perlas de sílice-alginato en vinos con distinto pH durante el desarrollo de la FML.

Efecto del etanol:

Los resultados obtenidos en la Figura 7 reflejan que los vinos con GA de 12,0% y 13,5% provocan una menor pérdida de tamaño en las cápsulas de ALG, que el vino al 15,0%. Estos resultados están relacionados con los resultados obtenidos en la figura 3, ya que en los vinos con 13,5% y 15,0% se observó una mayor pérdida de tamaño y peso.

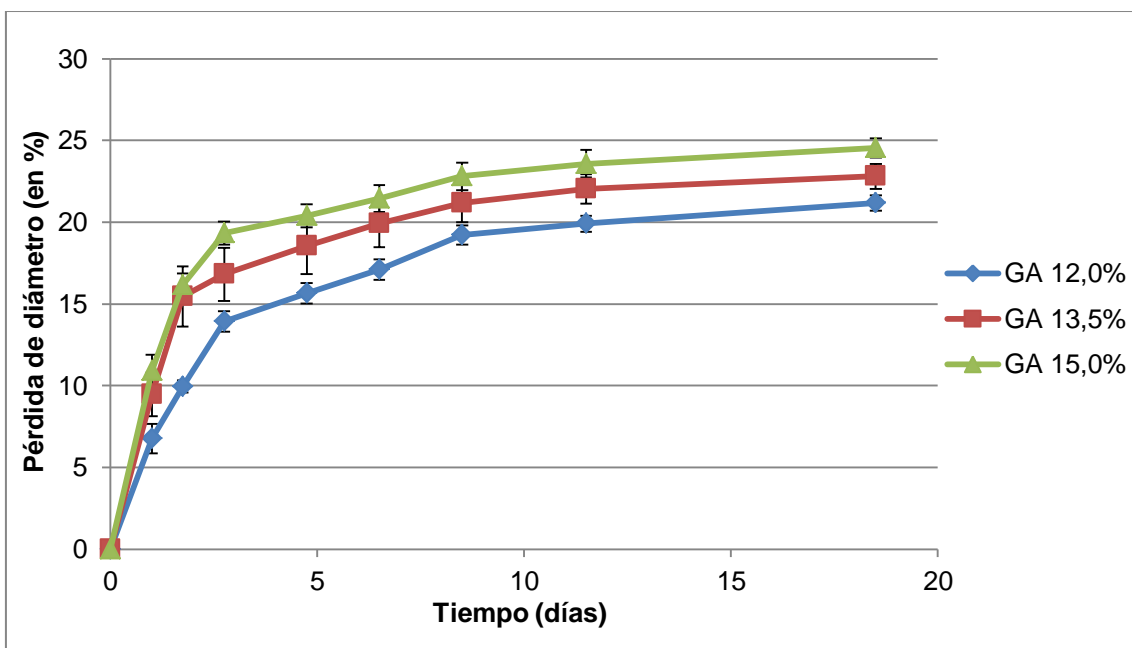


Figura 7. Evolución de la reducción del diámetro de las perlas de alginato de calcio en vinos con distinto GA durante el desarrollo de la FML.

En la figura 8 se puede observar que la mayor pérdida de tamaño de las cápsulas se produce en los vinos con GA 13,5% y 15,0%; esto nos indica que a GA elevados se produce una mayor pérdida de diámetro de las cápsulas. Pero, si se comparan estos resultados con los obtenidos con las cápsulas de ALG, estas cápsulas de ALG-SIL tienen una menor pérdida de diámetro.

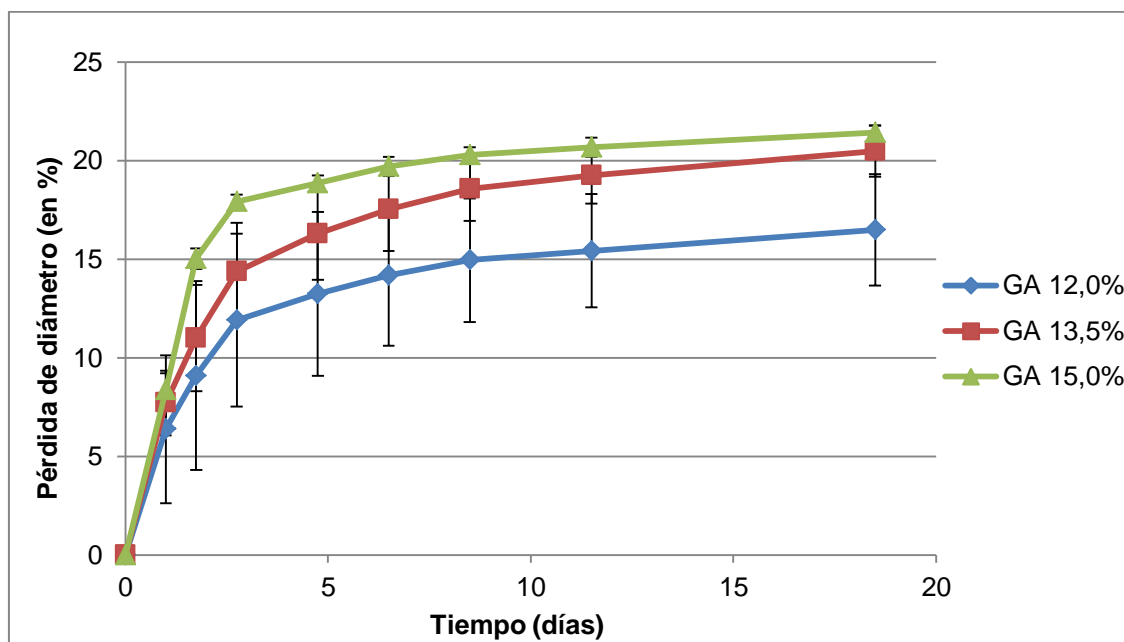


Figura 8. Evolución de la reducción del diámetro de las perlas de sílice-alginato en vinos con distinto GA durante el desarrollo de la FML.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos de Simó et al. (2017b), que observó una reducción del diámetro de las cápsulas de ambos tipos pasadas 168 horas de exposición al vino, siendo más intensa en las cápsulas de ALG. Se determinó una reducción del diámetro del 15,80% para cápsulas de ALG y del 10,29% para las cápsulas de ALG-SIL.

La pérdida de peso y diámetro, son dos parámetros que están relacionados entre sí. La modificación de estos parámetros en las cápsulas, se debe principalmente a una deshidratación de las mismas, ya que según Torres et al., 2011, la exposición de las cápsulas de alginato a alcoholes como (etanol y alcohol isopropílico) pueden causar deshidratación en las cápsulas porque son hidrogeles con alta concentración de agua (96-99%). Torres et al. (2011) observó una reducción del 15,2% del volumen de las cápsulas de alginato después de 4 h de exposición en una mezcla hidroalcohólica del 20% en etanol. Además, este efecto no sólo depende del grado alcohólico del vino

sino también de su pH. A los valores de pH más bajos se obtuvieron las mayores pérdidas de peso y de volumen. Mumper et al. (1994) observó que la reducción del pH de 4,0 a 1,0 reducía el diámetro de las cápsulas de ALG. A un valor de pH menor que el pKa de los ácidos manurónico y gulurónico (3,38 y 3,36, respectivamente), los grupos carboxílicos del alginato se encuentra sin disociar, lográndose una estructura de gel más compacta debido a la reducción de la repulsión electroestática entre los polímeros de alginato.

También cabe destacar que las cápsulas de ALG-SIL tienen menores pérdidas de estos parámetros en comparación con las cápsulas de ALG, esto se debe a que al incluir una red inorgánica de sílice en gel de alginato se reduce la contracción de las cápsulas y esto provoca una gran resistencia a la deshidratación. (Torres et al., 2011). Además la condensación de grupos silanol (Si-OH) de silicato de sodio forma siloxanos (Si-O-Si) y la policondensación de silanol y siloxanos genera matrices SiO₂ (Kuncová & Trogl, 2010), con fuerte inercia y estabilidad química (Callone et al., 2008). El sílice coloidal también puede actuar como carga reforzando la estabilidad de las cápsulas y su superficie, rica en grupos silanol, puede proporcionar sitios reactivos durante el proceso de policondensación de la matriz de SiO₂ (Coradin et al., 2003).

5.1.3. Evolución de la concentración de polisacáridos totales en vino durante el desarrollo de la FML

Para valorar la estabilidad de los soportes de inmovilización se decidió cuantificar la liberación de alginato procedente de las capsulas de ALG y ALG-SIL. La cuantificación de los niveles de alginato se realizó empleando el método propuesto por Segarra et al. (1995), que determina la cantidad de polisacáridos totales. Los resultados mostrados en las figuras 9 y 10 muestran la diferencia en la concentración de polisacáridos totales en cada vino después de 7 de días de FML respecto a su correspondiente vino sin cápsulas (control).

Efecto del pH:

Se puede observar en las muestras de ALG que a medida que aumenta el pH aumenta ligeramente la concentración de alginato, existiendo únicamente diferencia estadísticamente significativas entre el vino de pH 3,0 y 3,3. Si comparamos los dos soportes de encapsulación, se puede observar que las cápsulas de ALG-SIL ceden mayor cantidad de alginato al vino que las de ALG, a excepción del vino de pH 3,6.

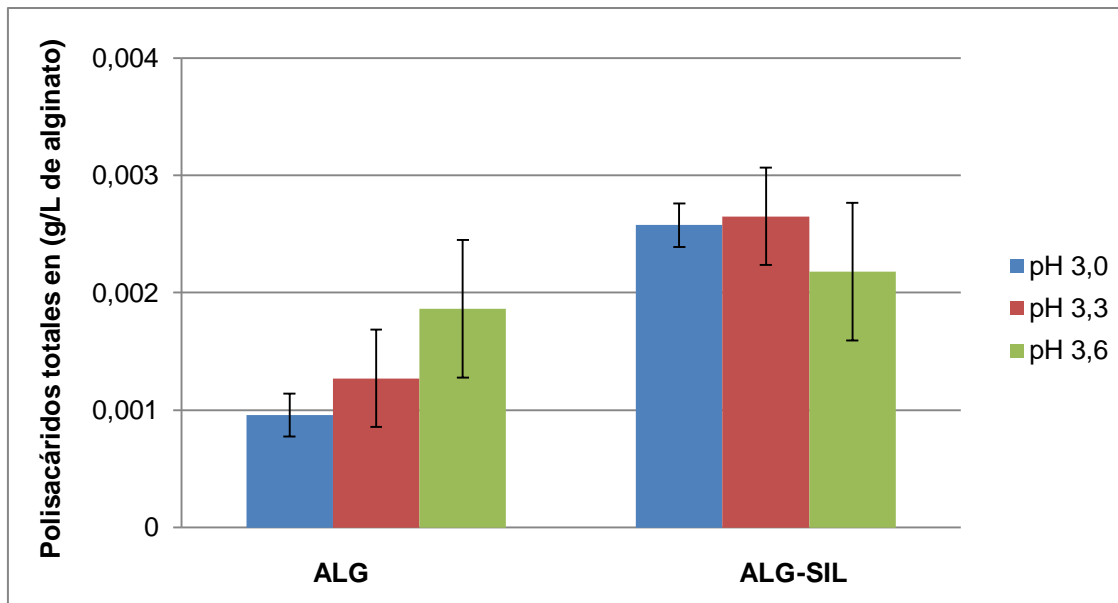


Figura 9. Incremento de la concentración de polisacáridos totales en los vinos a pH 3,0, 3,3 y 3,6 después de 7 días de FML inoculados con cápsulas de alginato de calcio (ALG) y sílice-alginato (ALG-SIL)

Efecto del etanol:

En la figura 10 se representa la diferencia de concentración final de alginato presente en las muestras de vino a distinto GA, respecto al vino control sin cápsulas. Se puede observar en las muestras de ALG que a medida que aumenta el GA disminuye la concentración de alginato en el vino, observándose únicamente diferencias estadísticamente significativas en los vinos al 12,0% y 15,0%.

Si comparamos los dos soportes de encapsulación, no se observan diferencias estadísticamente significativas para la concentración de polisacáridos totales para cada grado alcohólico.

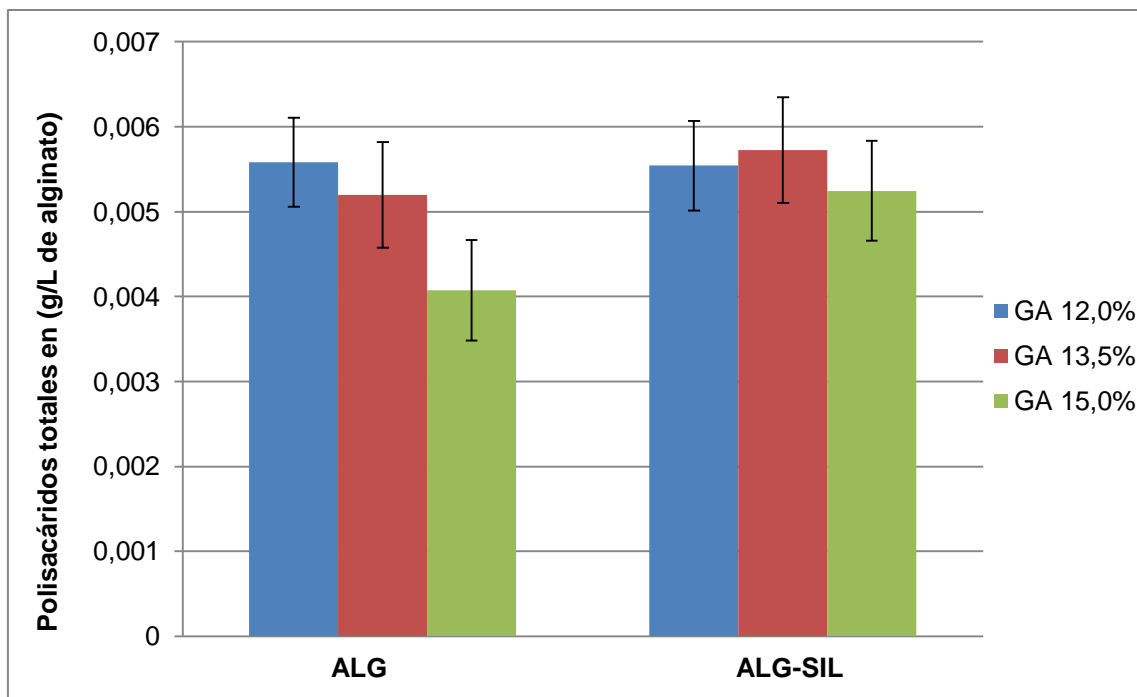


Figura 10. Incremento de la concentración de polisacáridos totales en los vinos con GA 12%, 13,5% y 15% después de 7 días de FML inoculados con cápsulas de alginato de calcio (ALG) y sílice-alginato (ALG-SIL)

Comparando los resultados de ambos soportes se puede decir que el GA afecta más a la desintegración parcial de las cápsulas, es decir ceden mayor cantidad de alginato al vino. Estos resultados muestran que la descomposición química de las cápsulas no tuvo lugar bajo estas condiciones experimentales. Esta liberación despreciable de alginato puede deberse a la difusión de alginato no polimerizado desde el interior de las cápsulas hasta el vino (Strand et al., 2004).

5.2. Estabilidad operacional del soporte

En esta segunda parte se representaran los resultados obtenidos de las sucesivas FML realizadas a los seis vinos (V1-V6), reutilizando las BAL libres e inmovilizadas en ALG-SIL. A los cinco días de la inoculación de los vinos se determinaba el consumo de ácido málico y tanto las mismas BAL libres como las inmovilizadas se inoculaban en otro lote de vino. Este proceso se repitió 5 veces.

Efecto del pH:

Como se puede ver en la figura 11 a pH 3,0, el rendimiento de las bacterias encapsuladas fue menor en comparación con los vino con pH más altos (3,3 y 3,6). Los mayores rendimientos fermentativos se dieron en el vino a pH 3,6 donde las bacterias fueron capaces de trabajar con mayor facilidad. También cabe indicar que con el paso de las fermentaciones la capacidad de degradación ácido L-málico por las bacterias fue menor en los tres vinos. Además, el pH del vino tiene un efecto en la capacidad fermentativa de las bacterias después de 5 ciclos de reutilización. Al pH más ácido del vino (pH 3,0), se observó una pérdida del 19% de la capacidad fermentativa de las bacterias encapsuladas después de los 5 ciclos, siendo del 11% a pH 3,6.

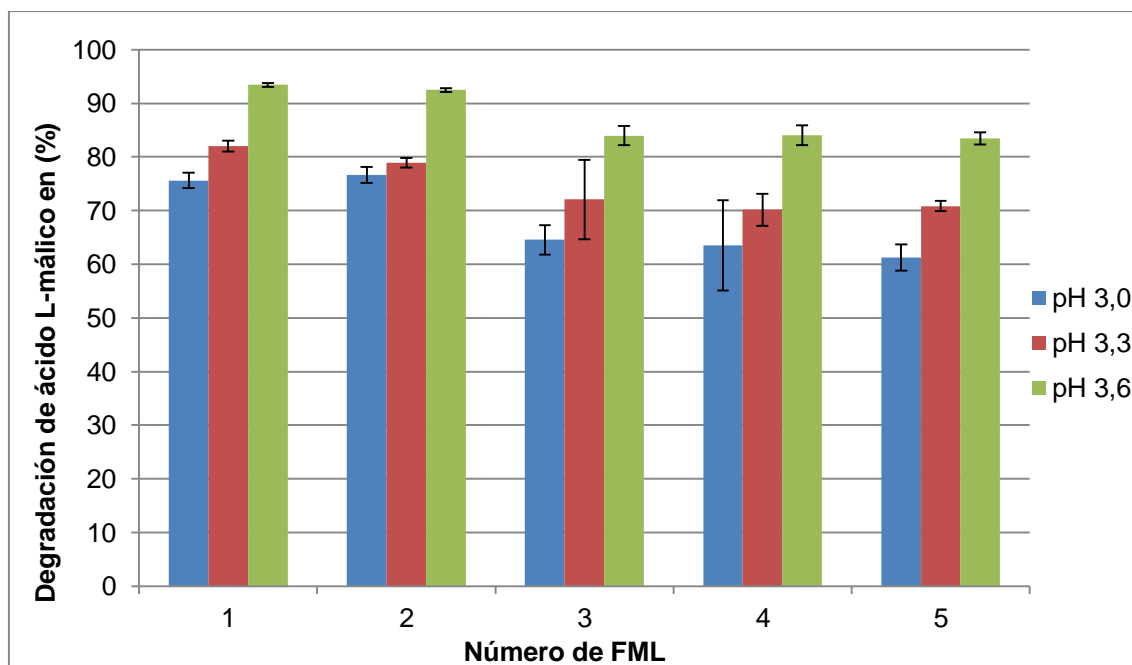


Figura 11. Degradación de ácido L-málico (en %) por *O. oeni* encapsuladas en ALG-SiL. Las cápsulas se introdujeron en vinos a pH 3,0, 3,3 y 3,6 para realizar 5 FML consecutivas, durante un periodo de 5 días por fermentación.

Los resultados obtenidos en la figura 12 nos muestran que las bacterias libres eran capaces de realizar FML sucesivas en vinos con pH de 3,6. Sin embargo, a pH más ácidos 3,0 y 3,3 las bacterias libres sólo fueron capaces de realizar correctamente la primera fermentación, el resto de fermentaciones apenas se llegan a realizar.

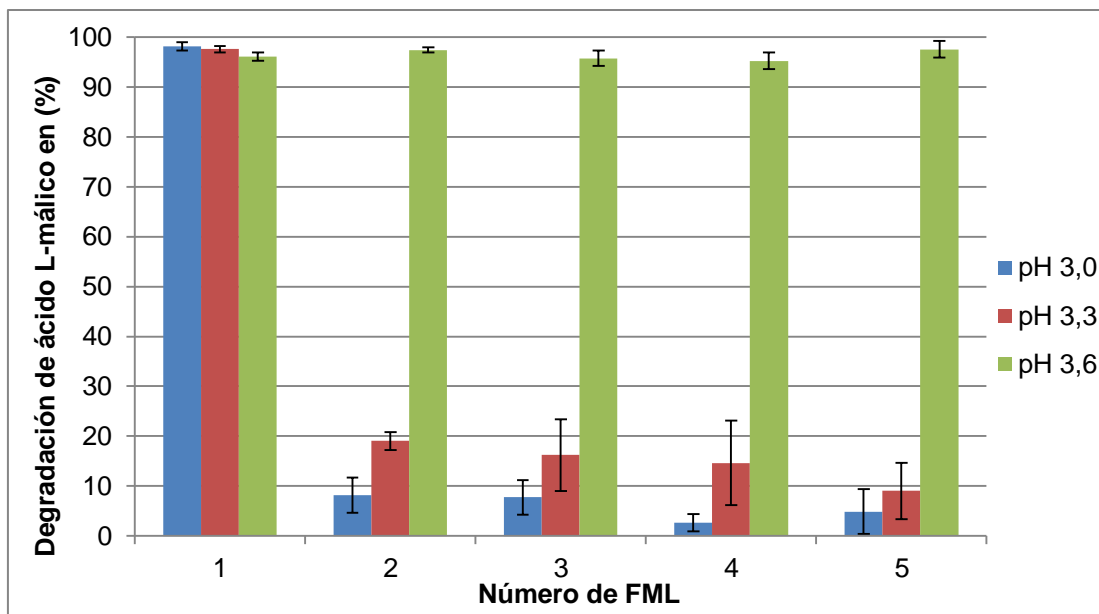


Figura 12. Degradación de ácido L-málico (en %) por *O. oeni* libres. Las BAL se introdujeron en vinos a pH 3,0, 3,3 y 3,6 para realizar 5 FML consecutivas, durante un periodo de 5 días por fermentación.

Comparando las figuras 11 y 12 se puede observar que las bacterias encapsuladas en ALG-SIL tienen una buena actividad fermentativa durante los sucesivos ciclos de fermentación y en cambio las bacterias libres, solo funcionan durante el primer ciclo o en condiciones idóneas para su desarrollo (pH 3,6).

El pH es un factor crítico al inicio de la MLF, así como el tiempo necesario para completar la MLF (Rosi et al., 2003). A pH 3,3 o superior, el crecimiento y la supervivencia de las bacterias *O. oeni* son menos problemáticos (Lerm et al., 2010), siendo la mayor actividad maloláctica alcanzada entre pH 3,5-4,0 (Bauer & Dicks 2004).

Los resultado alcanzados son comparables a los del estudio de Simó et al. (2017b), que concluyó que a niveles de pH entre 3,6 y 4,0, las bacterias encapsuladas libres y Si-Al mostraron los mejores niveles de degradación relativa del ácido málico (99% y 91% a pH 3,6 respectivamente), siendo las más bajas para las bacterias encapsuladas con alginato. Las bacterias libres fueron especialmente sensibles a la disminución del pH del vino de 3,6 a 3,0, controlando una reducción significativa del consumo relativo de ácido málico de 99% a 26%, respectivamente. Solieri et al. (2010) indicaron que los valores bajos de pH (3,0-3,2) son el principal factor estresante que influye negativamente en la MLF, independientemente de la concentración de etanol (10,0-13,0%). Knoll et al. (2011), indicaron que hubo un aumento en la duración de la

FML de 34 días cuando el pH se redujo de 3,8 a 3,2 en los vinos con 9,8% de grado alcohólico, mientras que se observó una MLF parcial a pH 3,2 y 11,8% en etanol.

Curiosamente, la inmovilización de las bacterias en ALG-SIL redujo su sensibilidad hacia un pH entre 3,0 y 3,4. A pH extremadamente bajo (3,0-3,3), se alcanzaron los valores más altos de degradación del ácido málico inoculando bacterias encapsuladas con ALG-SIL (Simó et al., 2017b). El proceso de encapsulación tuvo lugar a pH 6,29, por lo que hipotéticamente el pH dentro de las cápsulas puede ser mayor que el pH del vino, lo que podría contribuir a disminuir el estrés de pH causado a las bacterias encapsuladas. Además, estos autores sugieren que la inclusión de material silíceo puede mejorar la tolerancia de las bacterias encapsuladas a pH extremadamente bajo.

Hay que señalar que este comportamiento de las bacterias encapsuladas es de gran interés para una futura aplicación industrial de las cápsulas en zonas vitivinícolas frías donde el valor de pH de sus vinos es muy bajo (2,8-3,2) y las bacterias libres tiene muy complicado el desarrollo de la FML

Efecto del etanol:

Como se puede ver en la figura 13 las bacterias encapsuladas en ALG-SIL han realizado correctamente la fermentación del ácido L-málico. El gráfico también refleja que a GA altos 15%, el rendimiento de las bacterias encapsuladas es menor en comparación con los vinos con GA más bajo (12,0% y 13,5%). Los mayores rendimientos fermentativos se dan en el vino con un GA 12% donde las bacterias son capaces de trabajar con mayor facilidad.

La estabilidad operacional de las bacterias encapsuladas estuvo comprometida por el incremento del grado alcohólico, tal y como se observó anteriormente para el pH. Al GA más bajo (12,0%), se observó una ligera reducción del 8,1% en la capacidad fermentativa de las bacterias encapsuladas después de los 5 ciclos de FML, alcanzando un 24,6% para el 15,0%. Hay que señalar que la duración de los ciclos de FML se mantuvo constante, y que un incremento en la duración del ciclo de la FML para los últimos lotos, incrementaría el % del ácido málico degradado para llegar a valores similares a los obtenidos en los primeros ciclos.

También se puede observar que con el paso de las fermentaciones la capacidad de degradación ácido L-málico por las bacterias es menor en los tres vinos.

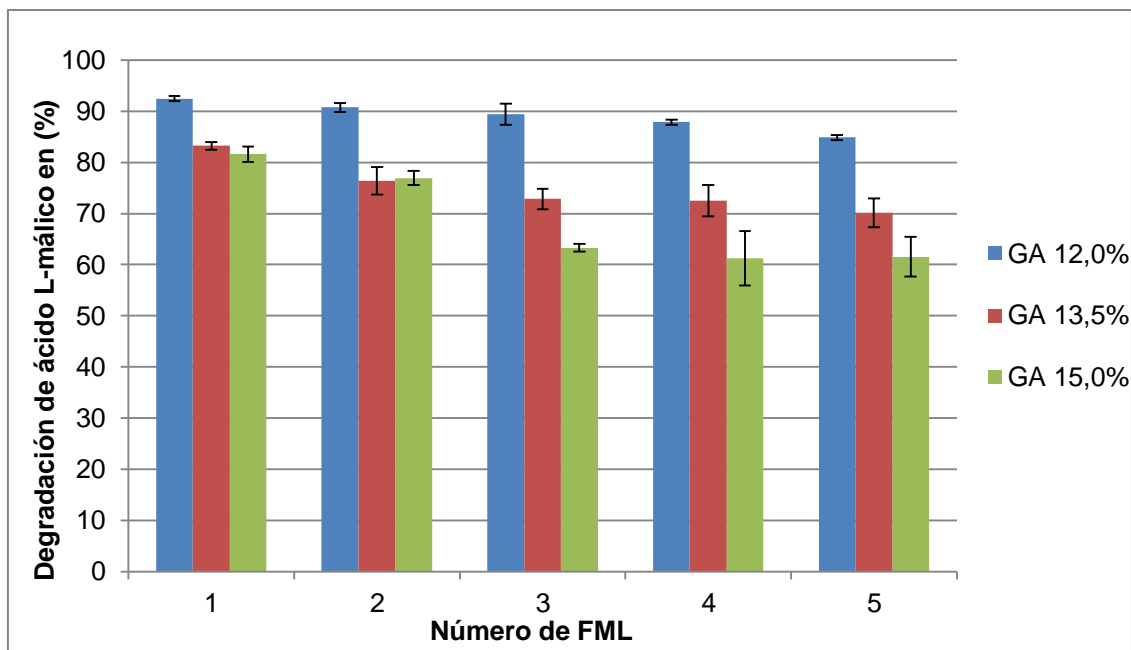


Figura 13. Degradación de ácido L-málico (en %) por *O. oeni* encapsuladas en ALG-SIL. Las cápsulas se introdujeron en vinos con GA 12,0%, 13,5% y 15,0% para realizar 5 FML consecutivas, durante un periodo de 5 días por fermentación.

Como se puede observar en la figura 14 las bacterias libres son capaces de realizar FML sucesivas en vinos con la menor GA (12,0%). Sin embargo, a GA más elevados 13,5% y 15,0% las bacterias libres sólo son capaces de llevar a cabo de forma casi completa la primera fermentación, el resto de fermentaciones apenas llegan al 10% de degradación de ácido L-málico. El efecto negativo de las altas concentraciones de etanol en el metabolismo de las bacterias lácticas está bien documentado (Lerm et al. 2010, Sumbly et al. 2014). La FML y el crecimiento de *O. oeni* se encuentra claramente inhibido por el etanol, causando una ruptura de las estructuras de la membrana celular y una alteración de la fluidez de la membrana (Betteridge et al. 2015). Recientemente, el análisis transcriptómico y proteómico de *O. oeni* ha puesto de relieve que el transporte de metabolitos y la biogénesis de la pared celular y la membrana son las principales categorías funcionales afectadas por el etanol (Olguín et al., 2015). Para contrarrestar estos efectos, *O. oeni* posee mecanismos celulares para obtener cierta resistencia a la alta concentración de etanol, como el cambio de la composición de ácidos grasos de su membrana en respuesta al efecto fluidizante del etanol (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).

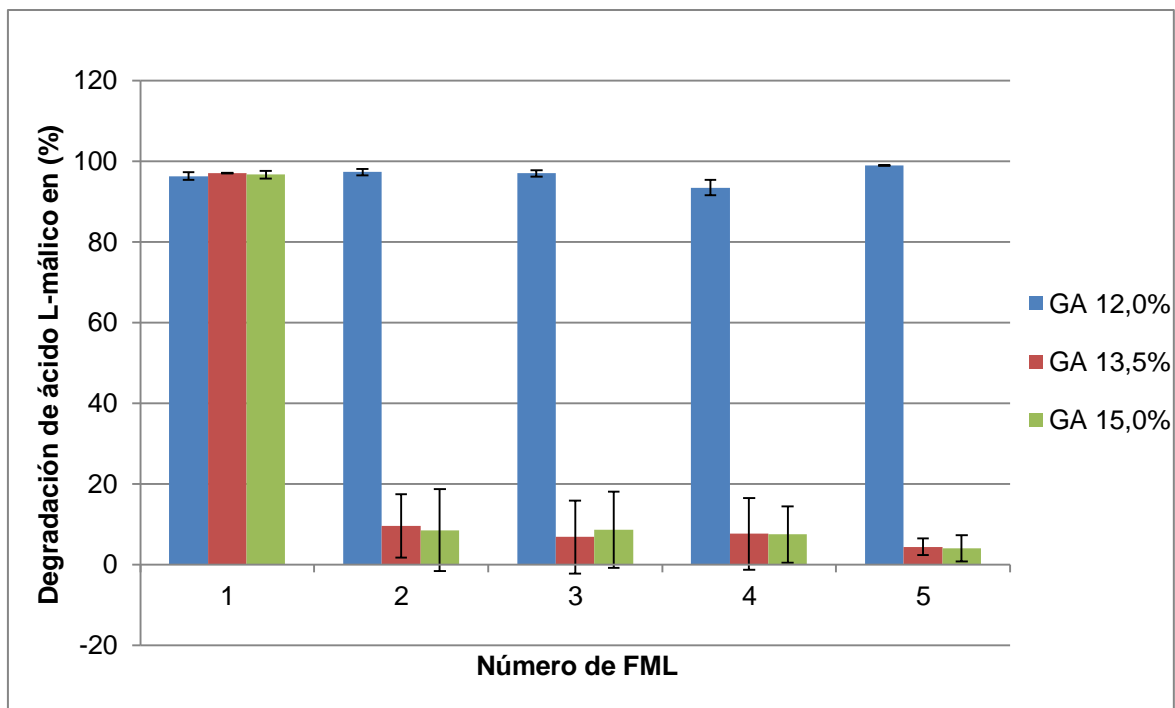


Figura 14. Degradación de ácido L-málico (en %) por *O. oeni* libres. Las BAL se introdujeron en vinos con GA 12,0%, 13,5% y 15,0% para realizar 5 FML consecutivas, durante un periodo de 5 días por fermentación.

Comparando las figuras 13 y 14 se puede observar que las bacterias encapsuladas en ALG-SIL tienen una buena actividad fermentativa durante los sucesivos ciclos de fermentación y en cambio las bacterias libres, solo funcionan durante el primer ciclo o en condiciones idóneas para su desarrollo (GA 12%). Simó et al. (2017b), indicó que para bacterias libres, el consumo de málico en vinos con un GA del 14% fue inferior al 50% y disminuyó a 1% al subir el GA al 16%. Sin embargo, la degradación del ácido L-málico no se vio tan fuertemente afectada por el etanol en bacterias encapsuladas. Con un GA del 14% se logró una degradación de 90% en bacterias encapsuladas en ALG-SIL y para GA de 16% la degradación fue de 88% para ALG-SIL. Esta mejoría de la FML a GA elevados podría deberse a que la red inorgánica de silicatos proporciona una mayor tolerancia al etanol. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Rodríguez-Nogales et al. (2013), que mostraron una mayor eficiencia en MLF con las bacterias encapsuladas con alcohol polivinílico, en comparación con las bacterias libres. La mayor tolerancia al estrés al etanol en las células inmovilizadas se ha atribuido a varios factores. La matriz de inmovilización puede proporcionar un microambiente protector contra el estrés por alcohol (Kourkoutas et al., 2004) debido a las restricciones difusionales que pueden reducir la concentración de etanol dentro de la matriz.

Otros estudios han informado de que las células encapsuladas con alginato presentan un mayor nivel de ácidos grasos saturados en sus membranas celulares, lo que resulta en una mejor tolerancia al alcohol (Junter & Jouenne 2004). Sun et al. (2007) observaron que la matriz de alginato líquido no gelificante mejoraba la estabilidad de la capa de hidratación alrededor de la célula, aumentando la protección celular.

Estos resultados ponen en evidencia las adecuadas condiciones catalíticas de *O. oeni* encapsulada en geles de ALG-SIL para desarrollar la FML en vinos altamente alcohólicos, como los encontrados en las zonas vitivinícolas cálidas y potenciados por el cambio climático, y la posibilidad de reutilización en diversos lotes de vinos lo que supone una ventaja añadida a estos sistemas de inoculación bacteria.

6. Conclusiones

- La inclusión de derivados de sílice a las cápsulas de alginato incrementa su estabilidad en vinos con pH ácidos y GA elevados.
- Las bacterias del género *O. oeni* encapsuladas en ALG-SIL son capaces de realizar varios ciclos de FML en condiciones de pH bajos y GA altos que son desfavorables para éstas bacterias en estado libre.

7. Bibliografía

Alexandre, H., Costello, P.J., Remize, F., Guzzo, J. & Guilloux-Benatier, M., (2004). *Saccharomyces cerevisiae*-*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *Int. J. Food Microbiol*; 93, pp.141-154.

Bauer, R. & Dicks, L.M.T., (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A Review, *S. Afr. J. Enol. Vitic*; 25, No. 2, pp. 74-88.

Bruyant, A. & Coradin, T., (2008). Evaluation of cationic biopolymers for the design of silica-coated alginate capsules. In *Organic/Inorganic Hybrid Materials*; Materials Research Society: Warrendale, PA,; pp 175–179.

Callone, E., Campostrini, R., Carturan, G., Cavazza, A. & Guzzon, R., (2008). Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *J. Mater. Chem*; 18, No 40, pp. 4839–4848.

Coradin, T., Nassif, N. & Livage, J., (2003). Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol*; 61, no 5–6, pp. 429–434.

Davis, C.R., Wibowo, D., Fleet, G.H. & Lee, T.H., (1988). Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *Am. J. Enol. Vitic*; 39, pp. 137-142.

Drici-Cachon, A., Guzzo, J., Cavin, F. & Diviès, C., (1996). Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid resistant mutant. *Appl. Microbiol. Biotech*; 44, pp. 785-789.

Junter, G.A. & Jouenne, T., (2004). Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome or the cart before the horse. *Biotech. Adv.*; 22, pp. 633–658.

Karel, S.F., Libicki, S.B. & Robertson, C.R., (1985). The immobilization of whole cells-engineering principles. *Chem. Eng. Sci*; 40, pp.1321–1354.

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 Sci. Technol.*; 44, pp. 2077–2086.

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

Kunkee, R.E., (1991). Some roles of malic acid in the malolactic fermentation in wine making. *FEMS Microbiol. Lett.*; 88, pp. 55-72.

Lerm, E., Engelbrecht, L. & du Toit, M., (2010). Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF, *S. Afr. J. Enol. Vitic.*; 31, No. 2, pp. 186-212.

Liu, W., Selomulya, C., Wu, W.D., Gengenbach, T.R., Williams, T. & Chen, X.D., (2013). On the formation of uniform alginate-silica microcomposites with ordered hierarchical structures. *J. Food Eng.* 119, pp. 299–307.

Liu, S.Q., (2002). A review: Malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J. Appl. Microbiol.*; 92, pp. 589-601.

Lonvaud-Funel, A., (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *A. van Leeuw.*; 76, pp. 317-331.

Maicas, S., Gil, J-V., Pardo, I. & Ferrer, S., (1999). Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. *Food Res. Int.*; 32, 491.

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. *Appl. Environ. Microbiol.*; 80, pp. 2973–2980.

Melvik, J. E. & Dornish, M., (2004). Alginate as a carrier for cell immobilisation. In *Fundamentals of Cell Immobilisation Biotechnology*; Nedović, V. A., Willaert, R., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands; pp 33–51.

Mumper, R. J.; Hoffman, A. S.; Puolakkainen, P. A.; Bouchard, L. S.; Gombotz, W. R., (1994) Calcium-alginate beads for the oral delivery of transforming growth factor-beta(1) (TGF-beta (1)) - stabilization of TGF-beta (1) by the addition of polyacrylic-acid within acid-treated beads. *J. Controlled Release*; 30, pp. 241–251.

Olguín, N., Champomier-Vergès, M., Anglade, P., Baraige, F., Cordero-Otero, R., Bordons, A., Zagorec, M. & Reguant, C., (2015). Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock. *Food Microbiol.*; 51, pp. 87–95.

Rosi, I., Fia, G. and Canuti, V., (2003). Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. *Aust. J. Grape Wine Res.*; 9, pp. 194–199.

Scott, C.D. (1987). Immobilized cells: a review of recent literature. *Enzyme Microbiol Technol.*; 9, pp. 66–73.

Segarra, I., Lao, C., LopezTamames, E. & DeLaTorreBoronat, M.C., (1995). Spectrophotometric methods for the analysis of polysaccharide levels in winemaking products. *Am. J. Enol. Vitic.*; 46, pp. 564–570

Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo J., Ruipérez V. & Rodríguez-Nogales, J.M., (2017a). Highly efficient malolactic fermentation of red wine using encapsulated bacteria in a robust biocomposite of silica-alginate, *J. Agric. Food Chem.*; 65, pp. 5188-5197.

Simó, G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo J., Ruipérez V. & Rodríguez-Nogales, J.M., (2017b). Silica-alginate encapsulated bacteria to enhance malolactic fermentation performance in stressful environment. *Au. J. Grape and Wine Res.*, pp. 1-35.

Solieri, L., Genova, F., De Paola, M. and Giudici, P., (2010) Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J. Appl. Microbiol.*; 108, pp. 285–298.

Stolarzewicz, I. Białecka-Florjańczyk, E. Majewska, E. & Krzyczkowska, J., (2011). Immobilization of yeast on polymeric supports. *Chem. Biochem. Eng. Q.*; 25, pp.135–144.

Strand, B.L., Skjåk-Bræk, G. & Gåserød, O., (2004). Microcapsule formulation and formation, in: Nedović, V.A., Willaert, R. (Eds.), *Fund. Cell Immob. Biotech.*; Springer Netherlands, pp. 165–183.

Sumby, K.M., Grbin, P.R. & Jiranek, V., (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotech.*; 98, pp. 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. *Appl. Microbiol. Biotech.*; 75, pp. 1419–1427.

Torres, L. G. Velasquez, A. & Brito-Arias, M. A., (2011). Ca-alginate spheres behavior in presence of some solvents and water-solvent mixtures. *Adv. Biosci. Biotech.*; 2, pp. 8–12.

Torriani, S., Felis, G.E. & Frachetti, F., (2011). Selection criteria and tools for malolactic starters development: an update. *An. Micro.*; vol. 61, no. 1, pp. 33-39.

Tristezza, M., Di feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G. & Grieco, F., (2016). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT - Food Sci. Tech.*; vol. 66, pp. 406-412

Ugliano, M., Genovese, A. & Moio, L., (2003). Hydrolysis of wine aroma precursors during malolactic fermentation with four commercial starter cultures of *Oenococcus oeni*. *J. Agric. Food Chem.*; 51, pp. 5073-5078.

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. *J. Chem. Tech. Biotech.*; vol. 91, no. 4, pp. 876-882.

Vila-Crespo, J., Rodríguez-Nogales, J.M., Fernández-Fernández, E. & Hernanz-Moral, M.C., (2010). Strategies for the enhancement of malolactic fermentation in the new climate conditions. *Current research, Technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*; pp. 920-929.

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. *Am. J. Enol. Vitic.*; 36, pp. 302-313.