

DESARROLLO DE UN BIORREACTOR CON BACTERIAS LÁCTICAS INMOVILIZADAS PARA DESARROLLAR LA FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA EN VINO TINTO



Universidad de Valladolid

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERIAS AGRARIAS
PALENCIA

GRADO EN ENOLOGÍA

ALUMNA: JUDIT MARCOS MARTÍNEZ

TUTOR: JOSE MANUEL RODRÍGUEZ NOGALES

Julio 2022

INDICE

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	Agentes antibacterianos: lisozima y quitosano	5
3.	OBJETIVOS.....	6
4.	MATERIAL Y MÉTODOS	6
4.1.	Inmovilización de las BAL por atrapamiento en geles de alginato-sílice.....	6
4.2.	Protocolos de la FML	6
4.2.1.	Muestras de vino.....	7
4.2.2.	Biorreactor en baño	7
4.2.3.	Biorreactor de lecho empacado con recirculación.....	7
4.2.3.1.	Estudio de estabilidad operacional del biorreactor de lecho empacado con recirculación	8
4.2.4.	Biorreactor de lecho empacado continuo	8
4.3.	Análisis fisicoquímico de las muestras	9
4.4.	Tratamiento estadístico	10
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
5.1.	Control de la FML mediante agentes antibacterianos.....	10
5.2.	FML en un biorreactor de lecho empacado con recirculación.....	11
5.3.	Estabilidad operacional del biorreactor de lecho con recirculación.....	12
5.4.	FML en biorreactor de lecho empacado en continuo	12
5.4.1.	Análisis fisicoquímico del vino	13
6.	CONCLUSIONES	14
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	16

1. RESUMEN

La fermentación maloláctica (FML) es un proceso complejo dentro de la elaboración de vinos. La composición fisicoquímica de los vinos hace de aquella un proceso más complejo, teniendo un motivo añadido, el cambio climático. Es por ello que se están realizando continuos estudios con técnicas novedosas para facilitar su desarrollo de manera óptima.

Durante este trabajo, se ha estudiado el comportamiento de las bacterias lácticas (BAL) encapsuladas en diferentes biorreactores sometidos a diferentes sistemas de fermentación. Uno de los retos de este estudio fue conseguir desarrollar un biorreactor de lecho empacado con posibilidad de realizar la FML en continuo. Para ello, previamente se evaluó la capacidad antibacteriana de la lisozima y el quitosano sobre las BAL encapsuladas en un biorreactor de baño. También se estudió el efecto de la concentración y la estabilidad operacional de las BAL encapsuladas para desarrollar la FML en un biorreactor de lecho empacado recirculado. Por último, se comprobó la eficacia de un biorreactor trabajando de manera continua. Los resultados obtenidos han sido prometedores al obtenerse una FML adecuada en un vino tinto Tempranillo con lisozima empleando un biorreactor de lecho compacto en continuo con BAL encapsuladas, siendo la composición básica del vino final similar a la obtenida en un proceso tradicional. Se han de realizar más estudios para comprobar la vida útil del biorreactor en continuo y su efecto sobre la calidad sensorial del vino.

ABSTRACT

Malolactic fermentation (MLF) is a complex process within winemaking. The physicochemical composition of the wines makes it a more complex process, having an added reason, climate change. That is why continuous studies are being carried out with innovative techniques to facilitate its development in an optimal way.

During this work, the behavior of encapsulated lactic acid bacteria (LAB) in different bioreactors subjected to different fermentation systems has been studied. One of the challenges of this study was to develop a packed bed bioreactor with the possibility of performing continuous MLF. For this, the antibacterial capacity of lysozyme and chitosan on BAL encapsulated in a bath bioreactor was previously evaluated. The effect of concentration and operational stability of encapsulated LAB to develop MLF in a recirculated packed-bed bioreactor was also studied. The results obtained have been promising by obtaining an adequate MLF in a Tempranillo red wine with lysozyme using a continuous packed bed bioreactor with encapsulated LAB, the basic composition of the final wine being similar to that obtained in a traditional process. More studies must be carried out to check the useful life of the continuous bioreactor and its effect on the sensory quality of the wine.

2. INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de elaboración del vino, la FML transcurre en muchos de los vinos para poder aportar calidad en el producto final obtenido. Las BAL que se encuentran en los mostos y luego en los vinos son las responsables de producir el ácido L-láctico a partir del ácido L-málico que se encuentra en el medio, también se produce como resultado de esta reacción CO_2 y otros metabolitos secundarios. Esta reacción es propia de los géneros de bacterias *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* y *Leuconostoc*, siendo las más abundantes en la FML *L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *Lc. mesenteroides*, *Lc. brevis*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus* y *O. oeni* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000). El metabolismo de la degradación del ácido L-málico puede venir determinado por 3 rutas: 1) transformación directa del ácido L-málico en ácido L-láctico mediante la acción de la enzima maloláctica; 2) oxidación del ácido málico en ácido oxalacético mediante la acción de la enzima malato deshidrogenasa; 3) oxidación del ácido málico en ácido pirúvico por la acción de la enzima L-lactato deshidrogenasa y seguidamente éste reducido en ácido láctico por la acción de la enzima málica. En el caso de la elaboración de vinos, la ruta más seguida es la última, mediante la acción de la enzima malato deshidrogenasa y posteriormente mediante la acción de la enzima málica, pudiendo llegar a producir modificaciones organolépticas y en la calidad de los vinos a elaborar (Hidalgo, 2011).

El papel de la FML en la calidad del vino viene determinado por (Davis *et al.*, 1985): disminución de la acidez, desciende 0,6 g/L de tartárico por 1 g/L de ácido málico consumido; mejora del perfil organoléptico del vino debido a la degradación del ácido L-málico (acidez caracterizada por el recuerdo a manzana verde) en ácido L-láctico (ácido más suave, característico de la leche); proporciona estabilidad microbiana, una FML controlada evita después la proliferación de bacterias alterantes en botella.

El inicio de la FML va a venir precedido en el mayor de los casos por la finalización de la fermentación alcohólica (FA) y la presencia de las BAL procedentes en su origen de la propia uva (Wibowo *et al.*, 1985). Como se muestra en la Figura 1, al comienzo de la FML la concentración poblacional oscila entre 10^2 y 10^6 ufc/mL durante todo el proceso. Cuando la concentración de BAL llega a 10^6 ufc/mL es cuando comienza la FML (García *et al.* 1992), después el desarrollo fermentativo va a ir determinado principalmente por la influencia de los parámetros fisicoquímicos del vino: temperatura, etanol, pH, carbohidratos, SO_2 , ácidos grasos (Dicks and Bauer, 2004). La presencia de etanol y el pH durante la FA hace que haya una disminución del número y de la variedad de BAL, con lo que al final de la FA hay una población de 10^2 ufc/mL. Al finalizar la FA comienza una fase de proliferación que se caracteriza por un crecimiento exponencial de las BAL que han sobrevivido; es entonces cuando comienza una fase de proliferación de las BAL que han sobrevivido con un crecimiento exponencial hasta alcanzar una población de 10^6 ufc/mL (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

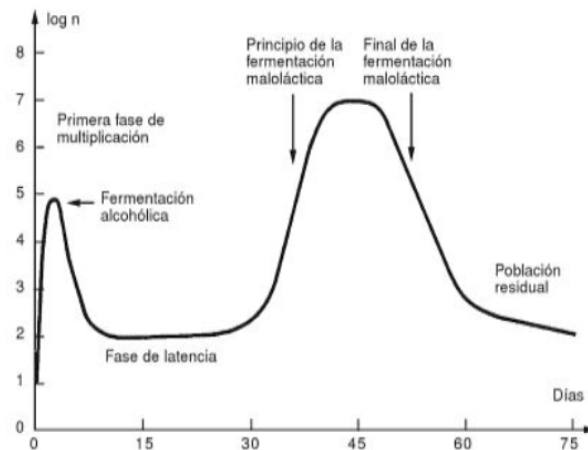


Figura 1. Evolución de la población de BAL durante la vinificación (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Dentro de la vinificación, la FML es un proceso complicado de controlar ya que el vino es un medio hostil para las BAL (Reguant *et al.*, 2010). Además, el cambio climático que se está sufriendo actualmente afecta a la composición fisicoquímica de los vinos haciendo de aquel un proceso más complejo. En concreto se produce una concentración de azúcares mucho más elevada repercutiendo así en el grado alcohólico final siendo éste perjudicial para las BAL (Vila-Crespo *et al.*, 2006). Como respuesta a este problema sería muy interesante y útil la búsqueda de técnicas que permitieran la protección de las BAL frente a estos factores.

A lo largo de la historia de la enología se han empleado diferentes técnicas de inoculación de las BAL en el vino: adición de lías sanas, adición de un volumen determinado de vino en plena FML, adición de un inóculo de BAL tanto autóctonas como seleccionadas, adición de la enzima maloláctica, utilización de levaduras con capacidad para degradar el ácido málico y utilización de bacterias inmovilizadas (Hidalgo, 2011). Se ha comprobado que la inmovilización de las BAL favorece el rendimiento de la degradación del ácido málico en condiciones desfavorables para las BAL (Rosi *et al.*, 1984). Además, también ofrece las siguientes ventajas: mejora la productividad de las fermentaciones, posibilita la realización de la FML mediante procesos continuos que pueden optimizarse, permite separar las células inmovilizadas del medio de reacción de manera sencilla y se obtiene una mayor resistencia a sustancias inhibitoras (Nedovic and Willaert, 2005).

A la hora de seleccionar la inoculación de un cultivo bacteriano típicamente es la especie *O. oeni* la elegida para llevar a cabo la FML (Couchenehy *et al.* 2005). Las principales características para realizar esta selección son las siguientes:

- Metabolismo del ácido málico: las cepas varían su capacidad para metabolizar el ácido L-málico; este proceso de degradación se realiza mediante la enzima maloláctica cuyos genes que la codifican han sido estudiados secuenciados y posteriormente clonados (Bartowsky, 2005 y 2011).
- Adaptación a la composición del vino: gracias al estudio del genoma de la bacteria se ha podido asociar un determinado gen a un aumento en el

- metabolismo del ácido málico, así como con una mejor adaptación a medios con bajo pH y escasos nutrientes (Coucheney *et al.*, 2005).
- Producción de compuestos aromáticos: dentro de la gama tan amplia de rutas metabólicas que puede seguir, es capaz de generar compuestos volátiles a altas concentraciones por encima del umbral de detección (como son acetatos, ésteres, alcoholes superiores, carbonilos, ácidos grasos volátiles y compuestos azufrados) (Swiegers *et al.*, 2005). En concreto, la degradación del ácido cítrico produce diacetilo como metabolito secundario, con un aroma y gusto a mantequilla aportando complejidad en el envejecimiento del vino. Este proceso tiene lugar gracias a la acción de las enzimas α -acetolactato sintetasa y α -acetolactato descarboxilasa. Principalmente, es *O. oeni* quien contribuye a la liberación de numerosos compuestos aromáticos tales como monoterpenos, norisoprenoides y compuestos alifáticos (Bartowsky, 2011 y 2005).
 - Toxicidad: se han localizado los genes responsables de la producción de aminas biogénicas mediante técnicas moleculares (Tonon *et al.*, 2001; Coton y Coton, 2005), lo cual hoy en día permite asegurar que los microorganismos seleccionados no pueden producir estos compuestos tóxicos.

Como se ha comentado anteriormente, una posible estrategia para mejorar la gestión de la FML es la inmovilización de *O. oeni* (Agouridis *et al.*, 2008). Su uso para la vinificación debe tener en cuenta las limitaciones que pueda tener éstas relacionadas con la calidad del producto y los costes de producción (Genisheva *et al.*, 2014). Los soportes de inmovilización utilizados para la realización de la FML en los vinos suelen ser de origen orgánico y los métodos de inmovilización de las BAL que siguen incluyen atrapamiento y la unión a materiales naturales, en la mayoría de los casos (Genisheva *et al.*, 2014).

Uno de los procesos de inmovilización más sencillo es el atrapamiento de las células vivas dentro de una red rígida que permita la difusión de sustratos y productos presentes en el medio hacia las células y también su crecimiento (Trelles *et al.*, 2013). Se han desarrollado diferentes procedimientos en los que se han usado varios polímeros tanto sintéticos como naturales para el atrapamiento eficaz de células (Berillo *et al.*, 2021). El material más empleado es el ácido algínico capaz de formar un gel en presencia de un catión divalente. Es un polisacárido obtenido a partir de algas marinas que está formado por dos monómeros: el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M). En función de la naturaleza de la que provenga el polisacárido, se distribuyen en secciones de homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-) y M-bloques (-MMM-), o heteropolímeros en los que los bloques M y G se alternan (-MGMG-), pudiendo variar así su longitud, su composición y las propiedades del gel resultante (Ramos, 2013; Lupo *et al.*, 2012).

El atrapamiento de las BAL en un gel de alginato es sencillo de preparar y económico, y las condiciones de inmovilización son respetuosas para las BAL (Vila-Crespo *et al.*, 2006), sin embargo, presenta una baja resistencia mecánica que dificulta su uso industrial (Guzzon *et al.*, 2011). Para ello, se ha desarrollado geles mixtos de alginato-sílice (ALG-Si), con mayor resistencia mecánica debido a que el componente inorgánico permite incrementar la dureza del gel (Coradin *et al.*, 2006; Simó *et al.*, 2017).

2.1. Agentes antibacterianos: lisozima y quitosano

La lisozima y el quitosano son reconocidos como agentes antibacterianos en el proceso de vinificación. El quitosano es un biopolímero policatiónico natural presente en los exoesqueletos de crustáceos y artrópodos que es capaz de retardar o inhibir el desarrollo de bacterias y hongos al interactuar con los componentes celulares presentes en la membrana y la pared celular (Bautista-Baños *et al.*, 2016). La lisozima se encuentra en muchos organismos (virus, insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) produciéndose en multitud de tejidos (huevos, leche humana, lágrimas y saliva) (Niyonsaba y Ogawa, 2005). Son enzimas antimicrobianas que poseen capacidad de hidrolizar los polisacáridos (Thallinger *et al.*, 2013) presentes en la pared celular de las bacterias, en concreto aquellas que pertenecen al grupo Gram (+) (Phillips, 1967) aunque existen estudios recientes que muestran que la lisozima también tiene la capacidad de poder hidrolizar la pared celular de hongos y levaduras (Manikandan *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017; Hernández-Téllez *et al.*, 2018).

En el proceso de vinificación, los compuestos antimicrobianos deberían ser selectivos frente a los microorganismos alterantes y no afectar a los responsables tanto de la FA como la FML. La comprobación de su eficacia debe de llevarse a cabo en mosto/vino, ya que se ha descrito que generalmente la capacidad antimicrobiana se reduce cuando se evalúa en un medio de cultivo microbiológico (Venkitanarayanan *et al.*, 1999). El empleo de agentes antibacterianos en vinificación está autorizado con el objetivo de controlar la proliferación de BAL. En concreto, la dosis máxima permitida para el uso de lisozima es de 500 mg/L y en el caso del quitosano de 100 mg/L (Resoluciones Oeno 10/97, Oeno 6/97 y Oeno 338A/09 de la OIV y Reglamentos CE 1493/1999 y 423/2008). Se ha descrito que un aporte de lisozima de 300 mg/L inhibe la actividad maloláctica de las bacterias libres en el vino tinto frente a las bacterias encapsuladas en geles mixto de alginato-sílice, en las que no afectaba para nada su actividad maloláctica (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista práctico, la lisozima es una herramienta bastante flexible ya que, dentro del proceso de elaboración, puede emplearse en diversas etapas y diferentes concentraciones en función de los objetivos buscados: control del inicio de la FML, protección del vino en caso de complicaciones durante la FA y estabilización microbiológica del vino después de la FML (Bartowsky, 2003). Estas diferentes aplicaciones, permiten que la lisozima sea una clara alternativa eficaz al dióxido de azufre para poder controlar el proceso de vinificación (Lesnierowski & Yang, 2021; Wu *et al.*, 2019). Sin embargo, debido a que la lisozima se aísla del huevo, existe la preocupación sobre las constantes reacciones alérgicas al huevo que surgen en la población, por lo que se ha propuesto la utilización del quitosano como un potencial agente antibacteriano alternativo.

En cuanto al quitosano se ha descrito que puede llegar a inactivar completamente bacterias como *O. oeni* o levaduras como *Brettanomyces bruxellensis* con una dosis de 0,2 g/L mientras que por otro lado no se encontró ninguna alteración significativa en la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* (Elmaci *et al.*, 2015). También existen estudios donde se ha podido demostrar la efectividad para reducir la actividad microbiana de algunas especies de bacterias acéticas presentes en el vino, aunque también existen evidencias de que en otras especies varía los niveles de tolerancia de la sensibilidad en función de la dosis presente de quitosano, oscilando ésta entre 0,1 y 0,2 g/L (Castro *et al.*, 2020; Valera *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio fue desarrollar un biorreactor de lecho empacado con BAL inmovilizadas eficaz para desarrollar la FML en vino tintos.

De este objetivo principal derivaron los siguientes objetivos específicos:

- Comparar la eficacia del quitosano como potencial sustituto de la lisozima para inhibir las BAL sin afectar a las encapsuladas.
- Evaluar la concentración de BAL encapsuladas más adecuada para facilitar el desarrollo de la FML en el biorreactor.
- Estudiar la capacidad de reutilización de las BAL encapsuladas en el biorreactor.
- Analizar el potencial del biorreactor para realizar una FML en continuo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Inmovilización de las BAL por atrapamiento en geles de alginato-sílice

Para la inmovilización de las BAL en un soporte mixto de ALG-Si se usó un procedimiento de coacervación mezclando los derivados de sílice con el alginato de sodio. Posteriormente, se produjo su gelificación en presencia de iones Ca^{+2} (Coradin et al., 2003). Se siguió el método propuesto por Trivedi *et al.* (2006) con mejoras aportadas por Simó *et al.* (2017, 2018).

El procedimiento comenzó con una mezcla de 0,4 mL de silicato de sodio 0,613 M en 23,98 mL de agua y 6 mL de silicato coloidal (LUDOX HS40, Sigma-Aldrich, España). En agitación constante, se ajustó el pH a 6,3, con ayuda de HCl al 37% (p/v). A continuación, se añadieron 0,4 g de BAL liofilizadas *Oenococcus oeni* (LALVIN VP 41 MBR, Lallemand), previamente rehidratadas en 8 mL de agua, y 0,8 g de alginato de sodio. Con ayuda de unas jeringuillas estériles de 10 mL y por gravedad, se hizo gotear esta mezcla sobre 1 L de disolución de CaCl_2 0,2 M. Inmediatamente tuvo lugar la formación de unas cápsulas esféricas las cuales se dejaron endurecer durante 2 h en agitación (125 rpm). Una vez transcurrido ese tiempo, se procedió a lavarlas con agua estéril. Todo este proceso se desarrolló en condiciones de esterilidad, junto con el material y reactivos previamente esterilizados en la autoclave (120°C, 20 min).

4.2. Protocolos de la FML

Durante todo el estudio, en cada ensayo, se ha usado el mismo vino tinto sin FML. Las diferencias que existen en cada ensayo residen en el tipo de inóculo empleado: BAL libres o BAL inmovilizadas. También se desarrolló una FML de manera espontánea.

Las diferentes configuraciones de biorreactores que se desarrollaron en el estudio fueron las siguientes: biorreactor de baño, biorreactor de lecho empacado con recirculación total y biorreactor de lecho empacado continuo. Además del desarrollo fermentativo, se tuvo en cuenta el estudio de la estabilidad operacional de las BAL

inmovilizadas, usando para ello dos concentraciones de ácido málico inicial y lisozima. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

4.2.1. Muestras de vino

Durante el desarrollo de este estudio, se empleó uva de la variedad Tempranillo de la vendimia del 2018 que provino de la finca de Zamadueñas del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Valladolid, España). Se procesó la uva siguiendo un protocolo clásico de elaboración de vino tinto en la ETSIIAA de la UVa y una vez acabada la FA se embotelló y conservó a -20 °C, evitando así el desarrollo de la FML espontánea.

La composición básica del vino después de la FA fue la siguiente: pH 3,8, 4,42 g/L de acidez total, 14% (v/v) de grado alcohólico y 1,8 g/L de ácido málico. En los experimentos para evaluar la estabilidad operacional (ver apdo. 4.2.3.1), se trabajó con este vino y con un segundo vino al que la concentración de ácido málico se ajustó a 3,5 g/L con ácido L-málico, modificando su acidez total a 6,32 g/L.

4.2.2. Biorreactor en baño

La FML se desarrolló en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con unos volúmenes de 150 mL vino a 22 °C, sin agitación. El vino se inoculó con una dosis de 0,063 g de *O. oeni* en estado libre o 3,3 g de *O. oeni* encapsuladas, lo cual en ambos casos equivalen a una concentración poblacional de $\sim 9 \times 10$ ufc/ml de vino. También, para descartar cualquier actividad que pudiera relacionarse con otra cepa no deseada de BAL, se decidió añadir como agentes antibacterianos lisozima (Enovin Lyso, Agrovin, España) o quitosano (Bactiless, producto compuesto por quitosano y quitín-glucano, Lallemand, Francia) a la misma dosis recomendada por los fabricantes de 0,3 g/L.

4.2.3. Biorreactor de lecho empacado con recirculación

El biorreactor de lecho empacado con recirculación estuvo formado por un depósito de vidrio con una capacidad de 150 mL, una bomba peristáltica (BQ80S bomba microperistáltica, Fluid Technology, China) y un biorreactor de 60 mL de capacidad. Sobre un banco a escala de laboratorio, se colocó un reactor tubular de poliestireno que se rellenó con una capa de 11,87 g de bolas de vidrio de 3 mm de diámetro (i), una capa de 7,87g de bolas de vidrio de 2 mm de diámetro (ii), una capa de biocápsulas de *O. oeni* (en los diferentes ensayos se emplearon 1,0, 5,0 o 10,0 g de biocápsulas, que corresponden con 0,67, 3,33 o 6,67% (g biocápsulas/100 ml de vino)) (iii) y una capa de 7,87 g bolas de vidrio de 2 mm de diámetro (ii). Estas capas de bolas de vidrio permitieron un reparto homogéneo del vino por toda la sección del reactor y limitó el movimiento de las biocápsulas. En la imagen 1 se muestra la configuración de dicho biorreactor.

El ensayo con este biorreactor se realizó en una estufa a 22°C con 150 mL de vino y con un caudal de 60 mL/h durante 12 días con un sentido ascendente del vino en la entrada del reactor. Cada 24 horas, se recogían muestras para un posterior análisis del ácido málico en cada uno de los biorreactores.

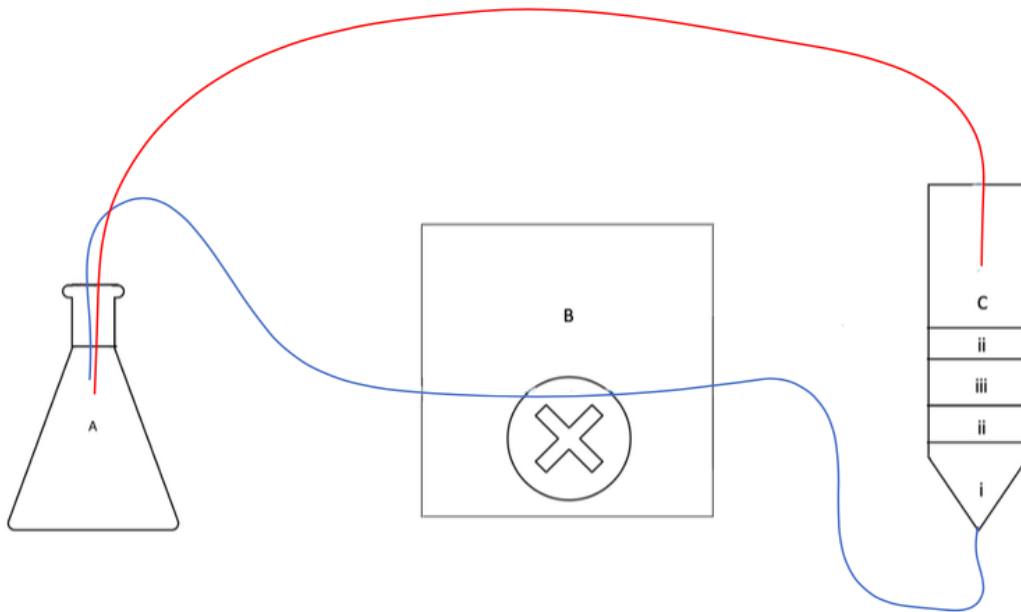


Imagen 1. Esquema del biorreactor de lecho empacado con recirculación formado por el depósito (A), la bomba peristáltica (B) y el reactor con las diferentes capas por las que está formado (C).

4.2.3.1. Estudio de estabilidad operacional del biorreactor de lecho empacado con recirculación

Se estudió la capacidad de las BAL encapsuladas para poder ser reutilizadas en un biorreactor de lecho empacado con recirculación con 7,5 g de biocápsulas, por el que pasaron secuencialmente 8 lotes de 150 mL de vino con 0,3 g/L de lisozima y a dos concentraciones de ácido L-málico (1,8 y 3,5 g/L). Se trabajó a un flujo de 60 mL/h durante 5 días a 22°C y con recirculación total del vino.

4.2.4. Biorreactor de lecho empacado continuo

En este biorreactor, se colocaron 7,5 g de biocápsulas de *O. oeni* para realizar una FML en continuo a una temperatura de 22°C. El vino empleado, 150 mL, se hizo recircular por el biorreactor durante 4 días a un caudal de 60 mL/h con recirculación. Posteriormente, se pasó a un sistema continuo con 2 depósitos, uno con el vino de origen y otro con el vino final; también se modificó el caudal pasando a ser de 0,2 mL/h durante 20 días.

Al igual que en el biorreactor de lecho con recirculación, las capas del reactor están formadas por la misma estructura, como se muestra en la imagen 2.

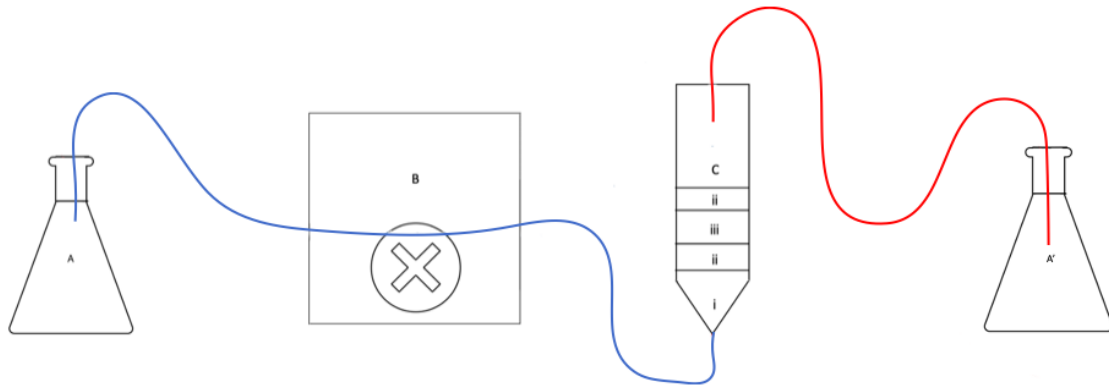


Imagen 2. Esquema del biorreactor de lecho empacado continuo formado por el depósito con el vino sin FML (A), la bomba peristáltica (B), el reactor con las diferentes capas por las que está formado (C) y el depósito final con el vino con FML realizada (A').

4.3. Análisis fisicoquímico de las muestras

El seguimiento de la FML de los distintos experimentos se realizó tomando una muestra de vino periódicamente para determinar su concentración en ácido málico. Exactamente, se recogieron alícuotas de 200 μL como muestra y posteriormente congeladas a -20° para su conservación y posterior análisis. Para la determinación de este ácido se empleó un kit enzimático (Tecnología Difusión Ibérica, España), cuyo fundamento se basa en la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato en presencia de la enzima L-malato deshidrogenasa y luego la reducción acompañada del nicotinamida-adenina-dinucleótido. De cada muestra, se realizó un análisis por triplicado en un espectrofotómetro de microplacas MultiskanTMGo (Thermo-Scientific, EE.UU.), con una longitud de onda de 340 nm.

De manera complementaria, se realizaron analíticas complementarias a los vinos elaborados con el biorreactor en continuo basadas en los siguientes fundamentos:

- pH: Se basa en la diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo de medida, sumergidos ambos en la muestra a analizar. OIV-MA-AS313-15.
- Acidez total: Es la suma de todos los ácidos, a excepción del dióxido de carbono, mediante método potenciómetro, llevando la muestra a pH 7 con una solución NaOH 0,1N. OIV-MA-AS313-01.
- Acidez volátil: Está constituida por la separación del ácido acético mediante una destilación simple gracias al método de García Tena y una posterior valoración del destilado obtenido con una disolución de NaOH 0,01N. OIV-MA-AS313-01.
- Índice de polifenoles totales: Se analizan los anillos benzoicos de los compuestos fenólicos que absorben a 280 nm. OIV-OENO-574-2017.
- Características cromáticas: Se determinó las absorbancias con longitudes de onda iguales a 420, 520 y 620 nm. OIV-MA-AS2-07B

4.4. Tratamiento estadístico

El análisis estadístico de la composición básica de los vinos se llevó a cabo mediante análisis de varianza (ANOVA). Se empleó la prueba de Tukey calculada a un nivel de confianza del 95% para determinar diferencias significativas entre muestras. En las gráficas se muestra la media y la desviación estándar de cada medida representada por una barra de error. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando IBM SPSS Statistical versión 24.0 (IBM Corp. en Armonk, Nueva York).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Control de la FML mediante agentes antibacterianos

En este estudio, se han realizado ensayos para comparar la eficacia del quitosano como inhibidor de la FML como sustituto de la lisozima de huevo, debido a la preocupación sobre las constantes reacciones alérgicas al huevo que surgen en la población. Para ello se estudió la degradación del ácido málico en un biorreactor de baño empleando BAL libres y encapsuladas en vinos con lisozima o quitosano (Figura 2). En los resultados obtenidos, se observó que en el caso de la FML dirigida por bacterias libres y en ausencia de antibacterianos, la degradación de ácido málico se produjo de manera acelerada. En el caso de las fermentaciones con BAL en estado libre y con presencia de inhibidores bacterianos, tanto con lisozima como con quitosano, la degradación de ácido málico fue más ralentizada, llegando a quedar incompleta la fermentación. Como se muestra en la Figura 2, la efectividad antibacteriana de la lisozima es mayor frente a la del quitosano, permaneciendo un 73,0% y 40,3% del ácido málico inicial sin transformar, respectivamente.

A diferencia de lo observado para las BAL libres, la FML transcurre con normalidad en los experimentos realizados con las BAL encapsuladas en presencia de los agentes antibacterianos. Los niveles de degradación de ácido málico alcanzados en ambos casos en el día 8 son muy similares a los obtenidos para la degradación de ácido málico por las bacterias libres en ausencia de agentes antibacterianos. Probablemente, el tamaño de los poros del gel de alginato-sílice es lo suficientemente pequeño como para impedir el paso de la lisozima y del quitosano al interior de las cápsulas, lo cual hace que las BAL encapsuladas estén protegidas durante todo el proceso.

Por un lado, los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones de ensayo reafirman la capacidad de la lisozima para inhibir la actividad de las bacterias libres y, por otro lado, para permitir la actividad de las bacterias encapsuladas, por lo que, se decidió emplear lisozima en las posteriores experimentaciones.

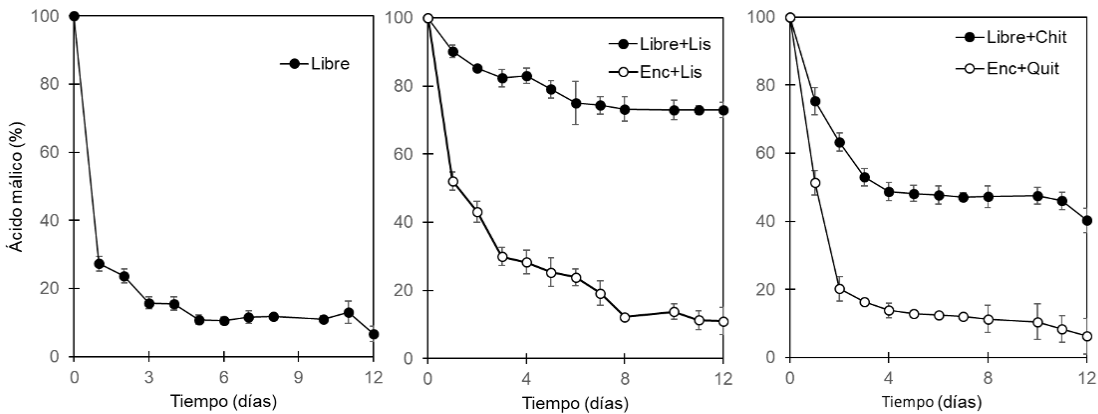


Figura 2. Evolución de la concentración de ácido málico (%) en el biorreactor en baño utilizando BAL libres (Libre) y encapsuladas (Enc) en vinos con 0,3 g/L de lisozima (Lis) y 0,3 g/L de quitosano (Quit). Condiciones de la FML: 22°C, pH 3,5, grado alcohólico de 14% (v/v) y 3,5 g/L de ácido málico inicial.

5.2. FML en un biorreactor de lecho empacado con recirculación

Para determinar la efectividad del biorreactor de lecho empacado para degradar ácido málico, se diseñó una columna como la que se muestra en la imagen 1. Se ensayaron tres dosis de BAL encapsuladas en la columna, recirculándose el volumen total del vino durante el ensayo. Como control, se realizó simultáneamente la FML en un biorreactor en baño con una dosis del 3,33% de BAL encapsuladas.

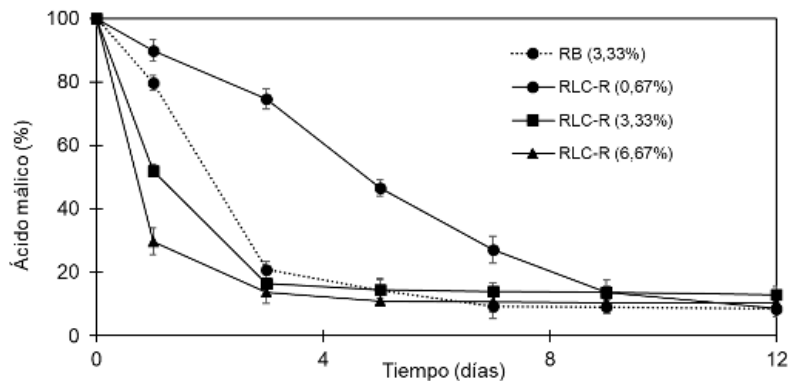


Figura 3. Evolución de la concentración de ácido málico (%) en un biorreactor de baño con un 3,33 % de BAL encapsuladas (g/100 mL de vino) y en el biorreactor de lecho empacado con recirculación total del vino con un 0,67, 3,33, 6,67 % (g/100 mL de vino) de BAL encapsuladas. Las condiciones de la FML fueron: 22°C, pH 3,5, 14% (v/v) de grado alcohólico, 3,5 g/L de ácido málico, 0,3 g/L de lisozima y caudal de recirculación de 60 mL/h.

En los resultados obtenidos se pudo observar una clara degradación del ácido málico en todos los biorreactores. El tiempo para finalizar la FML fue similar para las

dos concentraciones más altas de BAL encapsuladas, siendo superior para la concentración más baja (Figura 3). En concreto, durante los 3 primeros días, se pudo ver como la velocidad de consumo de ácido málico con 3,33% de biocápsulas fue ligeramente inferior al 6,67%. A partir del tercer día, no se observaron diferencias significativas. Una concentración del 0,67% de biocápsulas supuso un retraso en el desarrollo de la FML, alcanzando niveles similares de ácido málico a de las otras concentraciones de biocápsulas después de los 9 días. En el biorreactor de baño, también se obtuvieron resultados un poco retrasados en comparación con las columnas con 3,33% y 6,67% de biocápsulas.

5.3. Estabilidad operacional del biorreactor de lecho con recirculación

Para analizar la capacidad de reutilización de las BAL encapsuladas se empleó un biorreactor con recirculación total durante 8 ciclos de 5 días cada ciclo, sustituyéndolo en cada ciclo el vino tratado por vino sin FML. Como se muestra en la Figura 4, se obtuvo una rápida reducción del ácido málico en los 8 ciclos de FML, observándose niveles residuales de ácido málico similares al quinto día. La tasa de consumo de ácido málico es similar en el vino con ácido málico añadido y en el vino sin acidificar, logrando porcentajes de ácido málico residuales muy similares en ambos casos durante los 8 ciclos realizados. Estos resultados nos confirman una óptima estabilidad operativa de las BAL encapsuladas en un biorreactor de lecho empacado con recirculación.

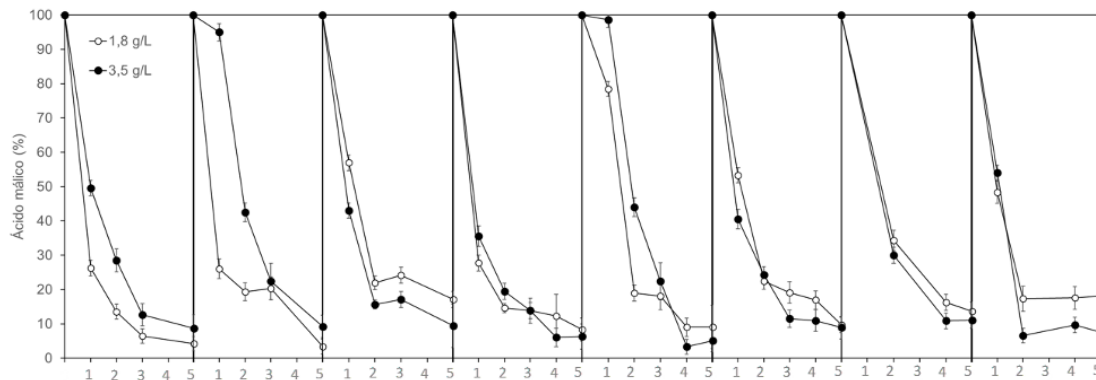


Figura 4. Evolución de la concentración del ácido málico (%) en el biorreactor de lecho empacado con recirculación durante 8 ciclos empleando vino con dos concentraciones iniciales de ácido málico diferentes (1,8 y 3,5 g/L). Condiciones de la FML: 22°C, 14% (v/v) de grado alcohólico, 0,3 g/L lisozima, 5% de BAL encapsuladas (g/100 mL), caudal de 60 mL/h, 5 días de fermentación en cada ciclo.

5.4. FML en biorreactor de lecho empacado en continuo

Una vez comprobada la capacidad y estabilidad operativa de las BAL inmovilizadas para desarrollar la FML, se quiso estudiar la posibilidad de realizar una FML en continuo. Para ello, se controló la degradación del ácido málico a la salida del biorreactor de lecho empacado introduciendo vino sin FML a la entrada del biorreactor de una manera continua. Durante los 4 primeros días se realizó una recirculación total de vino para conseguir una aclimatación y un crecimiento bacteriano suficiente, verificando así la efectividad del sistema. Posteriormente, se pasó a un sistema en continuo.

Como se muestra en la Figura 5, la velocidad de degradación del ácido málico fue muy similar tanto en el momento que había recirculación como en el momento en el que el sistema estaba en continuo; en los tres primeros días ya se alcanzaron valores de ácido málico residuales inferiores al 20%. Es a partir del sexto día cuando se estabilizan los valores de degradación del ácido málico en el sistema en continuo llegando a alcanzar una degradación de alrededor del 90%. Este consumo fue estable, sin apreciarse estancamientos o disminuciones considerables en la FML durante los 20 días de ensayo.

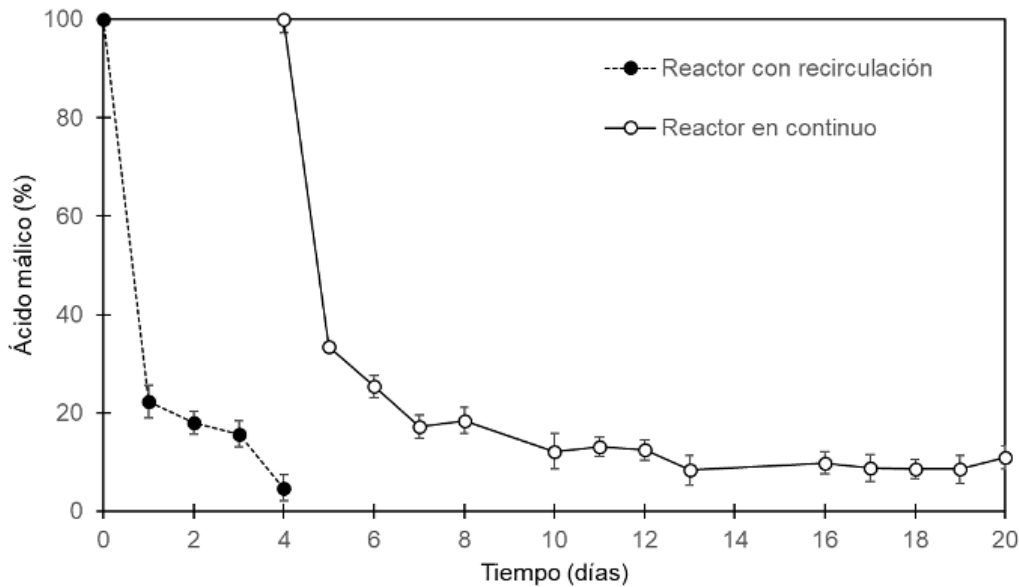


Figura 5. Evolución de la concentración de ácido málico (%) en el biorreactor de lecho empacado con recirculación y en modo continuo. Condiciones de la FML: 22°C, pH 3,5, grado alcohólico 14% (v/v), 3,5 g/L de ácido málico, 0,3 g/L de lisozima y 5% de BAL encapsuladas (g/100 mL), caudal de 60 mL/h (biorreactor con recirculación) y 2 mL/h (biorreactor en continuo).

5.4.1. Análisis fisicoquímico del vino

En la Tabla 1, se muestran la composición básica de los vinos después de la FML con recirculación a los 4 días y después en continuo a los 10 y a los 16 días del proceso. Los resultados obtenidos entre los tres vinos con FML son muy similares. Se observó una ligera reducción del índice de polifenoles totales y de la intensidad de color en los vinos después de la FML, probablemente por la adsorción de los polifenoles en la superficie de las biocápsulas (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2022). También se observó un ligero aumento en el % de amarillo y una reducción del % de rojo en los vinos después de la FML. Los parámetros de color de los vinos después de la FML no variaron independiente del biorreactor empleado (recirculado o en continuo) y del tiempo de funcionamiento del biorreactor en continuo.

Tabla 1. Composición básica de los vinos antes y después de la fermentación maloláctica (FML) utilizando un biorreactor de lecho empacado recirculado (BLC-R) a los 4 días y un biorreactor de lecho empacado continuo BLC-C a los 10 y 16 días de funcionamiento. Condiciones de la FML: 22°C, pH 3,5, grado alcohólico de 14% (v/v), 3,5 g/L de ácido málico, 0,3 g/L de lisozima y 5% de bacterias encapsuladas (g/100 mL de vino), caudal de 60 mL/h (biorreactor con recirculación) y 2 mL/h (biorreactor en continuo). Letras distintas en las medias para cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas para un $p > 0,05$.

Parámetros	Sin FML	BLC-R	BLC-C (10 días)	BLC-C (16 días)
pH	3,50±0,02 ^a	3,92±0,04 ^b	3,90±0,06 ^b	3,89±0,05 ^b
Acidez total (g/L ácido tartárico)	6,32±0,82 ^b	4,12±0,22 ^a	4,15±0,14 ^a	4,11±0,16 ^a
Acidez volátil (g/L ácido acético)	0,25±0,08 ^a	0,39±0,08 ^b	0,42±0,10 ^b	0,48±0,15 ^b
Ácido málico (g/L)	3,52±0,12 ^c	0,13±0,06 ^a	0,36±0,08 ^b	0,24±0,09 ^b
Índice de polifenoles totales (IPT)	55,4±1,8 ^b	45,4±1,2 ^a	44,9±2,3 ^a	44,1±2,21 ^a
Intensidad de color (IC)	1,64±0,02 ^b	1,34±0,08 ^a	1,35±0,03 ^a	1,38±0,10 ^a
% amarillo	32,1±0,5 ^a	34,4±0,5 ^b	34,3±0,6 ^b	34,3±0,8 ^b
% rojo	57,3±0,2 ^b	50,5±1,2 ^a	51,2±1,3 ^a	51,1±0,9 ^a
% azul	10,7±1,2 ^a	15,1±2,2 ^b	14,5±1,2 ^b	14,6±1,8 ^b

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en este estudio fueron las siguientes:

- Las biocápsulas basadas en las redes poliméricas de ALG-Si fueron capaces de mantener la actividad de las BAL encapsuladas frente a agentes antibacterianos (lisozima y quitosano).
- El desarrollo de la FML en vino tinto con *O. oeni* encapsuladas se realizó con éxito en el biorreactor de lecho empacado con recirculación, observándose un retraso en el final de la FML con la concentración más baja de BAL inmovilizadas.
- Se obtuvo una alta estabilidad operación de las BAL encapsuladas, posibilitando su reutilización al menos en 8 ciclos.

Desarrollo de un biorreactor con bacterias lácticas inmovilizadas para desarrollar la fermentación maloláctica en vino tinto.

- La FML se llevó a cabo con éxito en un biorreactor de lecho empacado continuo, observándose que no existía una disminución en la capacidad de degradación del ácido L-málico a lo largo del ensayo.
- La composición básica de los vinos fue similar entre las dos configuraciones del biorreactor de lecho empacado (con recirculación y en continuo) y a lo largo de la FML en continuo.

Estos resultados muestran que el uso del biorreactor de lecho empacado con BAL encapsuladas puede ser una alternativa adecuada para realizar la FML en continuo en presencia de lisozima, si bien, hay que realizar más estudios para determinar la vida útil del biorreactor y su incidencia en la calidad organoléptica del vino.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agouridis, N., Kopsahelis, N., Plessas, S., Koutinas, A., & Kanellaki, M. (2008). *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresource Technology*, 99(18), 9017-9020.

Bartowsky, E. (2003). Lysozyme and winemaking. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker* 31, 101-104.

Bartowsky E. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation moving into the molecular era. *Australian Journal of Grape and Wine* 11, 174-187.

Bartowsky E. J., & Borneman A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 441–447.

Bautista-Baños, S., Romanazzi, G., & Jiménez-Aparicio, A. (2016). Chitosan en la conservación de materias primas agrícolas. 1ª Edición. Ed. Prensa Académica de Elsevier, Nueva York, Estados Unidos.

Berillo, D., Al-Jwaid, A., & Caplin, J. (2021). Polymeric materials used for immobilisation of bacteria for the bioremediation of contaminants in water. *Polymers (Basel)*, 13(7), 1073.

Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (2005). *Microbiología del vino*. Ed. A. Madrid Vicente, Madrid, España.

Castro Marín, A., Colangelo, D., Lambri, M., Riponi, C., & Chinnici, F. (2020). Relevance and perspectives of the use of chitosan in winemaking: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61, 3450-3464.

Coradin, T., Mercey, E., Lisnard L., & Livage, J. (2001). Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation. *Chemical communications* 23, 2496–2497.

Coradin, T., Allouche, J., Boissière M., & Livage, J. (2006). Sol-gel biopolymer/silica nanocomposites in biotechnology. *Current Nanoscience*, 2, 1-11.

Coton E. & Coton M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 296-304.

Couchenehy F., Desroche N., Bou M., Tourdot-Maréchal R., Dalau L., & Guzzo J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International journal of food microbiology* 105, 463-470.

Davis, C. R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T. H., & Fleet, G. H. (1985). Practical implications of malolactic fermentation: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.

Dicks, L. M. T. & Bauer, R. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. A review. *South African Journal of Viticulture and Enology*, 25, 74-88.

Elmaci, S., Gulgor, G., Tokatli, M., Erten, H., Isci, A., & Ozcelik, F. (2015). Effectiveness of chitosan against wine-related microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(3), 675-686.

Genisheva, Z., Teixeira, J., & Oliveira, J. (2014). Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 40(1), 33-47.

García, M. J., Zúñiga, M., & Uruburu, F. (1992). El metabolismo y el control de las BAL en el vino. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 32 (3), 233-268.

Guzzon, R., Carturan, G., Krieger-Weber, S., & Cavazza, A. (2011). Use of organo-silica immobilized bacteria produced in a pilot scale plant to induce malolactic fermentation in wines that contain lysozyme. *Annals of Microbiology*, 62(1), 381–390.

Hidalgo, J. (2011). *Tratado de Enología*. Editorial Mundi-Prensa Libros, Madrid, España.

Hernández-Téllez, C. N., Rodríguez-Córdova, F. J., Rosas-Burgos, E. C., Cortez-Rocha, MO., Burgos-Hernández, ALizardi-Mendoza, J., Plascencia-Jatomea, M. (2018). Actividad de las nanopartículas de quitosano-lisozima sobre el crecimiento, la integridad de la membrana y la producción de β -1,3-glucanasa por *Aspergillus parasiticus*. *3 Biotech & Engineering* 7(5), 279.

Lesnierowski, G. & Yang, T. Y. (2021). Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential. *Trends in Food Science & Technology*, 107, 333-342.

Liu, S.Q. (2002). A review. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 589-601.

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.

Manikandan, M., Balasubramaniam, R., & Chun, SC. (2015). Una purificación en un solo paso de la lisozima de coliflor y su doble función contra los patógenos de plantas bacterianos y fúngicos. *Bioquímica Aplicada y Biotecnología*, 177(2), 556-566.

Nedovic, V. & Willaert, R. (2005). *Applications of Cell Immobilisation Technology*. Ed. Springer, Dordrecht, Netherlands.

Niyonsaba, F. & Ogawa, H. (2005) Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents β -defensins, cathelicidin LL37 and lysozyme. *Journal of Dermatological Science*, 40: 157-168.

Phillips, D. (1967). La molécula de lisozima de la clara de huevo de gallina. En: Simposio sobre estructura tridimensional de macromoléculas de origen biológico, 57(3), 483-495. Academia Nacional de Ciencias. Durham, Estados Unidos.

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. ACE Enología.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud-Funel, A., (2003) Tratado de de enología. Volumen I: Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Hemisferio Sur-Mundi. Buenos Aires, Argentina.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2020). Traité d'oenologie, Paris, Francia.

Rodríguez-Nogales, J., Simó, G., Pérez-Magarino, S., Cano-Mozo, E., Fernández-Fernández, E., Ruipérez, V., & Vila-Crespo, J. (2020). Evaluating the influence of simultaneous inoculation of SiO₂-alginate encapsulated bacteria and yeasts on volatiles, amino acids, biogenic amines and sensory profile of red wine with lysozyme addition. Food Chemistry, 327.

Rossi, J. & Clementi, F. (1984). L-Malic acid catabolism by polyacrylamide gel entrapped *Leuconostoc oenos*. American Journal of Enology and Viticulture, 36,100–102.

Simó G., Vila-Crespo, J., Fernández-Fernández, E., Ruipérez., & Rodríguez-Nogales, J. M. (2017). Highly efficient malolactic fermentation of red wine using encapsulated bacteria in a robust biocomposite of silica-alginate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65, 5188-5197.

Simó G., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J., Ruipérez, V., & Rodríguez-Nogales, J.M. (2019). Effect of stressful malolactic fermentation conditions on the operational and chemical stability of silica-alginate encapsulated *Oenococcus oeni*. Food Chemistry, 276, 643-651.

Swiegers J., Bartowsky E., Henschke P., & Pretorius I. (2005). Yeast and Bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 139-173.

Thallinger, B., Prasetyo, E. N., Nyanhongo, G. S., & Guebitz, G. M. (2013). Enzimas antimicrobianas: una estrategia emergente para combatir los microbios y las biopelículas microbianas. Revista de Biotecnología, 8 (1), 97-109.

Tonon, T., Bourdineaud, J. P., & Lonvaud-Funel, A. (2001). Arginine degradation by *Oenococcus oeni*: energetic and genetical aspects. Lait, 81, 139–150.

Trelles, J. A. & Rivero, C. W. (2013). Whole cell entrapment techniques. Methods in Molecular Biology, 1051, 365-374.

Valera, M. J., Sainz, F., Mas, A., & Torija, M. J. (2017). Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. International Journal of Food Microbiology, 246, 1-4.

Venkitanarayanan, K. S., Zhao, T., & Doyle, M. P. (1999). Antibacterial effect of lactoferricin B on *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. Journal of Food Protection. 62, 747-750

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.

Wu, T. T., Jiang, Q. Q., Wu, D., Hu, Y. Q., Chen, S. G., Ding, T., & Chen, J. C. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*, 274, 698-709.

Zhou, J., Zhao, S., Fang, W.H., Zhou, J.F., Zhang, J.X., Ma, H. y Li, X.C. (2017). Lisozima de tipo invertebrado recientemente identificada (*Splys-i*) en cangrejo de barro (*Scylla paramamosain*) que exhibe actividad antimicrobiana deficiente en muramidasa. *Inmunología Comparativa y Del desarrollo. Developmental & Comparative Immunology* 74, 154-166.