

## I LIEVITI IMMOBILIZZATI : ATTUALI UTILIZZI IN ENOLOGIA

Felipe RAMON PORTUGAL<sup>1</sup>, Sofia SILVA<sup>1</sup>, Patricia TAILLANDIER<sup>2</sup> et Pierre STREHAIANO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Proenol, V.N.Gaia, Portugal ; <sup>2</sup> LGC.UMR CNRS 5503, INP-ENSIACET Toulouse France

### Introduzione

Le reazioni biologiche, cioè mediate da microrganismi, possono avere luogo in due sistemi diversi :

- un sistema in cui i microrganismi sono in sospensione in una fase liquida, all'apparenza omogenea, come nel caso delle fermentazioni enologiche o nella produzione di birra ;
- un altro sistema nel quale i microrganismi non sono liberi ma appaiono fissati ad un supporto, creando in questo modo un sistema a due fasi distinte, come ad esempio nel processo di depurazione su letto batterico.

In enologia, settore molto tradizionale, il concetto di microrganismi liberi domina largamente. In altre industrie invece, si è cercato già a partire dagli anni '60 di fissare i "catalizzatori" delle reazioni biologiche con conseguente rapido sviluppo delle applicazioni industriali: batteri adsorbiti su supporto negli acetifici, dischi batterici nella depurazione ecc.

Prima di descrivere alcune applicazioni enologiche dei microrganismi immobilizzati, vogliamo ricordare qual è l'interesse di tale tipo di approccio e definire le possibilità tecniche attualmente disponibili.

Perché immobilizzare i microrganismi ?

L'immobilizzazione offre numerosi vantaggi:

- i microrganismi possono essere riutilizzati in diversi cicli di funzionamento (vedi ad esempio l'applicazione nella disacidificazione dei mosti);
- il recupero dei microrganismi al termine della fase fermentativa è semplificato (ad esempio nell'applicazione in presa di spuma);
- è possibile lavorare con una popolazione microbica molto elevata senza dovere passare per la fase di crescita cellulare, con conseguente incremento della velocità dei processi (vedi la sezione sulla cura degli arresti di fermentazione);

Come immobilizzare i microrganismi ?

L'immobilizzazione può essere realizzata in modi diversi, che in gran parte derivano dalle metodologie inizialmente proposte per gli enzimi da Chibata (1979). Si possono definire tre categorie:

- l'inclusione: le cellule vengono incorporate in un polimero rigido, tra cui il più utilizzato è l'alginato di calcio (Margaritis et Merchant, 1984). Questo processo di immobilizzazione (adattato alla realizzazione di sfere a doppio strato ed essiccate) verrà trattato più avanti nel dettaglio. Il vantaggio di questo tipo di immobilizzazione è di permettere una buona ritenzione dei microrganismi all'interno del gel;
- l'adsorbimento: la fissazione dei microrganismi è mediata da legami deboli tra la parete microbica ed il supporto (legno, mattoni ecc.). Uno dei maggiori inconvenienti di questa tecnica è il rischio di distacco delle cellule dal supporto, per esempio a seguito della loro morte;
- la ritenzione di microrganismi senza supporto. In questa tecnica ritroviamo:
  - i sistemi risultanti dall'agglomerazione spontanea (o indotta) delle cellule microbiche. Il carattere flocculento di alcuni ceppi di lievito è ad esempio sfruttato nella presa di spuma;
  - i processi che prevedono un confinamento dei microrganismi in una zona del reattore grazie ad una barriera fisica, normalmente una membrana di filtrazione. In enologia una interessante soluzione tecnica è la cartuccia "Millispark" sviluppata da Millipore per la presa di spuma con il metodo classico (Lemonnier et Duteurtre, 1989).

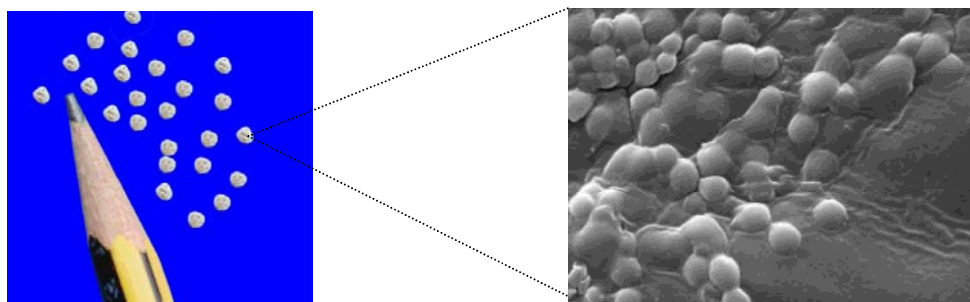
In questo articolo ci limiteremo alla presentazione dei sistemi che sono arrivati a trovare una applicazione significativa in cantina. Si tratta di lavori sperimentali condotti congiuntamente dal laboratorio UMR CNRS 5503 e dalla società Proenol Lda (Porto) da una dozzina d'anni. Le prove hanno riguardato la presa di spuma, la disacidificazione dei mosti o dei vini con *Schizosaccharomyces pombe*, il trattamento degli arresti fermentativi ed il controllo della fermentazione nei vini liquorosi.

## Produzione dei lieviti inclusi

Qualche che sia la natura del lievito (*Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*), il processo di fabbricazione delle sfere di lievito immobilizzato non varia. L'immobilizzazione dei lieviti in un gel di alginato a doppio strato viene realizzata secondo il protocollo di Tanaka et al. (1989). La biomassa di lievito viene aggiunta ad una soluzione acquosa di alginato al 4%. La miscela viene pompata nella tubazione interna di un dispositivo, contemporaneamente all'immissione nella tubazione esterna di una soluzione d'alginato sterile alla stessa concentrazione. Il flusso di alginato viene regolato in modo da formare delle gocce che cadono in una soluzione di cloruro di calcio, provocando la gelificazione dell'alginato: le sfere così ottenute sono costituite da un nocciolo interno che imprigiona i lieviti ed uno strato esterno e continuo di alginato sterile che impedisce la liberazione di cellule.

Le sfere vengono quindi parzialmente disidratate per essiccazione su letto fluido, confezionate sotto atmosfera inerte e conservate a 4°C fino al momento del loro uso, quando vengono reidratate secondo il protocollo consigliato dal produttore, che dipende dal tipo di applicazione.

Rispetto ai processi precedenti, spesso sviluppati solamente a livello di laboratorio, questo sistema offre il vantaggio di mettere a disposizione sfere secche e quindi stabili nel tempo (come nel caso dei lieviti secchi attivi), facili a manipolare ed a dosare (condizione indispensabile ad esempio per la presa di spuma).



**Figura 1.** I lieviti secchi incapsulati nell'alginato di sodio presentano una forma sferica di 2 mm di diametro (A). Fotografia al microscopio elettronico dell'interno di una sfera (B)

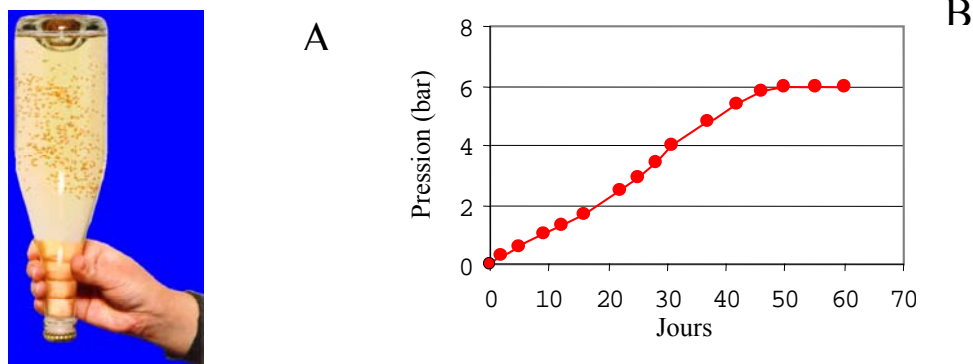
## Applicazioni in enologia

### Presenza di spuma

Una certa quantità di lieviti inclusi viene immessa direttamente nella bottiglia, in alternativa alla tradizionale coltura di lievito libero, per realizzare la seconda fermentazione. Prima dell'immissione dei lieviti inclusi, il vino base deve essere stabile dal punto di vista delle precipitazioni tartariche e filtrato sterilmente per evitare lo sviluppo di lieviti o batteri al di fuori delle sfere.

Dal momento che i lieviti inclusi (*S. cerevisiae*, preparazione commerciale, Proelif®) vengono ritenuti all'interno del supporto solido, il processo di *remuage* è realizzato in qualche secondo semplicemente capovolgendo la bottiglia (figura 2A). Il deposito rapido delle sfere di lievito può essere effettuato dopo il completo esaurimento degli zuccheri (metodo tradizionale) oppure nel momento in cui la loro concentrazione raggiunge un certo valore (metodo detto "ancestrale"); l'evoluzione degli zuccheri può essere determinata con la misura della pressione sviluppata (figura 2B). La sboccatura viene quindi effettuata come d'abitudine.

Questa applicazione è attualmente quella maggiormente sviluppata a livello industriale: la sola società Proenol ha fornito prodotto per il tiraggio di circa 8 milioni di bottiglie nel 2002. La disponibilità di lieviti inclusi in forma secca fa prevedere una buona diffusione della tecnica.



**Figura 2.** Il remuage si realizza in qualche secondo con il semplice capovolgimento della bottiglia (A). Evoluzione della pressione in bottiglia dopo inoculo di lieviti inclusi in alginato e secchi (B).

### La disacidificazione dei mosti

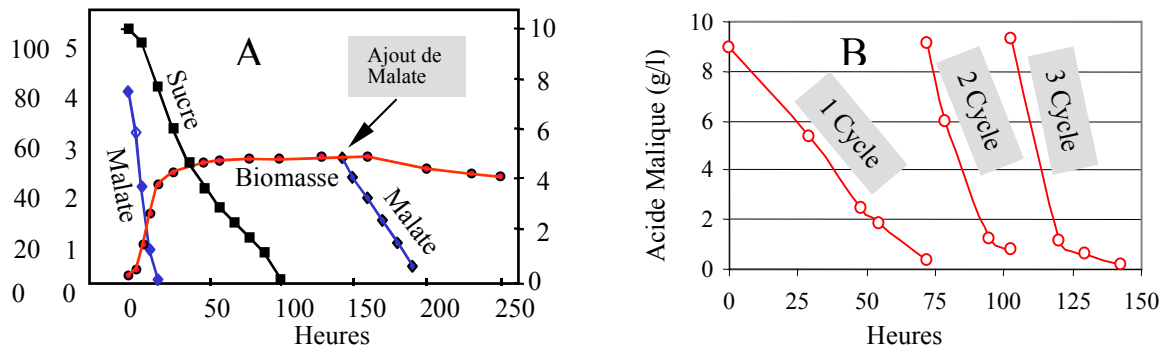
Il lievito *Schizosaccharomyces (Shz.) pombe*, che è in grado di trasformare l'acido malico in etanolo, è stato proposto come microrganismo alternativo per la fermentazione malolattica (Ciani, 1995 ; Dharmadhikari et Wilker, 1998).

Tuttavia, alcuni autori hanno sottolineato i rischi di avere vini con caratteristiche organolettiche inferiori a quelli ottenuti con le fermentazioni tradizionali, in caso di eccessiva crescita di questi lieviti (Bidan et coll., 1974). Per minimizzare questo inconveniente è possibile attuare la disacidificazione e la vinificazione in due tappe: inizialmente il mosto d'uva viene inoculato con *Shz. Pombe* e quando la degradazione dell'acido malico è giunta al livello desiderato la popolazione di *Shz. Pombe* viene eliminata dal mosto per filtrazione o pasteurizzazione. Nella seconda tappa, si inocula un ceppo commerciale di *S. cerevisiae* per effettuare la fermentazione alcolica. Questo protocollo ha dato dei buoni risultati a livello di laboratorio o di cantina sperimentale, ma si è rivelata difficile da estrapolare nelle condizioni reali di vinificazione. L'utilizzazione di *Shz pombe* (ceppo G 2. ICV) immobilizzato è stato valutato perché il loro facile e veloce allontanamento dal mezzo al termine della demalicazione parziale o totale del mosto apre nuove prospettive di applicabilità su scala reale (Magyar et Panyik, 1989 ; Taillandier et Strehaiano, 1991 ; Yokotsuka et coll., 1993).

I primi lavori condotti in laboratorio hanno messo in evidenza che questo ceppo di *Shz. pombe* era in grado di utilizzare l'acido malico anche a concentrazioni estremamente elevate (20 g/l) e che la degradazione del malico avveniva sia in fase di crescita che in fase stazionaria, con o senza simultaneo consumo degli zuccheri (Figura 3A). E' quindi possibile utilizzare la capacità demalicante di questo ceppo sia sul mosto prima della fermentazione alcolica che sul vino nei casi in cui non si produce la fermentazione malolattica.

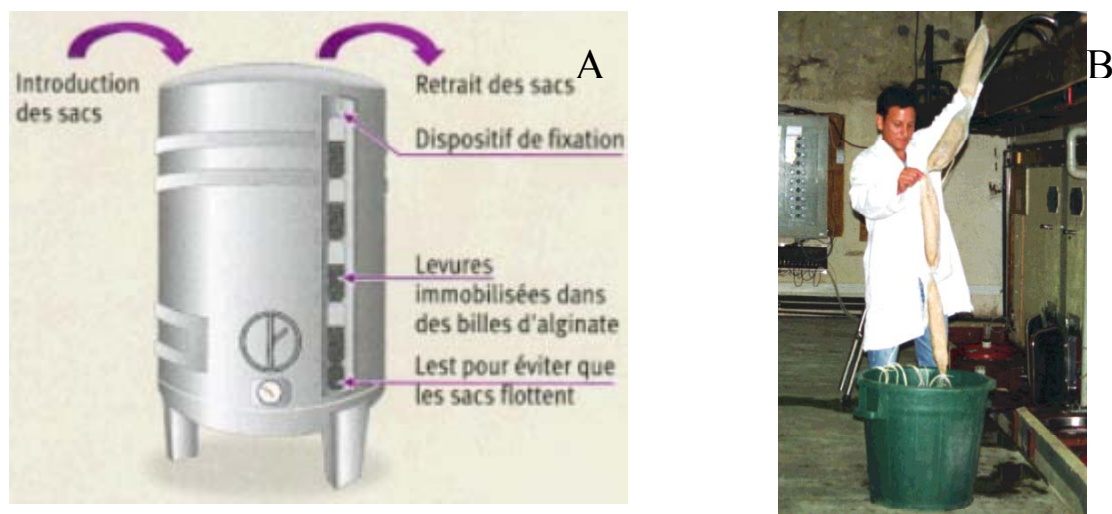
L'attività demalicante del lievito *Shz. pombe* incapsulato (Promalic®) è stato testato con una concentrazione equivalente a 5 milioni di cellule vive per millilitro di mosto d'uva. La figura 3B mostra tre cicli successivi di demalicazione effettuati in laboratorio: alla fine di ogni ciclo le sfere di *Shz pombe* sono state risciaquate e scolate prima della loro successiva utilizzazione. Durante il primo ciclo, il profilo di degradazione dell'acido malico in funzione del tempo di contatto mostra che per consumare 9 g/l di acido malico sono sufficienti 75 ore di fermentazione ad una temperatura di 20°C. A partire dal secondo ciclo, per consumare la stessa quantità di acido malico il tempo di contatto necessario diminuisce significativamente.

I test di conservazione mostrano che i lieviti immobilizzati possono essere conservati per almeno 20 mesi senza perdere l'attività demalicante.

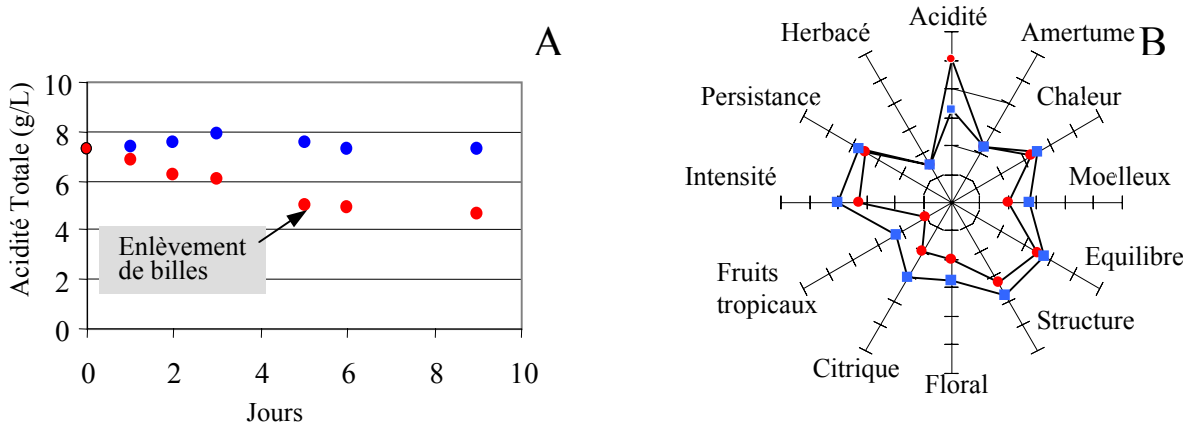


**Figura 3.** Profilo di degradazione dell'acido malico in funzione della fase di crescita e della concentrazione di zuccheri residui (A). Evoluzione nel tempo della concentrazione di acido malico residuo in tre cicli di demalicazione successivi effettuati con *Shz. pombe* inclusi (B).

Sono stati condotti anche esperimenti in condizioni reali di vinificazione su volumi di 300 e 1000 litri, su mosti bianchi e rossi, in Francia ed in Portogallo. Le sfere contenenti i lieviti sono state inizialmente messe in sacchetti di nylon che permettono la libera diffusione del mosto senza lasciare passare le sfere. (figure 4A e 4B). I sacchetti vengono introdotti, dopo riattivazione, nella vasca di fermentazione ed il consumo di acido malico viene seguita con l'analisi dell'acidità totale o del pH. Quando si giunge al livello di acidità voluta, i sacchetti vengono tolti dalla vasca e si procede con un normale inoculo di lieviti. La figura 5A mostra i risultati ottenuti nella diminuzione dell'acido malico, che in questa prova si voleva solamente parziale, a confronto con un testimone. In alcuni casi è stata registrata la presenza di difetti organolettici con l'utilizzazione di *Schizosaccharomyces* (Bidan et coll., 1974). In questa prova sono stati dosati analiticamente 9 composti volatili, senza che siano emerse differenze significative. I vini sono anche stati sottoposti ad analisi sensoriale con un test triangolare ed una valutazione dell'intensità di 12 descrittori. Il test triangolare ha messo in evidenza una differenza significativa tra i vini trattati ed i testimoni non disacidificati. In generale i vini trattati sono stati giudicati più equilibrati, più persistenti e con migliore struttura. Dal punto di vista olfattivo, i vini trattati hanno ricevuto punteggi migliori relativamente ai descrittori "floreale, citrico e tropicale". A titolo d'esempio, la figura 5B mostra i profili organolettici d'un vino bianco trattato e del rispettivo testimone: vediamo chiaramente la riduzione della percezione "acida" e l'aumento delle note sopra citate.



**Figura 4.** I lieviti incapsulati vengono messi in sacchetti di nylon la cui lunghezza è proporzionale all'altezza della vasca. Un peso è fissato all'estremità inferiore dei sacchetti – fissati alla portella della vasca - per evitarne la flottazione. (A). Prima dell'introduzione in vasca, i sacchetti contenenti le sfere vengono reidratati per 30 minuti in una soluzione a 40 g/L di saccarosio per riattivare i lieviti (B).



**Figura 5.** Evoluzione dell'acidità totale ( $H_2SO_4$ ) durante la vinificazione in bianco ed utilizzando i lieviti *Shz. pombe* incapsulati e *S. cerevisiae* liberi ● a confronto con un testimone in cui si è utilizzato solamente *S. cerevisiae* libero ● (A). Confronto tra il profilo organolettico di un vino trattato con *Shz. pombe* ■ e quello di un vino testimone ● (B).

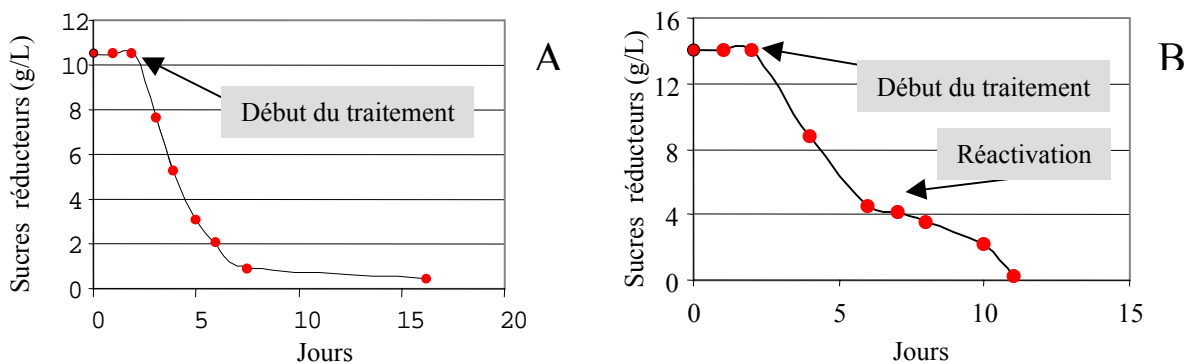
### Trattamento degli arresti di fermentazione

Quale che sia la causa dell'arresto di fermentazione (Bisson, 1999 ; Alexandre et Charpentier, 1998 ; Ribereau-Gayon, 1999), in molti casi gli interventi curativi non sono efficaci. L'impiego di microrganismi inclusi può costituire una soluzione perché permette il controllo assoluto dell'attività dei microrganismi: quantità, tempo d'azione e possibilità di riutilizzo.

Il protocollo d'applicazione (Silva et coll., 2002) consiste anzitutto nella reidratazione ed attivazione il lievito *S. cerevisiae* incluso (Prorestart®). I sacchetti contenenti le sfere vengono immersi per 3 ore in una soluzione acquosa con la seguente composizione: saccarosio 80 g/l, Fermaid (Lallemand, Canada) 0,4 g/l. Per ogni chilo di sfere occorrono 5 litri di soluzione di reidratazione/riattivazione. La successiva tappa di acclimatazione prevede l'immersione delle sfere in una miscela costituita per il 70% dalla soluzione precedente e per il 30% dal vino da trattare. La durata di questa fase è di 5 ore. Dopo essere stati scolati, i sacchetti possono essere fissati alla sommità della vasca del vino arrestato.

La figura 6A mostra l'evoluzione degli zuccheri residui dopo l'immissione dei lieviti immobilizzati in 325 hl di un Cabernet sauvignon con arresto di fermentazione. Durante il trattamento il vino è stato mantenuto a 20°C.

Possiamo osservare che appena i sacchetti sono stati immessi nella vasca è stata rilevata una immediata attività fermentativa. In questo caso la velocità di consumo degli zuccheri ha raggiunto un valore massimo di 2,8 g/l di zucchero al giorno. La velocità diminuisce progressivamente fino a raggiungere un valore minimo al 6° giorno di trattamento. La figura 6B mostra il trattamento di un vino bianco con arresto di fermentazione a 14 g/l di zuccheri.



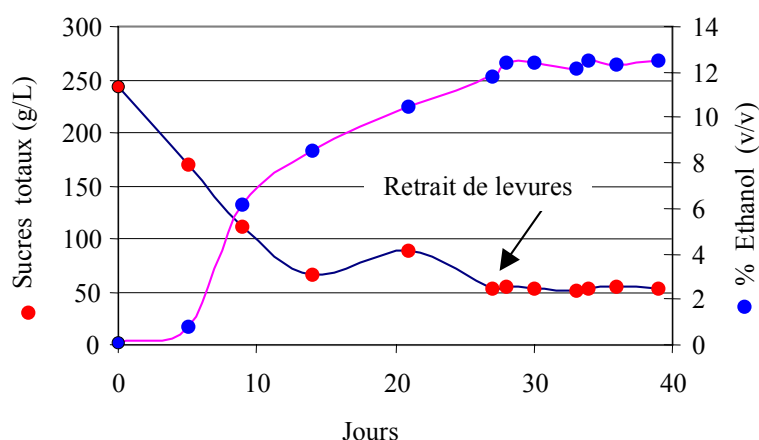
**Figura 6.** Evoluzione della concentrazione in zuccheri a seguito di un trattamento con *S. cerevisiae* incluso in alginato di 325 hl di vino rosso con arresto di fermentazione. (A). Trattamento di 22 hl di vino bianco arrestato (B).

### La produzione di vini da dessert

Il potere togliere le cellule immobilizzate ad un livello di zuccheri residui determinato offre importanti vantaggi nella produzione di vini dolci.

In effetti, nella vinificazione dei vini bianchi con elevato tenore di zuccheri residui, la fermentazione alcolica dovrà essere arrestata in un momento preciso, in funzione delle caratteristiche organolettiche desiderate, che normalmente corrisponde a 50-100 g/l di zucchero. Attualmente l'arresto della fermentazione alcolica si ottiene attraverso raffreddamento e/o travaso senza ossigenazione, oppure filtrazione e/o solfitazione. I lieviti inclusi offrono la possibilità di fermare la fermentazione nel momento desiderato senza dovere intervenire sul vino o aggiungere inibitori chimici.

Vengono presentati di seguito, a titolo d'esempio, i risultati ottenuti in condizioni reali di vinificazione di vini da dessert facendo uso di lieviti *S. cerevisiae* inclusi. La figura 7 riporta le curve d'evoluzione della concentrazione in alcool e zuccheri. La temperatura durante la fermentazione è stata misurata ma non controllata, e si è registrato un valore medio di 16°C. Al 20° giorno di fermentazione un apporto di mosto fresco ha perturbato il profilo cinetico, ma senza impedire l'avanzamento della curva di fermentazione fino ad un valore di 49 g/l di zuccheri (obiettivo dell'enologo 50 g/l). In questo momento i sacchetti sono stati tolti dalla vasca. La figura 7 mostra che successivamente il contenuto in zuccheri non ha subito variazioni, quindi che non si sono verificate attività fermentative ad opera di lieviti o batteri indigeni: nemmeno l'etanolo e l'acidità volatile hanno subito incrementi (Silva et coll., 2002). I valori di queste variabili sono restati costanti nei 15 giorni successivi all'eliminazione dei lieviti immobilizzati dal sistema.



**Figura 7.** Evoluzione del consumo degli zuccheri riduttori durante la vinificazione di un vino bianco dolce con lieviti immobilizzati *S. cerevisiae*

### Conclusioni

Gli studi condotti da più di dieci anni sui lieviti inclusi hanno portato alla messa a punto di un processo industriale di produzione di lievito immobilizzato in sfere in alginato a doppio strato allo stato secco. Ora il tecnico di cantina dispone di uno strumento efficace, stabile e semplice da utilizzare.

Le principali applicazioni dei lieviti immobilizzati riguardano la presa di spuma, la disacidificazione dei mosti con lieviti *Schizosaccharomyces* ed il trattamento curativo degli arresti di fermentazione. Un'altra interessante utilizzazione riguarda la gestione della fermentazione nei vini da dessert, per i quali esiste sempre il problema di arrestare la fermentazione al momento desiderato.

Attualmente sono in corso ricerche complementari su:

- l'applicazione dei lieviti *Schizosaccharomyces* inlusi per la disacidificazione di vini a fine fermentazione alcolica e dove non si avvia la fermentazione malolattica. Su questo soggetto sono già stati ottenuti risultati positivi a livello di laboratorio e sono in corso le esperienze di cantina
- l'inclusione di lieviti specifici per i quali si ricerca una attività parziale nel mosto, ad esempio lieviti aromatici
- l'immobilizzazione di batteri lattici
- l'immobilizzazione di enzimi specifici

## Bibliografia

1. Alexandre H. and Charpentier C., 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. J. Ind. Microbiol. Biotech., 20, 20-27.
2. Bidan P., Meyer J. P. and Schaeffer A., 1974. Bull. OIV , 47, 682-706.
3. Bisson L.F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. Am. J. Enol. Vitic., 50, 107-119.
4. Chibata I., 1979. Immobilized microbial cells. Application. In actes du Colloque SFM, 7-44.Compiègne, 8-9 mars 1979.
5. Ciani M. 1995. Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells:evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. J. Appl. Bacteriol. 79, 631-634.
6. Désert S. and Hubert L., 2002. Le dioxyde de soufre est il irremplaçable ? Rev. Des Œnologues. 102, 35-36.
7. Dharmadhikari M. R. and Wilker K. L., 1998. Deacidification of high malate must with *Schizosaccharomyces pombe*. Am. J. Enol. Vitic. 49, 408-412.
8. Lemonnier J. and Duteurtre B., 1989. Un progrès important pour le champagne et les vins de méthode traditionnelle. Rev. Fr. Oenol., 121, 15-26.
9. Magyar I. and Panyik I., 1989. Biological deacidification of wine with *Schizosaccharomyces pombe* entrapped in Ca-alginate gel. Am. J. Enol. Vitic., 40, 233-240.
10. Margaritis A. and Merchant F.J.A., 1984. Advance in ethanol production using immobilized cell systems. CRC Crit. Rev. Biotechnol., 1, 4, 339-393.
11. Ors P., Duteurtre B. and Hennequin D., 1990. In Actualités œnologiques 89, 270-74. Dunod. Paris.
12. Ribereau-Gayon P. 1999. Réflexions sur les causes et les conséquences des arrêts de la fermentation alcoolique en vinification. J. Int. Sci. Vigne Vin, 33, 39-48.
13. Silva S., Ramón-Portugal F., Silva P., Teixeira M. F. and Strehaiano, P., 2002. J. Int. Sci. Vigne Vin., 36, 161-167.
14. Taillandier, P., and P. Strehaiano. 1991. The role of malic acid in the metabolism of *Schizosaccharomyces pombe*: substrate consumption and cell growth. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35, 541-543.
15. Taillandier P., Riba J. P. and Strehaiano P. 1991. Malate degradation by *Schizosaccharomyces* yeasts included in alginate beads. Bioprocess Eng., 7, 141-144.
16. Tanaka H., Irie S. and Ochi H.,1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. J. Ferment. Bioeng. 68, 216-219.
17. Yokotsuka K., Otari A., Naitoh A., and Tanaka H. 1993. Controlled simultaneous deacidification and alcohol fermentation of a high-acid grape must using two immobilized yeast, *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Am. J. Enol. Vitic., 44, 371-371.
18. Yokotsuka K., Yajima M., and Matsudo T., 1997. Production of Bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. Am. J. Enol. Vitic., 48, 471-481.