

FERMENTAZIONI ALCOLICHE E MALOLATTICHE IN SIMULTANEA OPERATE DA CELLULE DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE E OENOCOCCUS OENI CO-IMMOBILIZZATE IN SFERE DI ALGINATO

Maria Tufariello, Gianluca Bleve, Cosimo Vetrano, Giovanni Mita, Francesco Grieco

Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Unità Operativa di Lecce, Lecce, Italy
francesco.grieco@ispa.cnr.it

Introduzione

I lieviti sono i microrganismi responsabili della fermentazione alcolica (FA), mentre i batteri lattici sono in grado di eseguire la fermentazione malolattica (FML) durante il processo di vinificazione (Diviès e Cachon, 2005). Oggi, sono disponibili sul mercato numerosi ceppi di lievito starter selezionati per le loro proprietà fermentative, in grado di produrre vini dalle caratteristiche aromatiche e sensoriali desiderate (Romano et al., 2003). La FML è un processo secondario che può verificarsi spontaneamente diverse settimane dopo l'FA durante la maturazione dei vini giovani. La FML è molto importante per migliorare le caratteristiche organolettiche dei vini, grazie al suo contributo nel conferire complessità e stabilità biologica del vino, riducendone l'acidità e contribuendo alla composizione del profilo aromatico del prodotto finito. Questo bioprocesso è generalmente imprevedibile e molto lento (può richiedere diverse settimane e persino mesi). Sebbene esistano in commercio starter selezionati anche per la FML, il loro uso non garantisce lo svolgimento del processo, soprattutto a causa delle condizioni sfavorevoli per la crescita batterica rappresentate dall'ambiente "vino" (Herrero et al., 2003).

Negli ultimi anni, è stato rilevato un crescente interesse nell'uso di cellule immobilizzate per processi di fermentazione, come la produzione di birra (Masschelein et al., 1994), sidro (Nedovic et al., 2000), vino spumante (Yokotsuka et al., 1997). Rispetto al sistema tradizionale in cui si inoculano cellule in forma libera, queste strategie offrono numerosi vantaggi tecnici ed economici (Nedović et al., 2011). Tra i diversi sistemi di immobilizzazione studiati per la fermentazione del vino, esistono quelli basati sull'impiego di alginato di calcio, materiali cellulósici, cellulosa DEAE (Kourkoutas et al., 2004; Kosseva e Kennedy, 2004; Agouridis et al., 2008), insieme a materiali amidacei, vinacce, patate, frutta, zucchero di canna e pezzi di sughero (Nedovic et al., 2015).

Gli approcci di immobilizzazione possono però influenzare il metabolismo dei lieviti e dei batteri provocando effetti su qualità, aroma e gusto del vino. È stato anche dimostrato che questi sistemi possono migliorare la produttività di FA e FML e l'efficienza del processo, dal momento che l'immobilizzazione può facilitare il controllo del processo e produrre un'accelerazione di quest'ultima (Melzoch et al., 1994; Sipsas et al., 2009). I sistemi di immobilizzazione offrono anche il vantaggio di poter riutilizzare gli agenti che fungono da biocatalizzatori per diverse volte senza perdita di attività fermentativa, di eseguire processi continui e di ridurre i costi di capitale riducendo i volumi dei bioreattori (Pilkington et al., 1998; Bleve et al., 2011; 2016). Questo approccio offre anche l'opportunità di co-immobilizzare diversi tipi di microrganismi all'interno di matrici porose, consentendo il completamento delle due fasi di fermentazione in un unico sistema integrato.

Questo studio documenta la co-immobilizzazione in sfere di calcio alginato di due ceppi commerciali di *S. cerevisiae* e di *O. oeni*. I risultati ottenuti con questo approccio sono stati studiati comparandoli al sistema tradizionale di inoculo dei mosti effettuato utilizzando cellule in forma libera.

Materiali e metodi

Lievito, ceppi batterici e terreni

I ceppi di *Oenococcus oeni* VP41™ e di *Saccharomyces cerevisiae* ICV-D254 (Lallemand, Italia) sono stati cresciuti come descritto da Tristezza et al. (2015). Le conte microbiche di batteri e lieviti

sono state effettuate utilizzando i terreni MRS agar (Sigma-Aldrich, USA; addizionato di 100 mg/L cicloesimmide) e YPD agar (Sigma-Aldrich, USA; addizionato di 50 mg/L ampicillina).

Immobilizzazione dei microrganismi in sfere di Ca-alginato

Le cellule di *S. cerevisiae* ed *O. oeni* sono state coltivate come descritto (Tristezza et al., 2015) e quando la torbidità della coltura ha raggiunto la densità ottica richiesta ($600\text{ nm} = 0.8$) le cellule sono state raccolte, lavate con acqua e quindi sospese in una soluzione di 3% Na-alginato (Sigma-Aldrich, USA), ciascuna alla concentrazione finale di 10^6 CFU/ml (Bleve et al., 2008). Le sfere (circa 3 mm di diametro; Figura 1) sono state prodotte mediante gocciolamento della suddetta miscela in una soluzione di 0.1 M CaCl_2 . Dopo incubazione di 4 ore a 4°C , le sfere sono state quindi lavate con soluzione salina, e inoculate in 250 ml di mosto sterilizzato a temperatura ambiente. La fuoriuscita di cellule dalla matrice di Ca-alginato (*leaking*) è stata periodicamente valutata mediante conta dopo applicazione di un volume di fermentato su piastre contenenti l'opportuno terreno agarizzato (Tristezza et al., 2015). Le osservazioni al microscopio elettronico a scansione sono state effettuate come descritto da Poreda et al. (2013).

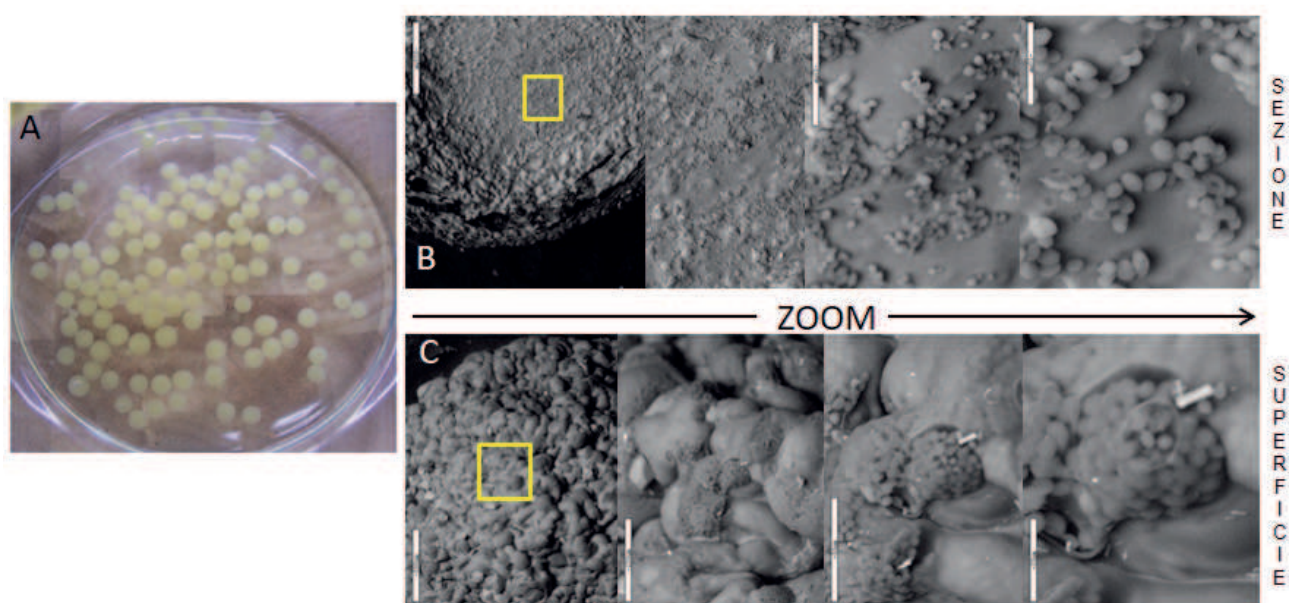


Figura 1. Fotografia delle sfere di calcio alginato contenenti la miscela di lieviti e batteri (A). Visualizzazione mediante microscopia elettronica a scansione di una sezione (B) e della superficie (C) delle sfere di calcio alginato contenenti la miscela di lieviti e batteri. L'area delimitata in giallo (ingrandimento $500\mu\text{m}$) è stata visualizzata con effetto "zoom" a 100, 50 e $20\mu\text{m}$.

Saggi di micro-fermentazione

Saggi di micro-fermentazione sono stati condotti in mosto d'uva Negroamaro (zuccheri riducenti 213.94 g/L , pH 3.32, APA 115.76 g/L). Il mosto è sottoposto ad una prima filtrazione con garza e poi con filtro a membrana da $0.22\text{ }\mu\text{m}$. Dopo aggiunta di 40 mg/L di metabisolfito di potassio, 1000 mL di mosto sono stati posti in una beuta Erlenmeyer sterile e quindi inoculati con lievito e batteri in forma libera (ciascuno alla concentrazione finale di 10^6 CFU/ml) o immobilizzata (con un volume di sfere equivalente contenente 5×10^8 CFU/ml di ciascuno dei due microrganismi). Il processo fermentativo è stato effettuato a 25°C e i campioni sono stati sottoposti ad analisi gravimetrica giornaliera. La FML è stata monitorata a intervalli di tempo determinando la concentrazione residua di acido L-malico utilizzando un kit enzimatico (Roche, Svizzera). Ogni esperimento di fermentazione è stato condotto in triplicato. Un'aliquota di mosto fermentato (100 mL) è stata conservata a -20°C , mentre il vino rimanente è stato utilizzato per l'analisi sensoriale.

Analisi chimica del vino e della sua componente volatile

I parametri generali del vino (contenuto alcolico, zuccheri residui, pH, acidità titolabile e volatile, acido tartarico, acido citrico, glicerolo e biossido di zolfo totale) sono stati determinati utilizzando lo strumento WineScan FT120 (Foss, Danimarca). L'estrazione di composti volatili è stata effettuata

con una procedura di estrazione in fase solida (SPE) come descritto da Tufariello et al. (2014). Un campione del volume di 1 µl è stato iniettato nel gascromatografo serie 6890N (Agilent Technologies, USA) con un rivelatore selettivo Spettrometro di massa (MSD) 5973 e dotato di una colonna capillare DB-WAX (Agilent Technologies, USA) seguendo la procedura precedentemente descritta (Tufariello et al., 2014). L'identificazione dei composti volatili è stata ottenuta confrontando spettri di massa con quelli della libreria del sistema dati (NIST 98, P > 90%), con i dati di ritenzione degli standard disponibili in commercio e dei dati MS riportati in letteratura. La quantificazione è stata effettuata seguendo il metodo di quantificazione dello standard interno.

Valore di attività degli odori

Il contributo specifico di ciascun composto aromatico all'aroma del vino è stato determinato calcolando il valore di attività degli odori (OAV) come rapporto tra la concentrazione di ciascun composto e la sua concentrazione soglia di percezione (Francis & Newton, 2005). Un profilo di odore per ciascun vino prodotto è stato ottenuto raggruppando i composti volatili, mediante un descrittore simile, in specifiche serie aromatiche. Il valore di ciascuna serie aromatica è stato ottenuto aggiungendo gli OAV dei composti che formano una tale serie. Pertanto, è possibile determinare il contributo di un composto specifico a ciascuna serie. Questa procedura consente di mettere in relazione le informazioni quantitative ottenute con l'analisi chimica (GC-MS) con la percezione sensoriale, fornendo un'impronta sensoriale ibrida (Capone et al., 2013).

Analisi statistica

L'analisi statistica dei parametri generali del vino e le concentrazioni volatili del vino sono state eseguite utilizzando un'analisi della varianza (ANOVA) per determinare valori statisticamente diversi a un livello di significatività di α o $P \leq 0,05$. Il confronto delle classi volatili di composti durante le fermentazioni è stato ottenuto mediante analisi delle componenti principali (PCA). Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma STATISTICA 7.0. (StatSoft software package, USA).

Risultati

Test di microfermentazione

Il piano sperimentale ha previsto cinque differenti test basati su diverse combinazioni di inoculi:

- a) sfere contenenti in forma co-immobilizzata cellule di *S. cerevisiae* e *O. oeni*, corrispondenti a un inoculo equivalente a 10^6 CFU/ml di *O. oeni* e 10^6 CFU/ml di *S. cerevisiae* (campione C1);
- b) un inoculo simultaneo di sfere contenenti cellule di *S. cerevisiae* e *O. oeni* immobilizzate in forma separata, corrispondenti a un inoculo equivalente a 10^6 CFU/ml di *O. oeni* o di *S. cerevisiae* (campione C2);
- c) un inoculo simultaneo di 10^6 CFU/ml di *S. cerevisiae* libero e 10^6 CFU/ml di cellule di *O. oeni* (campione C3);
- d) un inoculo di cellule in forma libera di 10^6 CFU/ml di *S. cerevisiae*, seguite, alla fine della FA, da un inoculo equivalente a 10^6 CFU/ml di cellule in forma libera di *O. oeni* (campione C4);
- e) un inoculo di cellule in forma libera di 10^6 CFU / ml di *S. cerevisiae* (campione C5);

Per entrambe le strategie di immobilizzazione, ovvero *S. cerevisiae* e *O. oeni* co-immobilizzati (campione C1) e co-inoculo di sfere contenenti unicamente *S. cerevisiae* o *O. oeni* (campione C2), i processi di FA e FML sono avvenuti contemporaneamente, con una diminuzione significativa del tempo richiesto per completare l'FA e la FML. Infatti, il processo è stato portato a termine in circa dieci giorni per entrambe le strategie di co-inoculo (Figura 2).

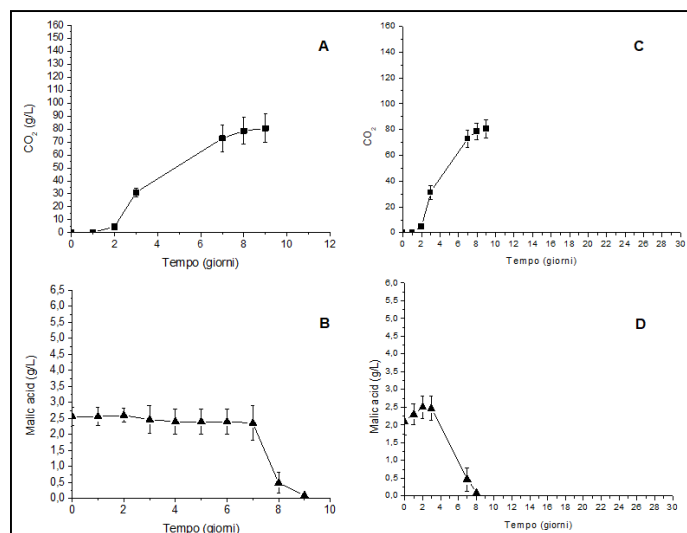


Figura 2. Produzione rispettivamente di CO₂ e consumo dell'acido malico in fermentazioni effettuate mediante inoculo di mosto con sfere di calcio alginato contenenti la miscela di lieviti e batteri malolattici (Tesi C1; A e B) ed in fermentazioni effettuate mediante inoculo di mosto con una miscela di sfere di alginato separatamente contenenti i lieviti e i batteri malolattici (Tesi C2; C e D)

La fuoriuscita di cellule batteriche e di lievito dalle sfere si risultata essere irrilevante per entrambe le strategie di immobilizzazione (non mostrato). La strategia di co-inoculo dello starter misto *S. cerevisiae* /*O. oeni* in forma libera (campione C3) ha permesso di completare FA e FML in circa 18 giorni. In termini di tempo, questi approcci hanno prodotto un comportamento intermedio tra l'evoluzione della fermentazione osservata dei due campioni che impiegavano cellule immobilizzate di *S. cerevisiae* e *O. oeni* (C1 e C2) e il tradizionale sistema di inoculo sequenziale che utilizzava cellule in forma libera (C4) Infatti, le fermentazioni condotte seguendo la strategia tradizionale di inoculo sequenziale (C4), sono state portate a termine dopo un periodo totale di circa 30 giorni (Figura 3).

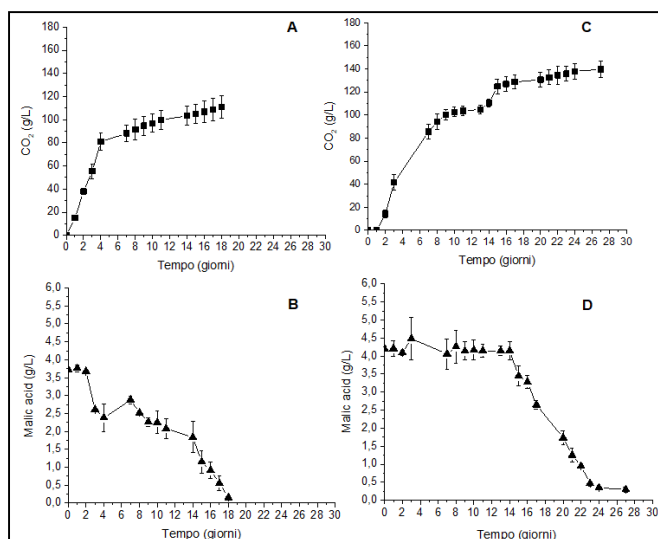


Figura 3. Produzione rispettivamente di CO₂ e consumo dell'acido malico in fermentazioni inoculate con lieviti e batteri in forma libera in modo simultaneo (Tesi C3; A e B) e sequenziale (Tesi C4; C e D)

Inoltre, le cellule co-immobilizzate di *S. cerevisiae* e *O. oeni* (campione C1) sono state riutilizzate efficientemente per la fermentazione del mosto almeno altre due volte senza alcuna apparente perdita di attività metabolica cellulare e vitalità cellulare da parte di entrambi gli starter utilizzati (Figura 4).

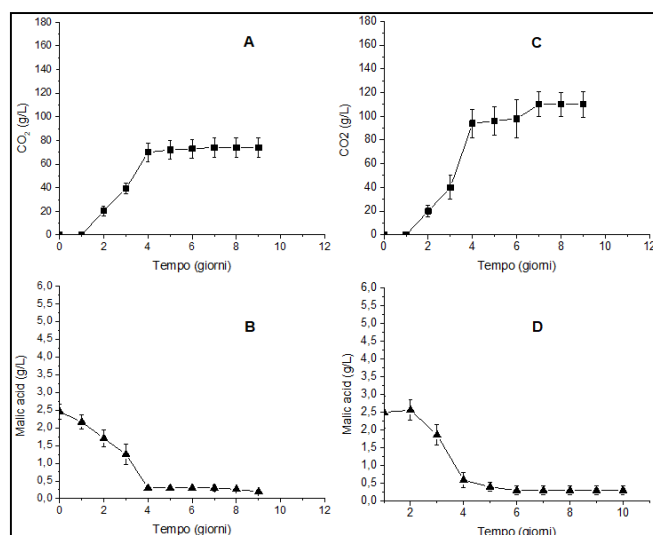


Figura 4. Cicli di fermentazione di mosto da uve Negroamaro inoculate con la miscela lieviti e batteri co-immobilizzata in sfere di alginato (campione C1). Al termine dei processi fermentativi, il vino è stato rimosso e sottoposto a test di qualità. Le sfere sono state raccolte e, dopo un lavaggio con soluzione salina sterile (NaCl 0,9%) utilizzate per un altro ciclo di fermentazione. La produzione di CO₂ e consumo dell'acido malico sono rispettivamente mostrati per il secondo (A e B) ed il terzo (C e D) ciclo di utilizzo.

Analisi chimica dei vini

Le analisi dei principali composti chimici prodotti durante la fermentazione del mosto hanno confermato che gli starter utilizzati sono stati in grado di completare i processi di fermentazione di FA e FML per tutte le strategie di inoculo testate (Tabella 1).

Tabella 1

	C1	C2	C3	C4	C5
Etanolo (% vol)	12.70 ± 0.12	12.20 ± 0.62	11.94 ± 0.50	11.50 ± 0.65	11.51 ± 0.67
Zuccheri	1.40 ± 0.50	1.20 ± 0.48	1.85 ± 0.23	1.73 ± 0.11	1.82 ± 0.20
Acidità totale	4.42 ± 0.26	4.17 ± 1.10	4.60 ± 0.12	4.71 ± 2.10	5.40 ± 0.58
Acidità volatile	0.38 ± 0.03	0.36 ± 0.05	0.31 ± 0.08	0.38 ± 0.04	0.33 ± 0.06
pH	3.57 ± 0.71	3.56 ± 0.72	3.60 ± 0.14	3.53 ± 0.25	3.42 ± 0.61
Acido Lattico	2.30 ± 0.32	2.42 ± 0.25	2.22 ± 0.53	2.32 ± 0.33	ND
Acido malico	ND	ND	0.27 ± 0.03	0.18 ± 0.02	3.20 ± 0.2
Acido tartarico	1.49 ± 0.57	1.51 ± 0.32	1.07 ± 0.05	1.35 ± 0.14	1.31 ± 0.25
Acido citrico	0.16 ± 0.04	0.16 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.3 ± 0.09
Glicerolo	7.43 ± 0.92	7.86 ± 1.02	7.28 ± 0.13	7.58 ± 1.05	7.78 ± 2.16
Intensità	1.31	1.35	1.40	1.42	1.39
Tonalità	0.61	0.63	0.65	0.66	0.58

In particolare, il contenuto di etanolo nei campioni di mosto fermentato ottenuti impiegando sfere contenenti *S. cerevisiae* e *O. oeni* co-immobilizzati (C1; 12.70 % vol) o co-inoculando la miscela sfere contenenti singolarmente lieviti o batteri (C2; 12.20 % vol) si è dimostrato il più elevato in confronto con quello determinato nelle altre fermentazioni (Tabella 1). L'immobilizzazione dei due starter in alginato e il loro uso in co-inoculo o in approcci sequenziali di inoculo non ha influenzato la concentrazione finale di acido acetico nei vini prodotti. (Tabella 1). Tutte le fermentazioni hanno prodotto vini con simili valori di pH e concentrazioni finali di acido citrico e tartarico. L'utilizzo dei microrganismi immobilizzati nelle sfere di alginato non ha influenzato significativamente intensità e tonalità colorante del vino prodotto (Tabella 1).

Analisi della componente volatile dei vini

I dati quantitativi relativi le principali famiglie di composti volatili trovati nei vini sono mostrati in Figura 5.

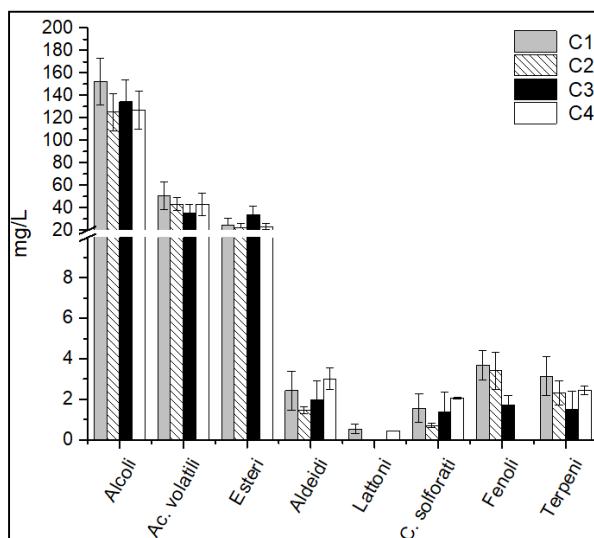


Figura 5. Composizione volatile de vini ottenuti in condizioni di micro-vinificazione mediante inoculazione di sfere di alginato contenenti la miscela di lieviti e batteri (C1);una miscela di sfere di alginato contenenti separatamente lieviti o batteri (C2); cellule in stato libero in inoculazione simultanea (C3) o sequenziale (C4). Le barre di errore indicano la deviazione standard.

L'analisi dei vini effettuata mediante gascromatografia-spettrometria di massa ha consentito l'identificazione e la quantificazione di trentanove composti volatili. Le classi di composti identificati corrispondono ad alcoli, acidi grassi volatili, esteri, mentre aldeidi, terpeni, composti di zolfo, lattoni, fenoli volatili e pirazina erano presenti in basse concentrazioni. I prodotti del metabolismo dei lieviti erano le sostanze più abbondanti. Infatti, gli alcoli sono quantitativamente il gruppo più rappresentativo di composti volatili ed erano presenti in quantità maggiori nei campioni C1 e C4 senza alcuna differenza statisticamente significativa tra questi campioni. Le più alte concentrazioni sono state osservate per gli alcoli isoamilici alcoli superiori, alcool fenilico etilico e 2-metil-1-propanolo. L'alcool feniletilico, composto chiave negli aromi floreali dei vini, è stato il secondo alcol più abbondante in concentrazione più elevata in vini prodotti nel test C1 e C4. In tutti i campioni fermentati, gli isoamil-alcoli e l'alcool fenilico etilico, i più importanti composti volatili, sono stati rilevati in concentrazioni superiori alla soglia di percezione, producendo un impatto positivo nell'aroma del vino.

L'acido acetico è stato l'acido più abbondante, ma comunque in concentrazioni inferiori alla sua soglia di percezione (200 mg/L), seguita poi da acido ottanoico e acido esanoico. Gli esteri etilici di acidi grassi e acetati sono stati il secondo gruppo, in termini di numero complessivo di diversi componenti (11) identificati, tra i composti volatili rilevati nei 5 vini prodotti. Butanoato di etile, esanoato di etile, ottanoato di etile e decanoato di etile, isoamilacetato e fenilacetato hanno superato la soglia di percezione in tutti i vini e in concentrazioni tali da poter influenzare l'aroma dei vini prodotti (Tabella 2). Sono stati identificati otto diversi acidi grassi volatili e questi composti hanno mostrato le più alte concentrazioni nel campione C1. Tra gli acidi grassi, prodotti anche durante la fermentazione, gli acidi butanoico, 3-metil butanoico, esanoico, ottanoico, decanoico e benzoico sono stati quantificati in concentrazioni superiori alla soglia di percezione, contribuendo con note di frutta e di grasso sul profilo aromatico del vino. Anche tra i terpeni, che partecipano fortemente nella definizione dell'aroma varietale, il 2,6-dimetil-7-ottene 2,6 diolo è stato identificato in tutti i vini con un OAV > 1. Questi risultati hanno confermato che *S. cerevisiae* e *O. oeni* in forma immobilizzati sono stati in grado di produrre vini caratterizzati da profili volatili simili a quelli ottenuti usando la tradizionale strategia di inoculo sequenziale.

Profilo sensoriale dei vini

I composti odorosi aventi descrittori sensoriali simili, rilevati in tutti i vini analizzati, sono stati raggruppati in classi dette serie aromatiche. A tale riguardo, per la descrizione dell'aroma dei vini sono state scelte le seguenti serie aromatiche: solvente (*solvent*), floreale (*floral*), dolce (*sweet*), erbaceo (*green*), grasso (*fatty*), fruttato (*fruity*) e speziato (*spicy*). La Figura 6 riporta la rappresentazione del grafico radar della serie di descrittori associati ai campioni di vino C1, C2 e C6.

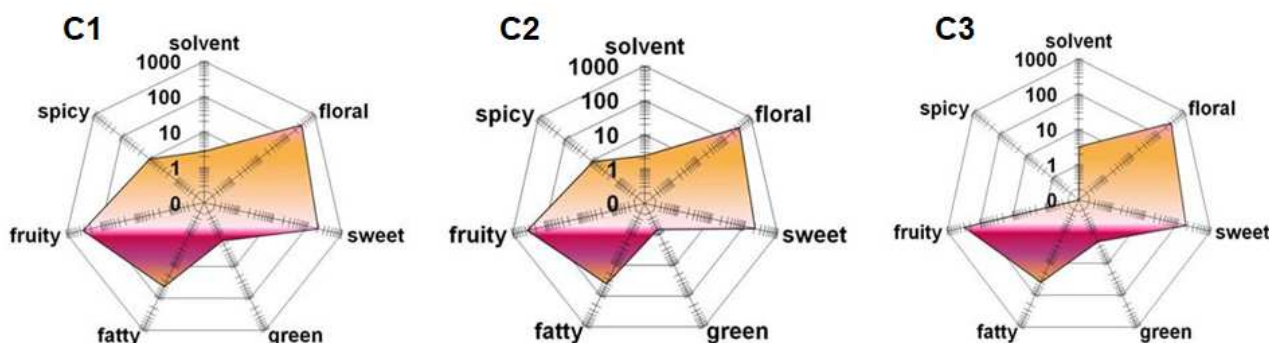


Figura 6: Profilo chimico degli odori dei vini. Radar plot dei descrittori sensoriali associate alle concentrazioni totali delle classi di volatile associate al vino Negroamaro ottenuto dopo inoculo con la miscela di lieviti e batteri co-immobilizzati in sfere di alginato (C1), la miscela di sfere di alginato separatamente contenenti lieviti o batteri (C2); coinoculo di cellule libere di *S. cerevisiae* e di *O. oeni* (C3).

Il campione di vino C1, prodotto dalla strategia di co-immobilizzazione dei lieviti e dei batteri, è risultato più complesso e ricco dal punto di vista sensoriale rispetto a quello derivante dalla strategia di coinoculo dei due starter in forma libera (campione C3). In particolare, la strategia di co-immobilizzazione (campioni C1) ha permesso di produrre un vino che mostrava note floreali (terpeni, fenil etil alcol, esteri), dolci (isoamil acetato, etil ottanoato, etil decanoato, butirrolattone), grasse (acidi) e fruttate (isoamil alcoli, esteri e terpeni) analoghe a quelle identificate nel campione di vino C2 e C3 (Figura 6), i campioni C1 e C2 hanno mostrato anche serie aromatiche speziate (fenoli, 4 vinil guaiacolo) completamente assenti nel vino C3.

Discussione

In questo studio, per la prima volta è stata utilizzata la strategia di co-immobilizzazione in sfere di alginato di due ceppi commerciali di *S. cerevisiae* e *O. oeni* per la produzione di vino rosso. I parametri di immobilizzazione per i lieviti (biomassa cellulare iniziale, CaCl_2 , concentrazione di alginato di sodio) sono stati ottimizzati seguendo quanto descritto da Bleve e collaboratori (2008; 2011), al fine di ottenere sfere di alginato caratterizzate da buona rigidità e permeabilità, non limitando la diffusione e il trasferimento di sostanze nutritive da e verso le cellule immobilizzate, mantenendo buone condizioni di sopravvivenza cellulare e riducendo al minimo le perdite di cellule. I dati riportati in questo studio hanno dimostrato che, dopo l'immobilizzazione, le attività di lieviti e batteri risultano essere migliorate rispetto al corrispondente inoculo di cellule in forma libera. Infatti, l'immobilizzazione può migliorare la stabilità biologica, la tolleranza alle condizioni di stress esterno, la resistenza ai sottoprodotti derivanti dal metabolismo cellulare e che possono risultare tossici per le stesse cellule. Questa osservazione è particolarmente importante per *O. oeni* poiché questo microrganismo è esposto a condizioni particolarmente stringenti (basso pH, elevate concentrazioni di etanolo e SO_2 , mancanza di nutrienti), che possono influenzare negativamente la sua crescita e le sue attività metaboliche (Alexandre et al., 2004). L'alginato di calcio è stato scelto come materiale per incapsulare cellule di lievito e batteri, poiché è economico e ammesso per l'impiego alimentare. Questa strategia offre la possibilità di incapsulare cellule che mimano la capacità del lievito di aggregarsi a formare grossi fiocchi che poi precipitano dalla sospensione (flocculazione), producendo un elevato rapporto massa:superficie e proteggendo le cellule aggregate interne dagli stress ambientali (Sun et al., 2007). Diversi esempi di immobilizzazione del lievito in microsferi di alginato sono stati proposti per la produzione di idromele (Pereira et al., 2014), vini di melograno

(Sevda e Rodrigues, 2011) e di *cagaita* (Oliveira et al., 2011) e per la produzione di cabernet sauvignon e pinot nero (Andrade Neves et al., 2014).

Rispetto alle convenzionali strategie che impiegano cellule libere, la tecnologia di immobilizzazione offre miglioramenti in termini di maggiore vitalità e stabilità cellulare, resistenza allo stress (pH, etanolo, acidi grassi), riduzione dei tempi di vinificazione e costi di produzione. Infatti, l'efficienza di fermentazione di FA e FML mantenuta in tutti e tre i diversi cicli di produzione effettuati impiegando le stesse sfere come inoculo, indicano che la co-immobilizzazione di lieviti e batteri non induce alterazioni della fisiologia e dell'attività metabolica cellulari.

Le sfere di alginato alimentare (o altri sistemi simili di intrappolamento) possono essere facilmente immerse nel mosto d'uva e separate dal vino fermentato senza influire negativamente sul mosto e sulla composizione, sul gusto e sul colore del vino. In effetti, l'uso dell'approccio proposto ha prodotto vini con caratteristiche organolettiche e sensoriali non diverse da un vino ottenuto con la tradizionale procedura di inoculo sequenziale. Inoltre, i microrganismi co-immobilizzati sono stati in grado di mantenere le caratteristiche attese del prodotto finale in un tempo che è circa 1/3 del tempo necessario per ottenere il completamento dei processi di FA e FML utilizzando cellule in forma libera in inoculo sequenziale (Rodrigues-Nogales et al., 2012).

L'uso di alginato di calcio ha permesso di ottenere una buona immobilizzazione e un miglioramento dell'efficienza dei processi fermentativi, senza produrre effetti negativi sul gusto, l'aroma, la consistenza e il colore del vino. Questo studio, infatti, ha dimostrato che i vini prodotti utilizzando sfere di alginato come supporto per l'immobilizzazione di lieviti e batteri (C1, C2,) sono comparabili con quelli ottenuti utilizzando inoculi di cellule libere (C3, C4).

La co-immobilizzazione di *S. cerevisiae* e *O. oeni* ha permesso di eseguire un processo di fermentazione efficiente, eliminando la fase di crescita cellulare non produttiva, producendo un biocatalizzatore che può essere rigenerato e riutilizzato più volte, riducendo sensibilmente il tempo del processo, aprendo la possibilità di sviluppare in processo continuo. La strategia di co-immobilizzazione ha prodotto un vino con caratteristiche organolettiche migliorate rispetto a quello prodotto con il co-inoculo e le strategie di inoculo sequenziale degli starter in forma libera. Il vino ottenuto mediante utilizzo dei microrganismi co-immobilizzati ha mostrato bassi livelli di acidità volatile e concentrazioni di etanolo e glicerolo paragonabili a quelle ottenute da inoculo sequenziale cellulare e co-inoculo con cellule in forma libera.

Le microsfele di alginato contenenti microrganismi immobilizzati possono essere rigenerate e riutilizzate senza perdita di vitalità e delle loro attività metaboliche e possono essere eseguite fasi FA e FML più rapide per la produzione di vino nello stesso bioreattore.

Sebbene al momento sia difficile implementare l'uso di un sistema immobilizzato sui tradizionali sistemi di produzione del vino, è possibile considerare nel prossimo futuro un processo continuo per la fermentazione del vino come alternativa reale al tradizionale processo discontinuo senza problemi di concorrenza nutrizionale tra lievito e batteri starter. In effetti, un approccio simile, che impiega la co-immobilizzazione di *S. bayanus* e *Leuconostoc oenos* nella matrice di alginato, è stato già utilizzato per ottimizzare un processo di fermentazione in continuo per la produzione di sidro (Nedovic et al., 2000). Genisheva e collaboratori (2014) hanno sviluppato un sistema di vinificazione integrato, comprendente lo sviluppo sequenziale delle fermentazioni alcolica e malolattica in continuo, mediante l'implementazione di diversi reattori a letto pieno contenenti cellule di *S. cerevisiae* ed *O. oeni* rispettivamente immobilizzate su raspi/bucce e su bucce d'uva.

Questo nostro studio ha consentito di individuare la strategia più promettente per immobilizzare *S. cerevisiae* ed *O. oeni* in sfere di calcio alginato e di utilizzarle per prove di micro-vinificazione. Al momento, sono in corso esperimenti di vinificazioni su scala pilota utilizzando la strategia di co-immobilizzazione descritta, allo scopo di validare il metodo per un suo possibile utilizzo futuro su scala industriale.

Bibliografia

- Agouridis, N., Kopsahelis, N., Plessas, S., Koutinas, A., Kanellaki, M. (2008). *Oenococcus oeni* cells immobilized on delignified cellulosic material for malolactic fermentation of wine. *Bioresour. Technol.* 99, 9017–9020.
- 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.* 93,141-54.
- Andrade Neves, N., Araújo Pantoja, L., Santos, A.S. (2014). Thermovinification of grapes from the Cabernet Sauvignon and Pinot Noir varieties using immobilized yeasts. *Eur. Food Res. Technol.* 238, 79 – 84.
- Bleve, G., Lezzi, C., Chiriatti, M.A., D'Ostuni, I., Tristezza, M., Di Venere, D., Sergio, L., Mita, G., Grieco, F. (2011). Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. *Bioresour. Technol.* 102, 982-989.
- Bleve, G., Lezzi, C., Mita, G., Rampino, P., Perrotta, C., Villanova, L., Grieco, F. (2008). Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 589 79:731-741.
- Bleve, G., Tufariello, M., Vetrano, C., Mita, G., Grieco, F. (2016). Simultaneous alcoholic and malolactic fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* cells co-immobilized in alginate beads. *Frontiers Microbiol.*, 7, 943.
- Capone, S., Tufariello, M., Siciliano P. (2013). Analytical characterization of Negroamaro red wines 598 by “Aroma Wheels”. *Food Chem.* 141, 2906–2915.
- Diviès, C., Cachon, R. (2005). Wine production by immobilized cell systems. In V. Nedovic´ & R.Willaert (Eds.), *Applications of cell immobilisation biotechnology* (pp. 285–293). The Netherlands: Springer.
- Francis, I.L., and Newton, J.L. (2005). Determining wine aroma from compositional data. *Microbial modulation of wine aroma and flavour.* *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 114–126.
- Genisheva, Z., Mota, A., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A. (2014). Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells. *Process Biochem.* 49, 1-9
- Herrero, M., García, L. A., Díaz, M. (2003). Malolactic bioconversion using a *Oenococcus oeni* strain for cider production: Effect of yeast extract supplementation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 699–704.
- Kosseva, M., and Kennedy, J. F. (2004). Encapsulated lactic acid bacteria for control of malolactic fermentation in wine. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 32, 55–65.
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinasa, A.A. (2004). Immobilization Technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.* 21, 377–397.
- Melzoch, K., Rychtera, M., Habova, V. (1994). Effects of immobilization upon the properties and behavior of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *J. Biotechnol.* 32, 59–65.
- Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T.F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., Paraskevopoulou, A., Sandell, M., Šmogrovičová, D., Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast.* 32, 173-216.
- Nedović, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levica,S., Bugarskib, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Proc. Food Sci.* 1, 1806–1815.
- Nedovic, V.A., Durieuxb, A., Van Nederveelde, L., Rosseels, P., Vandegans, J., Plaisant, A., Simon, J. (2000). Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme Microb Technol.* 26, 834-839.
- Oliveira, M.E.S., Pantoja, L., Duarte, W.F., Collela, C.F., Valarelli, L.T., Schwan, R.F., Dias, D.R. (2011). Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. *Food Res. Int.* 44, 2391 – 2400.
- Pereira, A.P., Mendes-Ferreira, A., Oliveira, J.M., Estevinhob, L.M., Mendes-Faia, A. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production. *LWT- Food Sci. Technol.* 56, 21 – 30.
- Pilkington, P.H., Margaritis, A., Mensour, N.A., Russell, I. (1998) Fundamentals of immobilised yeast cells for continuous beer fermentation: a review. *J. Inst. Brew.* 104,19–31.
- Poreda, A., Tuszyński, T., Zdaniewicz, M., Sroka, P., Jakubowski, M. (2013). Support materials for yeast immobilization FAfect the concentration of metal ions in the fermentation medium. *J. Inst. Brew.* 119, 164-171.
- Rodriguez-Nogales, J.M., Fernandez-Fernández, Gómez, E.M., Vila-Crespo, J.(2012). Antioxidant properties of sparkling wines produced with β -glucanases and commercial yeast preparations. *J. Food Sci.*77,1005-1010.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 169–180.

- Sevda, S.B., Rodrigues, L.(2011).The making of pomegranate wine using yeast immobilized on sodium alginate. *FAr. J. Food Sci.* 5, 299–304.
- Sipsas, V., Kolokythas, G., Kourkoutas, Y., Plessas, S., Nedovic, V.A., Kanellaki, M.(2009). Comparative study of batch and continuous multi-stage fixed-bed tower (MFBT) bioreactor during wine-making using freeze-dried immobilized cells. *J. Food Eng.* 90, 495–503.
- 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. Biotechnol.* 75, 1419–1427.
- Tristezza, M., di Feo, L., Tufariello, M., Grieco, F., Capozzi, V., Spano, G., Mita, G. (2016). Simultaneous inoculation of yeasts and lactic acid bacteria: Effects on fermentation dynamics and chemical composition of Negroamaro wine. *LWT- Food Sci.Technol.* 66, 406-412.
- Tufariello M., Chiriatti M.A., Grieco F., Perrotta C., Capone S., Rampino P., Tristezza M., Mita G., Grieco F. (2014). Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamaro wines. *LWT- Food Sci. Technol.*, 58, 35–48.

Riassunto

Negli ultimi anni, l'uso di sistemi cellulari immobilizzati è stato studiato con risultati promettenti per la produzione di molti alimenti e bevande fermentate. In questo studio è stata realizzata la co-immobilizzazione di una miscela di cellule di Saccharomyces cerevisiae e Oenococcus oeni in sfere di alginato. Questo sistema è stato utilizzato per effettuare test di microvinificazione di mosto da uve Negroamaro. Il processo fermentativo è stato monitorato mediante analisi chimiche e sensoriali, valutando la capacità degli starter di gestire i processi fermentativi e delle sfere di trattenere le cellule al loro interno. La co-immobilizzazione di S. cerevisiae e O. oeni ha permesso di realizzare processi di fermentazione alcolica (FA) e malo lattica (FLM) in contemporanea, producendo bassi livelli di acidità volatile e concentrazioni di etanolo e glicerolo paragonabili a quelle ottenute dall' inoculo (co-inoculo o aggiunta sequenziale) delle stesse cellule di S. cerevisiae e O. oeni in forma libera. Inoltre, la strategia di co-immobilizzazione ha prodotto una riduzione significativa del tempo richiesto per completare le FA e FML. Le cellule immobilizzate hanno dimostrato di poter essere efficacemente riutilizzate per la fermentazione del mosto almeno tre volte senza alcuna apparente perdita di attività metabolica cellulare, producendo vini con tratti organolettici migliorati rispetto ai vini fermentati seguendo il tradizionale inoculo sequenziale di starter microbici in forma libera.