

MATERIAUX INNOVANTS POUR L'IMMOBILISATION DES LEVAINS MALOLACTIQUES. TECHNOLOGIES, EFFETS BIOLOGIQUES ET FERMENTATIONS EXPERIMENTALES AVEC DES SOUCHES D'*OENOCOCCUS OENI* IMMOBILISEES DANS DES MATRICES HYBRIDES (SILICE/ALGINATE)

Raffaele GUZZON^{1*}, Agostino CAVAZZA¹, Giovanni CARTURAN¹

¹Edmund Mach Foundation. Via Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN). * Tel. +39 0461 615 137/262 raffaele.guzzon@iasma.it

Etude présentée à l'occasion de la 6ème édition Enoforum, 21-23 Avril 2009, Piacenza, Italie

Introduction

L'utilisation de cultures microbiennes immobilisées peut améliorer l'efficacité des fermentations industrielles [1,2]. Ces dernières années, l'utilisation de levains de vinification immobilisés est devenue une alternative intéressante aux cultures de cellules libres. [3, 4]. Les vins et moûts ont une composition chimique qui peut limiter l'activité microbienne en fonction de certains facteurs : une teneur en sucre initiale et une acidité élevées, un faible pH ou encore les effets inhibants de l'éthanol et du SO₂. Ces obstacles peuvent mener à des fermentations languissantes et à la production de métabolites secondaires qui peuvent réduire tant la qualité du vin que la sécurité alimentaire qu'il présente [5].

L'immobilisation de culture microbienne peut résoudre ces problèmes : en effet il est possible d'adapter la composition chimique de la matrice d'enrobage aux besoins particuliers des espèces microbiennes utilisées, et ainsi réduire les effets que le milieu peut produire sur l'activité cellulaire. De plus, si l'immobilisation de la cellule au sein du substrat solide fonctionne, les cellules ne seront pas libérées dans le milieu de fermentation. Cela garantit un contrôle strict du développement microbien dans le vin ainsi qu'un rétablissement de la biomasse facilité, pour des coûts de procédé plus bas.

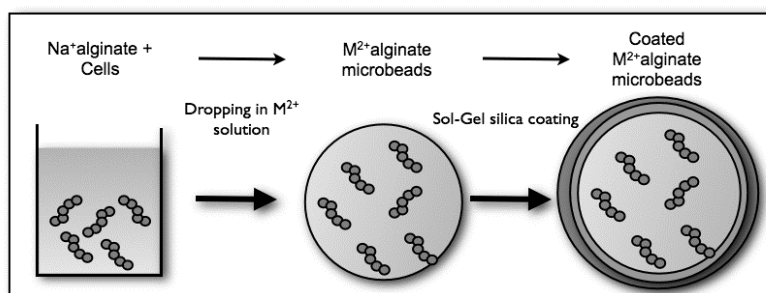


Figure 1. Procédé d'immobilisation proposé (par Callone et al., 1998 [6])

Résultats et discussion

L'étude présentée a eu pour but d'améliorer et de perfectionner les techniques d'immobilisation pour les microorganismes utilisés dans la vinification.

Le procédé proposé a été récemment publié [6] et prévoit 3 phases distinctes (Figure 1) :

1. Les cellules sont mises en suspension dans une solution comprenant 2% de Na⁺-alginate ;
2. La suspension de cellule/alginate est expulsée dans une solution 0.1M M²⁺ (M = Ca, Ba), l'alginate se solidifie immédiatement, emprisonnant les cellules dans des microsphères de M²⁺- alginate.
3. Les microsphères sont recouvertes d'une couche de silice, par voie sol-gel dérivée de deux précurseurs distincts, le tétraéthoxysilane et le méthyltriéthoxysilane.

En raison de ce procédé de production particulier et du type de précurseurs utilisés, la couche de silice est chimiquement inerte, permettant des échanges libres de masse entre les cellules et le milieu. La couche a également des propriétés physiques (élasticité et résistance à la rupture) qui empêchent la libération des cellules dans le milieu [7-9].

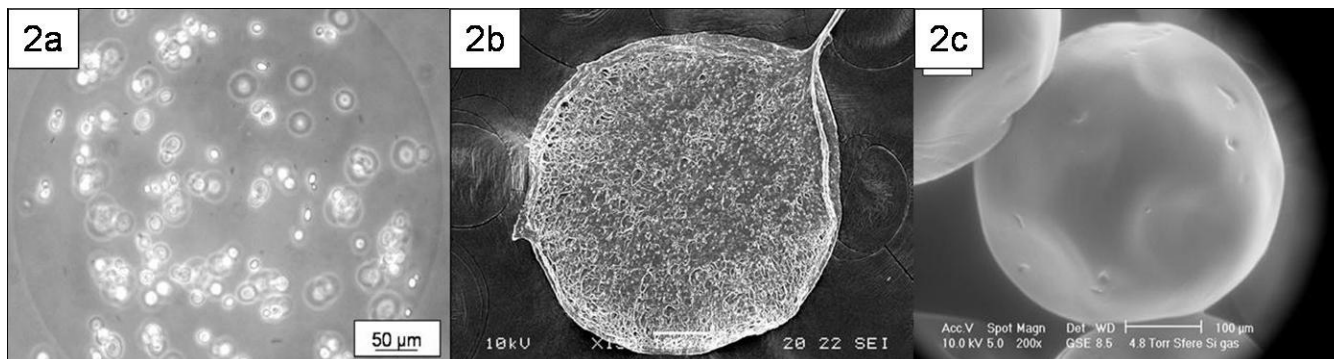


Figure 2 : Cellules *S. cerevisiae* immobilisées dans des microsphères de silice/alginate (microscope optique 25x). 2b. Image SEM de microsphères alginate. 2c. Image ESEM de microsphères silice/alginate. Le changement morphologique de la surface, dû à la couche de silice déposée par voie sol/gel, est évident. (de Callone et al., 1998 [6])

De nombreuses techniques ont été utilisées afin de caractériser les propriétés chimiques et physiques du système d'immobilisation proposé. La mesure des sphères de silice/alginate avec un micromètre optique a démontré que le procédé garantit aux microsphères des dimensions régulières (diamètre moyen $450 \pm 80 \mu\text{m}$) [6]. Cela est fondamental afin que les cellules immobilisées maintiennent une activité effective (Figure 2a).

Le procédé d'immobilisation n'altère pas la charge microbienne à l'intérieur des microsphères : des mesures de densité cellulaire au sein des microsphères de silice/alginate montrent que ce traitement ne réduit pas la viabilité de la levure ni celle de la bactérie. La charge microbienne finale est supérieure à 10^9 cellules/gramme de microsphère [6]. L'examen des microsphères avec un microscope électronique à balayage (ESEM et SEM) (Figure 2b, 2c), l'analyse élémentaire de la silice et l'analyse NMR (Résonance magnétique nucléaire) du solide isotope ^{29}Si [6, 10] permettent une caractérisation précise de la couche superficielle de silice. La couche superficielle de silice est un film continu et uniforme, de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur, formé d'unités de silicate complètement polymérisées ($\text{R-Si}(\text{OSi})_3$ et $\text{Si}(\text{OSi})_4$) qui sont encore plus ancrées dans la matrice alginate.

Les fermentations expérimentales ont été réalisées avec différentes concentrations de substrats (glucose pour la levure, acide L-malique pour la bactérie malolactique) dans le but d'évaluer l'activité fermentaire des cellules au sein de la matrice de silice/alginate. Les données expérimentales recueillies ont été analysées d'après une méthode proposée par Lineweaver et Burk, utilisée pour mesurer l'effet de l'immobilisation sur le transport de substances. Les éléments K_m (affinité constante) et V_{max} (vitesse maximale de fermentation) calculés pour les fermentations avec des cellules libres ou immobilisées (Table 1) ont montré que le traitement d'immobilisation n'interfère pas avec l'activité cellulaire, et que les substances sont transportées à travers la microsphère [6].

Table 1. Paramètres cinétiques des fermentations alcooliques (*S.cerevisiae*) et fermentations malolactiques (*O.oeni*), avec des cellules libres ou cellules immobilisées dans un milieu synthétique (modifié par Callone et al., 1998 [6]).

Echantillon	$10^6 V_{max}$ (M sec ⁻¹ × g de cellules)	K_m (M ⁻¹)
Cellules <i>S. cerevisiae</i> libres	48 ± 5	0.3 ± 0.1
Cellules <i>S. cerevisiae</i> immobilisées	33 ± 1	0.1 ± 0.1
Cellules <i>O. oeni</i> libres	4.2 ± 0.4	4 ± 0.1
Cellules <i>O. oeni</i> immobilisées	4.0 ± 0.2	2 ± 0.6

L'efficacité des cellules *Oenococcus Oeni* immobilisées durant la fermentation malolactique (FML) a été étudiée sur des volumes compris entre 5 et 50 litres, sous des conditions opératoires différentes.

Pour tous les essais effectués, la bactérie immobilisée et la bactérie libre ont montré une activité fermentaire analogue. La biomasse immobilisée a été utilisée dans trois séries de FML sur une durée totale de 48 jours consécutifs de fermentation (Figure 3), soumettant ainsi à fermentation 3 fois le volume de vin, à l'instar de la culture libre homologue. Il y a une faible libération des cellules dans le vin, moins de 10⁵ cellules/ml. De plus, l'utilisation de « starters bactériens » sélectionnés permet de réduire les coûts de façon significative.

	Etanolo (%)	pH	Acidità totale f(g/l)	Acidità volatile (g/l)	Ac. Malico (g/l)	Ac. Lattico (g/l)
VINO BASE	11,39	3,34	5,99	0,32	2,35	0,20
FINE 1 ^a FML	11,24	3,48	4,60	0,32	0,18	2,07
FINE 2 ^a FML	11,28	3,48	4,40	0,42	0,24	2,24
FINE 3 ^a FML	11,08	3,45	4,50	0,45	0,20	2,27

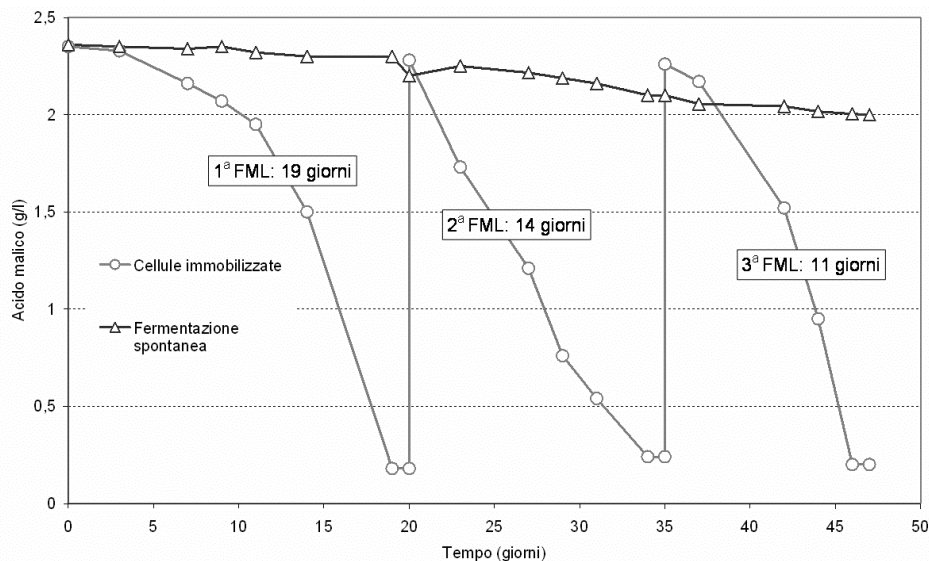


Figure 3. Série de fermentations malolactiques avec des cellules *O.oeni* immobilisées dans des microsphères de silice/alginate. La biomasse immobilisée a montré une activité fermentaire élevée pendant 48 jours consécutifs de FML.

Les bactéries immobilisées ont également été ensemencées dans le moût conjointement avec des levures libres, débouchant sur une fermentation malolactique qui a fini au même moment que la fermentation alcoolique, sans altérer les paramètres œnologiques du vin (acide acétique, acide tartrique, sucre résiduel) (Figure 4).

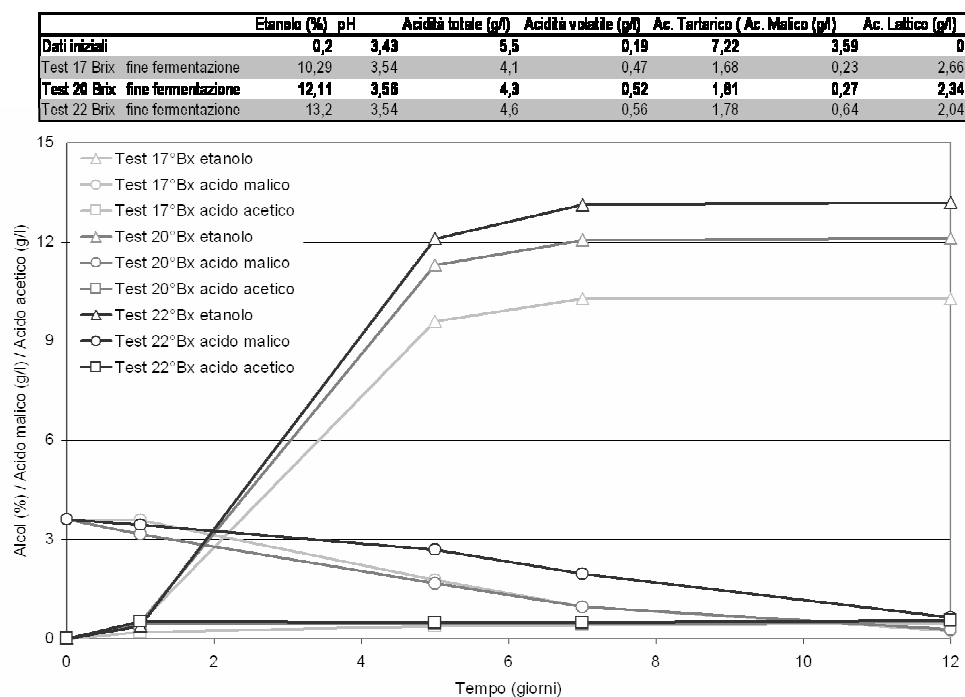


Figure 4. Fermentation alcoolique (Cellules *S. cerevisiae* libres) et malolactique (cellules *O.oeni* immobilisées) effectuées simultanément dans le moût.

Conclusions

L'utilisation de cultures de bactéries immobilisées dans des matrices hybrides de silice/alginate est une alternative efficace à l'utilisation de cultures de bactéries libres pour le contrôle de la fermentation malolactique. Grâce à ces matériaux développés, pour la première fois appliqués à la vinification, les cellules immobilisées dans des microsphères de silice/alginate engendrent des fermentations malolactiques réussies et permettent un contrôle strict du développement des bactéries dans le vin. Les cellules peuvent être retirées immédiatement à la fin du processus, réduisant ainsi les risques de déviations fermentaires et améliorant la qualité globale du vin.

Bibliographie

- Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelet, D., Neufeld, R.J. (1994) Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 75-107.
- Margaritis, A., Merchant, F.J.A. (1984) Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1 (4), 339-393.
- Peinado, R., Moreno, J., Villalba, J., González-Reyes, J., Ortega, J., Mauricio, J. (2006) Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 79-84.
- Fumi, M., Trioli, G., Colagrande, O. (1987) Preliminary assessment on the use of immobilized yeast cells in sodium alginate for sparkling wine process. *Biotechnol. Lett.* 9 (5), 339-342.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (1999) *Handbook of Enology* Wiley & Sons, Ltd. (Chichester, England) cap..
- Callone E, Campostrini R, Carturan G, Cavazza A, and Guzzon R. (1998) Immobilization of yeast and bacteria cells in alginate microbeads coated with silica membranes: procedures, physico-chemical features and bioactivity. *J. Mat. Chem.* 18, 4839-4848.
- Carturan, G., Campostrini, R., Tognana, L., Boninsegna, S., Dal Toso, R., Dal Monte, R. (2006) Gas-Phase Silicon alkoxide reactivity vs. Na-alginate droplets for conjugation of Alginate and sol-gel Technologies. *J. of Sol-Gel Sci. And Techn.* 37 (1), 69-77
- Carturan, G., Dal Toso, R., Boninsegna, S., Dal Monte, R. (2004) Encapsulation of functional cells by sol-gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy. *J. Mater. Chem.* 14 (14), 2087-2098.
- Dire, S., Pagani, E., Babonneau, F., Ceccato, R., Carturan, G. (1997) Unsupported SiO₂-based organic-inorganic membranes Part 1. Synthesis and structural characterization. *J. Mater. Chem.* 7, 67-73
- Sugahara, Y., Inouea, T., Kuroda, K. (1997) ²⁹Si NMR study on co-hydrolysis processes in Si(OEt)₄-RSi(OEt)₃-EtOH-water-HCl systems (R=Me, Ph): effect of R groups. *J. Mater. Chem.* 7, 53-59