

## MATERIALES INNOVADORES PARA LA INMOVILIZACIÓN DE CULTIVOS MALOLACTICOS. TECNOLOGÍA, EFECTOS BIOLÓGICOS Y FERMENTACIONES EXPERIMENTALES CON CEPAS DE OENOCOCCUS OENI INMOVILIZADAS EN MATRICES HÍBRIDAS SÍLICE/ALGINATO

Raffaele GUZZON<sup>1\*</sup>, Agostino CAVAZZA<sup>1</sup>, Giovanni CARTURAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fondazione Edmund Mach. Via Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN). \* Tel. +39 0461 615 137/262 [raffaele.guzzon@iasma.it](mailto:raffaele.guzzon@iasma.it)

Trabajo ganador del Premio SIVE 2009 “Investigación Italiana para el desarrollo”

### Introducción

La utilización de cultivos microbianos inmovilizados puede mejorar la eficacia de las fermentaciones industriales [1,2]. Desde hace algunos años la utilización de cultivos iniciadores inmovilizados en enología está siendo tomada en consideración como alternativa a la utilización de células libres [3,4]. El vino y el mosto tienen una composición química capaz de limitar el desarrollo de la actividad microbiana por la presencia de varios factores: elevado contenido inicial de azúcares, elevada acidez, bajo pH, efecto inhibitorio del etanol y del SO<sub>2</sub>. Estos obstáculos pueden dar lugar a fermentaciones lentas y a la producción de metabolitos secundarios potencialmente dañinos para la calidad y salubridad del vino [5].

La inmovilización de los cultivos microbianos puede evitar estos problemas: es posible adaptar la composición química de la matriz de inmovilización a las peculiares exigencias de las especies utilizadas, para reducir los efectos de los factores ambientales sobre la actividad celular. Además, la inmovilización de las células en un sustrato sólido, si es eficaz en el evitar la cesión celular al medio de fermentación, garantiza un estricto control de la evolución microbiana en el vino y una recuperación temprana de la biomasa con una reducción de los costes del proceso.

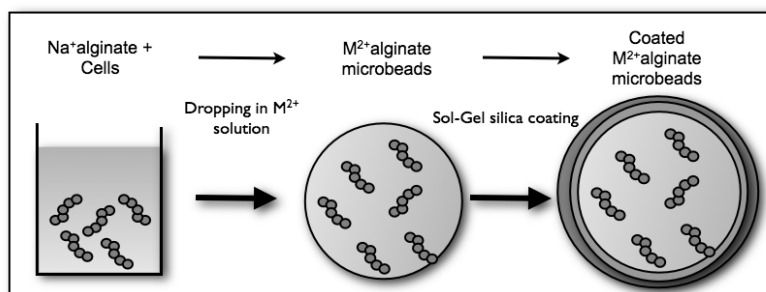


Figura 1. Esquema del proceso de inmovilización propuesto (extraído de Callone et al. 1998 [6])

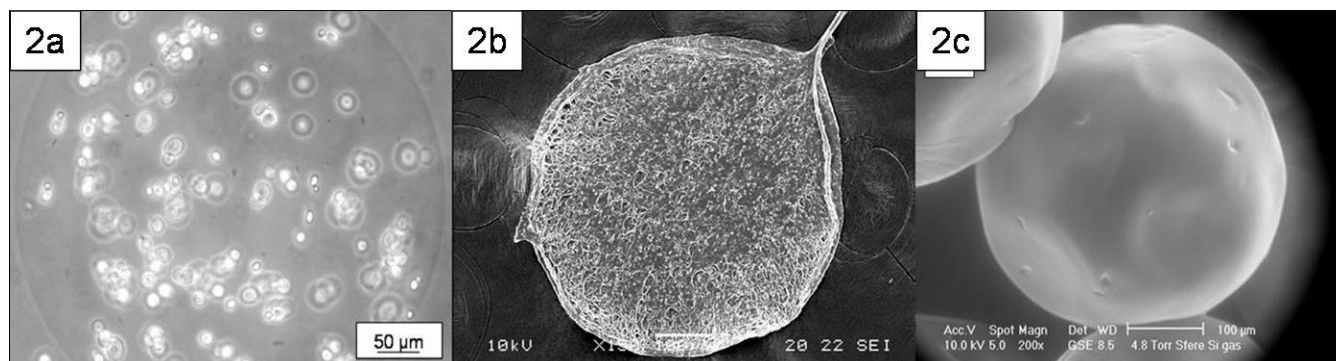
### Resultados y discusión

La investigación presentada tenía como objetivo la puesta a punto de una técnica de inmovilización para microorganismos de interés enológico.

El proceso propuesto ha sido publicado recientemente [6] y comprende 3 fases diferentes (Figura1):

1. las células son dispersadas en una disolución al 2% de Na<sup>+</sup>-alginate;
2. la suspensión células/alginate es extruída en una disolución 0.1M de M<sup>2+</sup> (M = Ca, Ba), con solidificación inmediata del alginato e inclusión de las células en microesferas de M<sup>2+</sup>-alginate;
3. las microesferas son recubiertas con una capa de sílice, sintetizado por sol-gel de dos diversos precursores alcoxilicos, el tetraetoxisilano y el metiltrietoxisilano.

Gracias al particular proceso de síntesis, y a los tipos de precursores utilizados, la capa de sílice es químicamente inerte, lo que permite el libre intercambio de masa entre las células y el ambiente y presenta unas propiedades mecánicas (elasticidad y resistencia a la rotura) que permiten obstaculizar eficazmente la cesión celular al medio [7 - 9].



*Figura 2a. Células de S. cerevisiae inmobilizadas en microesferas de sílice alginato (Microscopio óptico 25x). 2b. Imagen SEM de microesferas de /alginato. 2c. Imagen ESEM de microesferas sílice/alginato. Es evidente el cambio de la morfología superficial provocado por la capa de sílice depositada por sol-gel (extraído de Callone et al. 1998 [6])*

Se aplicaron numerosas técnicas para la caracterización químico/física del sistema de inmovilización propuesto. La medición con ocular micrométrico de las esferas sílice/alginato determinó que el proceso garantiza una distribución dimensional constante de las microesferas (diámetro medio  $450 \pm 80 \mu\text{m}$ ) [6], para permitir fundamentalmente una eficaz actividad de las células inmobilizadas (Figura 2a).

El proceso de inmovilización no altera la carga microbiana dentro de las microesferas: la medición de la densidad celular interna de las microesferas de sílice/alginato demostró que el tratamiento no provoca la disminución de la vitalidad, ni para las levaduras ni para las bacterias, cuya carga final es superior a  $10^9$  células/gramo de microesferas [6]. La observación con el microscopio electrónico a escansión (ESEM y SEM) (Figura 2b, 2c), el análisis elemental del silicio y el análisis NMR (Nuclear Magnetic Resonance) estado sólido del isótopo  $^{29}\text{Si}$  [6, 10] permitieron una caracterización precisa del revestimiento silíceo: está constituido por una película continua y regular, con un espesor de  $10 \mu\text{m}$ , formado por unidades silíceas  $(\text{R-Si}(\text{OSi})_3$  y  $\text{Si}(\text{OSi})_4$ ) completamente polimerizadas entre ellas y firmemente ancladas a la matriz de alginato.

Para verificar el mantenimiento de la actividad fermentativa de las células incluidas en la matriz sílice/alginato se llevaron a cabo fermentaciones experimentales con diversas concentraciones de sustrato (glucosa en el caso de las levaduras, ácido L-málico en el caso de las bacterias malolácticas). Los datos experimentales fueron tratados según el método propuesto por Lineweaver y Burk, para determinar el efecto del tratamiento de inmovilización sobre el transporte de masa. Los valores de  $K_m$  (constante de afinidad) y  $V_{\text{máx}}$  (velocidad máxima de fermentación), calculados en base a las fermentaciones llevadas a cabo con células libres e inmobilizadas (Tabla 1) nos permiten afirmar que el tratamiento de inmovilización no interfiere con la actividad celular, garantizando el libre transporte de masa a través de las microesferas [6].

Tabla 1. Parámetros cinéticos de fermentación alcohólica (*S. cerevisiae*) y fermentación maloláctica (*O. oeni*), llevadas a cabo con células libres o inmovilizadas, en terreno sintético (modificado por Callone et al. 1998 [6]).

Muestra	$10^6 V_{m\acute{a}x}$ (M sec <sup>-1</sup> × g de células)	$K_m$ (M <sup>-1</sup> )
Células de <i>S. cerevisiae</i> libres	48 ± 5	0.3 ± 0.1
Células de <i>S. cerevisiae</i> inmovilizadas	33 ± 1	0.1 ± 0.1
Células de <i>O. oeni</i> libres	4.2 ± 0.4	4 ± 0.1
Células de <i>O. oeni</i> inmovilizadas	4.0 ± 0.2	2 ± 0.6

Se estudió en vino la eficacia para desarrollar la fermentación maloláctica (FML) de células de *Oenococcus oeni* inmovilizadas, utilizando volúmenes comprendidos entre 5 y 50 litros, en diferentes condiciones operativas.

En todas las pruebas llevadas a cabo, las bacterias inmovilizadas demostraron una actividad fermentativa análoga a la de las células libres. La biomasa inmovilizada se empleó en FML en serie durante 48 días consecutivos de fermentación (Figura 3), fermentando en total un volumen de vino 3 veces superior al del homólogo cultivo libre, con una baja cesión celular en el vino, inferior a 10<sup>5</sup> células/ml, y una significativa disminución de los costes debido a la utilización de cultivos estárter de bacterias seleccionadas.

	Etanolo (%)	pH	Acidità totale /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 1ª FML	11,24	3,48	4,60	0,32	0,18	2,07
FINE 2ª FML	11,28	3,48	4,40	0,42	0,24	2,24
FINE 3ª FML	11,08	3,45	4,50	0,45	0,20	2,27

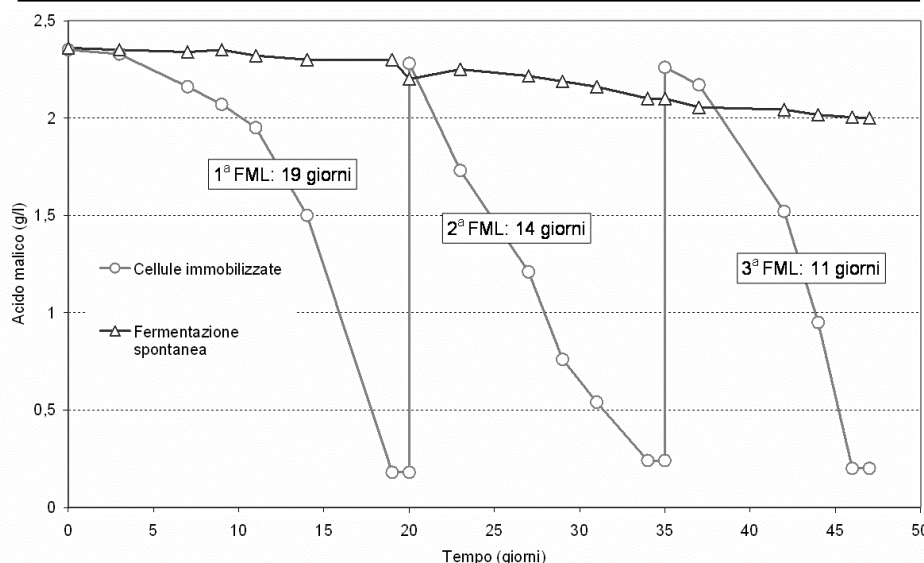


Figura 3. Fermentación maloláctica en serie desarrollada con células de *O.oeni* inmovilizadas en microesferas de sílice/alginate. La biomasa inmovilizada demostró una elevada actividad fermentativa durante 48 días consecutivos de FML.

Las bacterias inmovilizadas fueron también inoculadas con levaduras libres, en mosto, garantizando una FML que concluyó contemporáneamente a la fermentación alcohólica, sin alterar los parámetros enológicos del vino (ácido acético, ácido tartárico, azúcares residuales) (Figura 4).

	Etanolo (%)	pH	Acidità totale (g/l)	Acidità volatile (g/l)	Ac. Tartarico (g/l)	Ac. Malico (g/l)	Ac. Lattico (g/l)
<b>Dati iniziali</b>	<b>0,2</b>	<b>3,43</b>	<b>5,5</b>	<b>0,19</b>	<b>7,22</b>	<b>3,59</b>	<b>0</b>
Test 17 Brix fine fermentazione	10,29	3,54	4,1	0,47	1,68	0,23	2,66
<b>Test 20 Brix fine fermentazione</b>	<b>12,11</b>	<b>3,56</b>	<b>4,3</b>	<b>0,52</b>	<b>1,81</b>	<b>0,27</b>	<b>2,34</b>
Test 22 Brix fine fermentazione	13,2	3,54	4,6	0,56	1,78	0,64	2,04

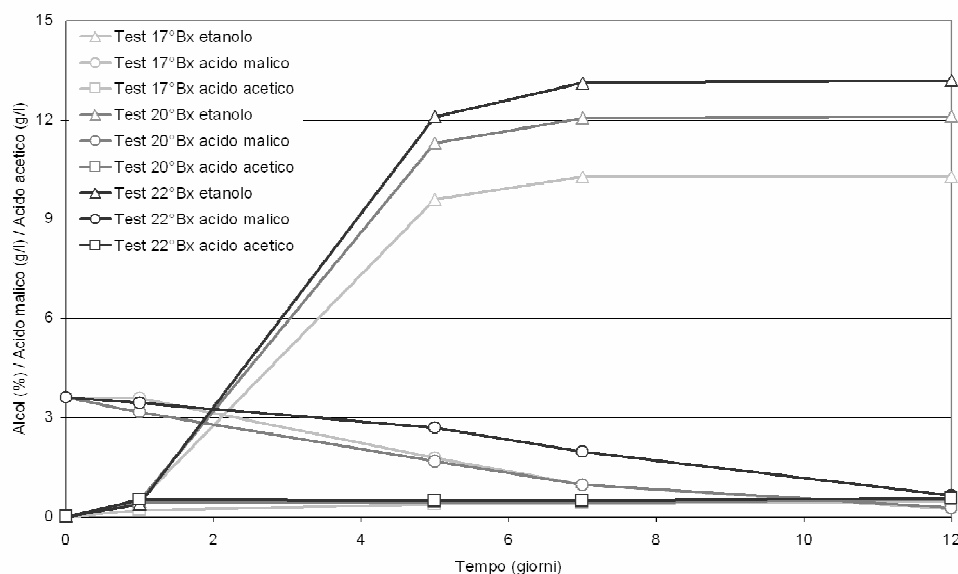


Figura 4. Fermentación alcohólica (Células libres de *S. cerevisiae*) y fermentación maloláctica (Células de *O.oeni* inmovilizadas) desarrolladas simultáneamente en mosto.

## Conclusiones

La utilización de cultivos bacterianos inmovilizados en matrices híbridas sílice/alginato es una alternativa eficaz a la utilización de cultivos bacterianos libres para la gestión de la FML. Gracias a los materiales desarrollados y utilizados por primera vez en el sector enológico, la biomasa inmovilizada en microesferas de sílice/alginato permite FML eficaces con un riguroso control de la evolución bacteriana en el vino, permitiendo la inmediata eliminación de las células al final del proceso y reduciendo por tanto el riesgo de desviaciones fermentativas, mejorando la calidad general del vino.

## Bibliografía

- 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 SiO<sub>2</sub>-based organic-inorganic membranes Part 1. Synthesis and structural characterization. *J. Mater. Chem.* 7, 67-73
- Sugahara, Y., Inouea, T., Kuroda, K. (1997) <sup>29</sup>Si NMR study on co-hydrolysis processes in Si(OEt)<sub>4</sub>-RSi(OEt)<sub>3</sub>-EtOH-water-HCl systems (R=Me, Ph): effect of R groups. *J. Mater. Chem.* 7, 53-59