BIOINGINERIA CULTURILOR DE BACTERII MALOLACTICE – DE LA IZOLARE DIN MEDIUL NATURAL LA LIOFILIZARE

Şef lucrări dr. ing. Ionel POPESCU-MITROI[1], Conf. dr. ing. Dana-Gina RADU[1]

[1]Universitatea „Aurel Vlaicu" – Arad, Facultatea de Inginerie Alimentară, Turism şi Protecţia Mediului, România

REZUMAT. Culturile starter de laborator oferă vinificatorilor, posibilitatea de a se elibera de incertitudinile legate de fermentaţia malolactică spontană. Totuşi bacteriile malolactice selecţiontate (BMS) ramân cele mai scumpe şi din acest motiv sunt cel mai puţin utilizate în industria vinicolă, mai ales în intreprinderile mici de vinificaţie. O modalitate elegantă de a rămâne independent de furnizarea şi evoluţia preţurilor preparatelor comerciale de bacterii malolactice este dotarea intreprinderilor de vinificaţie cu laboratoare de biotehnologie moderne capabile să-şi producă autonom culturi de bacterii malolactice, pe care apoi să le conserve prin liofilizare. În această lucrare este prezentată biotehnologia de obţinere a culturilor liofilizate prin selecţia tulpinilor din microflora indigenă, alegerea agentului crioprotector la liofilizare şi parcurgerea protocolului de reactivare înainte de inoculare în vin, fiind factorii decisivi care asigură succesul derulării fermentaţiei malolactice.

Cuvinte cheie: bacterii lactice, fermentaţie malolactică, liofilizare.

ABSTRACT. Laboratory starter cultures offer winemakers the opportunity to free themselves from uncertainties related to spontaneous malolactic fermentation. However, the selected malolactic bacteria (BMS) remain the most expensive and are therefore the least used in the wine industry, especially in small winemaking companies. An elegant way to remain independent of the supply and price evolution of commercial malolactic bacterial preparations is to equip winemaking companies with modern biotechnology laboratories capable of independently producing cultures of malolactic bacteria, which they then conserve by lyophilization. This paper presents the biotechnology of obtaining the lyophilized cultures by selecting the strains from the indigenous microflora, choosing the cryoprotective agent for lyophilization and following the reactivation protocol before inoculation in wine being the decisive factors that ensure the success of the malolactic fermentation.

Keywords: lactic acid bacteria, malolactic fermentation, lyophilization.

1. INTRODUCERE

Istoricul fermentaţiei malolactice controlate (FMC) debutează relativ recent (1990) odată cu punerea pe piaţă a culturilor malolactice (CML) starter liofilizate comerciale [10].

Producătorii de materiale oenologice furnizează în prezent, CML într-o gamă variată: culturi lichide, culturi liofilizate şi culturi congelate [8].

Dintre bacteriile lactice, cea mai importantă specie cu implicaţii deosebite în iniţierea şi desăvârşirea fermentaţiei malolactice (FML) este *Leuconostoc oenos (Oenococcus oeni)*, disponibilă sub forma mai multor preparate bacteriene [13].

Siguranţa şi succesul utilizării bacteriilor malolactice în vin, depinde în principal de trei factori esenţiali [14, 15]:

– o tulpină bacteriană corespunzătoare;

– un preparat liofilizat de bună calitate;

– o metodologie de inoculare a acestor bacterii şi în general o corectă strategie de utilizare.

Oenococcus oeni trebuie să realizeze mai multe acţiuni în vin - care e un mediu nefavorabil, cu pH scăzut (3-3,5) şi concentraţie alcoolică ridicată (12-15%), la temperaturi scăzute (12°C), conţinut de SO_2 (>10 mg/l) - cum ar fi: desfăşurarea normală a FML chiar în vinuri dificile, diminuarea formării de acid acetic şi esteri volatili, diminuarea caracterului senzorial vegetal (ierbos), producţie cât mai redusă de amine biogene, şi să aibă rezistenţă la bacteriofagi [4]. Pentru a rezolva aceste probleme, optimizarea CML s-a realizat cu diferite grade de succes prin izolare şi selecţie de tulpini, mutageneză, evoluţie adaptivă, recombinare genetică [2, 11].

Pentru izolare şi selecţie există 3 categorii de criterii de selecţie grupate în funcţie de importanţă biotehnologică pentru culturile de bacterii lactice implicate în FML redate în tabelul 1.

Tabelul 1. **Criterii de selecție a bacteriilor lactice implicate în fermentația malolactică a vinurilor [7]**

Criterii primare	Criterii secundare	Criterii terțiare
• Rezistență la *p*H scăzut • Rezistență la etanol • Toleranță la temperatură scăzută • Metabolizare redusă a hexozelor și pentozelor	• Viabilitate ridicată în urma inoculării într-un mediu standardizat • Timp scurt de propagare într-un mediu standardizat • Producție ridicată de biomasă într-un mediu standardizat • Cinetică de supraviețuire rapidă într-un mediu standardizat • Degradare rapidă a acidului malic în soluție tampon de acid tartric (*p*H 4,5) și în vin	• Producerea caracteristicilor organoleptice adecvate/dezirabile în vin • Rezistență la bacteriofagi • Rezistență la dioxid de sulf • Nu produce amine biogene • Potențial de a forma diacetil și acetoină în cantități reduse • Nu degradează glicerolul • Nu produce polizaharide extracelulare • Produce foarte puțin sau deloc acid D-lactic

Spre deosebire de tendința de utilizare a CML starter comerciale, mulți specialiști oenologi consideră că selecția și utilizarea tulpinilor de bacterii lactice indigene arealului viticol respectiv ar beneficia de diversitatea naturală a acestor tulpini indigene, cu o capacitate superioară de adaptare la condițiile restrictive ale mediului fermentativ din vinuri, capabile să degradeze rapid acidul malic și să confere un profil senzorial plăcut vinului [1].

Diversitatea intraspecifică a tulpinilor izolate din diferite crame implică și toleranțe specifice diferite față de diferiți stresori [2]. Dovadă problemelor de adaptare și de performanță a CML starter comerciale, sunt multe cercetări recente care evaluează adaosul unor nutrienți asupra eficienței FML și a calității senzoriale ale vinului [3]. O modalitate de a depăși dificultățile legate de FML poate fi dotarea intreprinderilor de vinificație cu laboratoare de biotehnologie moderne pentru a-și produce autonom CML, pe care apoi să le conserve prin liofilizare.

2. ETAPELE PRODUCERII CML

Selecția și identificarea tulpinilor

Procedura de selecție a tulpinilor necesită utilizarea unui bioreactor (turbidostat) și a fost descrisă prima dată la bacterii lactice de Nielsen [14]. Într-un bioreactor de laborator cu capacitatea de 1 litru se introduce vin sterilizat prin microfiltrare cu concentrația alcoolică de 11,5% și *p*H 3,4. În bioreactor se introduc celule de bacterii lactice izolate din mediul natural, în timpul fazei de creștere exponențiale a FML spontane a vinurilor. Biomasa de bacterii lactice este separată prin centrifugare apoi este precultivată pe mediul Man Rogosa Sharpe (MRS). După creștere pe mediu și inoculare în turbidostat, biomasa de bacterii lactice este menținută la densitatea optică de 600 nm la un nivel de absorbanță de 0.1 măsurat cu spectrofotometru, controlând admisia vinului steril în aparat și creșterea biomasei. După 4-6 săptămâni de creștere în fază staționară, concentrația alcoolică și valorile de pH nu mai susțin creșterea bacteriană. În acest moment (începutul fazei de declin) se prelevează probe care se reinoculează pe mediu MRS obținându-se izolate reprezentative, adică tulpini mai bine adaptate la concentrații ridicate de alcool și *p*H scăzut [7].

3. STRATEGII DE OPTIMIZARE A BIOTEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A CML

În ultimii ani s-au obținut rezultate net superioare prin cultivarea tulpinii *Oenococcus oeni* pe mediu MLO care conține pantotenat de calciu ca factor de creștere.

În tabelul 2 sunt prezentate condițiile de creștere a principalelor specii de bacterii lactice implicate în FML.

Tabelul 2. **Condiții de creștere pentru bacteriile lactice din vin [5]**

Microorganism	Mediu de cultură	*p*H	Temperatura	Aerare	Durată termostatare
Lactobacillus brevis	MRS	6,2-6,5	30°C	Aerotolerant anaerob	24-36 h
Lactobacillus hilgardii	MRS	6,2-6,5	30°C	Aerotolerant anaerob	48 h
Lactobacillus mali	MRS	6,2	30°C	Aerotolerant anaerob	24-36 h
Lactobacillus plantarum	MRS	6,2-6,5	30°C	Aerotolerant anaerob	24 h
Leuconostoc mesenteroides	MRS	6,2-6,5	26°C	Microaerofilic	24-48 h
Oenococcus oeni	MRS/MLO	4,8-5,2	26°C	Microaerofilic	Peste 3 zile

Tabelul 3. **Conservarea bacteriilor lactice prin liofilizare [5]**

Microorganism	Crioprotectant	Temperatură congelare rapidă	Crioprotectant	Temperatură congelare finală	Depozitare
Lactobacillus brevis	Glicerol+acid glutamic sau lapte+glucoză	-80°C	Glutamat de sodiu	-196°C (azot lichid)	5-22°C
Lactobacillus hilgardii	Glicerol+acid glutamic sau lapte+glucoză	-80°C	Glutamat de sodiu	-196°C (azot lichid)	5-22°C
Lactobacillus mali	Glicerol+acid glutamic sau lapte+glucoză	-80°C	Glutamat de sodiu	-196°C (azot lichid)	5-22°C
Lactobacillus plantarum	Glicerol+acid glutamic sau lapte+glucoză	-80°C	Glutamat de sodiu	-196°C (azot lichid)	5-22°C
Leuconostoc mesenteroides	Glicerol+acid glutamic sau inozitol	-80°C	Glutamat de sodiu sau inozitol	-196°C (azot lichid)	5-20°C
Oenococcus oeni	Glicerol+acid glutamic	-80°C	Glutamat de sodiu	-196°C (azot lichid)	5-20°C

Producerea de biomasă

După selecția culturii în turbidostat, primele inoculări și fermentări sunt realizate în vase mici (<5 l), durata FML fiind de 3-7 zile. Inocularea finală are loc în recipiente de 500-2000 l iar durata FML este de 20-30 zile.

Diferențele compoziției în glucide a mediului de cultură influențează cinetica fermentării și producția de biomasă. Maicas a sugerat utilizarea unei combinații de două zaharuri (glucoză și fructoză) în mediul de cultură. Această cofermentație permite producerea de până de 8 ori mai multă biomasă comparativ cu utilizarea unei singure surse de carbon (glucoza) [12].

Cel mai bun moment pentru colectarea biomasei în vederea liofilizării este după 18-24 ore de la debutul fazei staționare [9].

Liofilizarea și conservarea culturilor

Biomasa colectată se congelează lent cu viteza de 1°C/minut până la temperatura de -17°C apoi urmează congelarea rapidă până la -80°C și uscarea în vid. La final se obține o pulbere în care bacteriile lactice sunt adsorbite pe substanța uscată.

Pentru a preveni formarea cristalelor de gheață care pot deteriora celulele de bacterii lactice se practică adăugarea agenților crioprotectori în timpul liofilizării. Cei mai eficienți agenți crioprotectori sunt acidul glutamic, laptele degresat și glicerolul.

Protocolul de liofilizare cuprinde următoarele etape:

– se prepară o suspensie de celule de bacterii lactice cu densitatea de 10^9 celule/ml viabile;

– se pregătesc crio-tuburi sterile (tuburi din material plastic cu șurub sterilizabil și garnitură de cauciuc rezistentă la îngheț) în care se introduc 1 ml glicerină 20%, ca agent crioprotector;

– se adaugă 0,5 ml suspensie de celule de bacterii lactice în fiecare tub pentru a obține o concentrație finală de $3x10^7$ celule/ml și 12-14% glicerol;

– se congelează tuburile la -80°C;

– se adaugă glutamat de sodiu sau inozitol, ca agent crioprotector până se obține o concentrație finală de 2,5% glutamat;

– se congelează rapid în vid la -196°C în atmosferă modificată (azot lichid).

În aceste condiții culturile ramân viabile pe o perioadă de 5 ani, putând fi depozitate la temperaturi de 5-20°C [5]

De cele mai multe ori după liofilizare este necesară reactivarea CML, întrucât inocularea direct în vin atrage o mortalitate ridicată a bacteriilor lactice. Reactivarea culturii se poate face dupa schema din figura 1 sau conform altor protocoale specifice [16]:

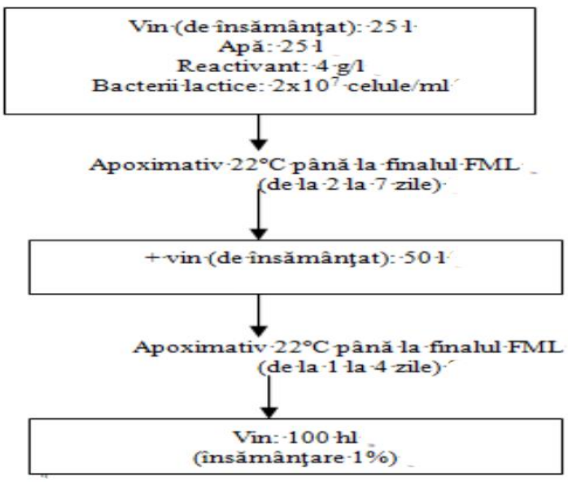


Fig. 1 Reactivarea CML liofilizate [6].

Rezultatele unor cercetări sintetizate în tabelul 4 arată că viabilitatea bacteriilor lactice crește până la 72% iar durata FML scade sub 20 zile atunci când cultura liofilizată este tratată cu un agent crioprotector adecvat (glutamatul de sodiu). Rezultatele bune se obțin dacă cultura liofilizată este reactivată înainte de

utilizare. Inozitolul este un agent crioprotector mai slab care induce o mortalitate de 40% bacteriilor lactice și prelungește durata fermentației malolactice nepermis de mult. Chiar în cazul utilizării unor preparate bacteriene cu utilizare directă (de tip MBR) e recomandabilă reactivarea înaintea utilizării. În cazul în care lipsește etapa de reactivare la preparatele bacteriene care nu sunt de tip MBR, mortalitatea bacteriilor lactice crește la 63% iar fermentația malolactică eșuează lamentabil degenerând în defecte precum înăcrirea lactică (producerea în cantități mari a acidului D-lactic).

Tabelul 4. **Succesul inoculării culturii liofilizate selectate din microflora indigenă și reușita fermentației malolactice [5, 7, 17]**

Preparat liofilizat izolat din microflora indigenă	Tratat cu agent crioprotector inozitol	Tratat cu agent crioprotector glutamat	Utilizare fără reactivare	Utilizare după reactivare
Viabilitatea bacteriilor lactice	60%	72%	37%	90%
Durata fermentației malolactice	Peste 30 zile	Sub 20 zile	Fermentație nefinalizată	Sub 15 zile

4. CONCLUZII

Biotehnologia de obținere a culturilor liofilizate prin selecția tulpinilor din microflora indigenă este complexă și nu se pretează oricărei intreprinderi de vinificație. Totuși avantajul de a produce autonom CML selectate din microflora indigenă cu o capacitate mare de adaptare la condițiile restrictive ale mediului fermentativ și fără a depinde de prețul preparatelor comerciale CML nu trebuie neglijat. Oricare tip de CML se utilizează, alegerea agentului crioprotector adecvat la liofilizare și parcurgerea protocolului de reactivare înainte de inoculare în vin sunt factorii decisivi care asigură succesul derulării FML, calitatea și stabilitatea vinului produs finit.

5. BIBILOGRAFIE

[1] Alexandre, H., Grandvalet, C., Guilloux-Beńatier, M., Remize-Barnavon, F., Tourdot-Marechal, R. *Les bactéries lactiques en enologie.* Editions Tec&Doc, Paris, Franța, 2008.

[2] Betteridge, A., Grbin, P., Jiranek, V., *Improving Oenococcus oeni to overcome challenges of wine malolactic fermentation*, Trends in Biotechnology, Volume **33**, Issue **9**, September 2015, USA, p. 547-553. https://doi.org/ 10.1016/j. tibtech.2015.06.008.

[3] Costello, P., Jordans, C., Schmidt, S., Herderich, M., Johnson, D. *Trials and tribulations of MLF: can timing of inoculation and MLF nutrients help?* Wine & Viticulture Journal, vol. **34**, Issue **1**, 2019, USA, https:// www.awri. com.au/ wpcontent/uploads/2019/01/s2057.pdf

[4] Croitoru, C., *Tratat de știință și inginerie oenologică. Produse de elaborare și maturare a vinurilor*, Editura Agir, București, România, 2009.

[5] Garcia, Lopez, M. D., Lopez-Coronado, J. M., Lopez-Ocana, L., Uruburu, Fernandez F., *Preservation of microbial strains in the wine industry* in Molecular wine microbiology, chapter 12 doi 10.1016/B978-0-12-375021-1.10012-8, 2011, USA, p. 303-318.

[6] Gerbaux, V., Nault, I., *Inseminazione del musto o del vino?* Vignevini **4,** 1994, Italia, p. 36-40.

[7] Gonzalez, R., Munoz, R., Carrascosa, A.V., *Production of wine starter cultures* in Molecular wine microbiology, chapter 11 doi 10.1016/B978-0-12-375021-1.10011-6, 2011, USA, p. 279-302.

[8] Grossmann, M., Rauhut, D., Jungwirth, S., Bercher, A., Schmitt, M., Krieger, S. A., *Bacteria starter cultures and malolactic fermentation: impact of inoculation time and cell development on MLF in Riesling wines*, In Proceedings of the Lallemand Technical Meeting on Yeast-Bacteria Interactions, 2002, Toulouse, Franta, p. 27-32.

[9] Krieger, S. A., Hammes, W. P., Henick-Kling, T., *How to use malolactic starter cultures in the winery*, Austral. New Zeal. Wine Indust. J. **8**, 1993, Noua Zeelandă, p. 153-160.

[10] Krieger-Weber, S. *Application of Yeast and Bacteria as Starter Cultures.* In: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (eds) *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and Wine*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, Germania, https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_27.

[11] Jiang, J., Sumby, K., Sundstrom, J., Grbin, P., Jiranek, V., *Directed evolution of Oenococcus oeni strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment*, Food Microbiology, Volume **73**, August 2018, USA, p. 150-159, https://www.sciencedirect.com/ science/article/pii/S074000 2017305038.

[12] Maicas, S., Gonzalez-Cabo, P., Ferrer, S., Pardo, I., *Production of Oenococcus oeni biomass to induce malolactic fermentation in wine by control of pH and substrate adition*, Biotechnol. Lett. **21**, 1999, USA, p. 349-353.

[13] Nault, I., Gerbaux, V., Larpent, J. P., Vayssier, Y., *Influence of pre-culture conditions on the ability of Leuconostoc oenos to conduct malolactic fermentation in wine*, Am. J. Enol. Vitic. **46,** 1995, USA, p. 357-362.

[14] Nielsen, J. C., Prahl, C., Lonvaud-Funel, A., *Malolactic fermentation in wine by direct inoculation with freeze-dried Leuconostoc oenos cultures*, Am. J. Enol. Vitic. **47**, 1996, USA p. 42-48.

[15] Prahl, C., Nielsen, J. C., Korsgaard, S., Lonvaud-Funel, A., *Malolactic fermentation by direct inoculation with a new freezdried culture of Leuconostoc oenos*, The 5-th International Symposium of Enology, 1995 Bordeaux, Franța.

[16] Valade, M., Laurent, M., La gestione della malolattica nella Champagne, Vignevini **4**, 1994, Italia, p. 52-57.

[17] Zhao, G., Zhang, G., *Influences of protectants, rehydration media and storage on the viability of freeze-dried Oenococcus oeni for malolactic fermentation* World J. Microbio. Biotechnol., 2009, USA, doi: 10.1007/s11274-009-0080-9.

Despre autori

Şef lucrări dr. ing. **Ionel POPESCU-MITROI**
Universitatea „Aurel Vlaicu" – Arad, România

A susținut doctoratul în 2008 cu tema "Studiul proceselor microbiologice și biochimice care definesc fermentația malolactică la vinurile obținute în podgoriile din vestul României" la Universitatea din Craiova. Este cadru didactic la Facultatea de Inginerie Alimentară, Turism și Protecția Mediului din cadrul Universității„Aurel Vlaicu" din Arad cu o experiență de 18 ani, titular al disciplinelor de Expertiză microbiologică a alimentelor și Igiena societăților agroalimentare. A publicat în calitate de autor și coautor 6 cărți de specialitate în edituri recunoscute C.N.C.S.I.S, un capitol de carte publicată în editură din străinătate, 53 articole științifice, dintre care 19 în reviste ISI/ indexate în baze de date internaționale și este coautor la elaborarea unui brevet internațional.

Conf. dr. ing. **Dana-Gina RADU**
Universitatea „Aurel Vlaicu" – Arad, România

Studiile de master și doctorat le-a efectuat în cadrul Universităţii"Dunărea de jos" din Galati, obţinând titlul de *Doctor* în *Inginerie Industrială/ Biotehnologii Alimentare* (2006). Este *Specialist in Managementul Hazardurilor Microbiologice in Alimente* - curs de specializare la Universitatea Wageningen, Olanda. Din 1998 este cadru didactic la Facultatea de Inginerie Alimentară, Turism și Protecția Mediului din cadrul Universității „Aurel Vlaicu" din Arad, titular al disciplinelor Microbiologie, Inocuitatea produselor alimentare, Managementul hazardurilor microbiologice ale produselor alimentare, Microbiologia mediului. Activitatea de cercetare desfășurată în 9 proiecte naționale şi internaționale ca responsabil de proiect, responsabil pachet de lucru, expert european/ coordonator grup experţi, sau membru, se concretizează în 50 de articole in jurnale cu referenți științifici, dintre care 25 în reviste ISI/ indexate în baze de date internaționale, 2 lucrari ISI și 2 brevete premiate UEFISCDI/CNCSIS; 30 prezentări la Conferințe Științifice Internaționale din ţară şi străinătate; 9 cărți de specialitate şi manuale în edituri recunoscute CNCSIS; 1 capitol în carte publicată în editură din străinătate; 2 brevete naționale, 3 aplicații de brevet, Câștigătoare a Mențiunii Competiției Regionale de Eco-Inovare 2014 Tehimpuls; Medalie de aur la Salonul Internațional de Invenţii şi Inovații Traian Vuia Timişoara, 2015.