

SYLWIA BONIN

## ZASTOSOWANIE MIKROORGANIZMÓW IMMOBILIZOWANYCH W WINIARSTWIE

### Streszczenie

Zastosowanie komórek immobilizowanych w fermentacji alkoholowej jest korzystne ze względów technologicznych i ekonomicznych, w porównaniu z klasycznymi technologiami z komórkami wolnymi. W porównaniu z produkcją alkoholu przeznaczonego do celów chemicznych i opałowych, w winiarstwie ważne jest, aby nośniki były bezpieczne, odporne na alkohol i nie powodowały zmian jakości produktu, a końcowa zawartość alkoholu wynosiła co najmniej 11,5% obj. W artykule przedstawiono zagadnienia dotyczące zastosowania immobilizacji w winiarstwie, gdzie mikroorganizmy unieruchomione wykorzystywane są: w ciągłej oraz okresowej, powtarzanej produkcji wina, we wtórnej fermentacji (szampanizacji), kontrolowanej fermentacji jabłkowo-mlekowej i jabłkowo-alkoholowej oraz w celu poprawy jakości sensorycznej gotowych produktów.

**Słowa kluczowe:** immobilizacja, produkcja wina, enologia, technologie fermentacji

### Wprowadzenie

W fermentacji alkoholowej zastosowanie immobilizacji ma miejsce głównie w produkcji etanolu konsumpcyjnego, chemicznego i opałowego oraz w browarnictwie w przyspieszonym dojrzewaniu piwa i produkcji piwa bezalkoholowego. Są to prace zarówno w skali laboratoryjnej, a coraz częściej, także przemysłowej. W winiarstwie immobilizacja znalazła zastosowanie w ciągłej oraz okresowej, powtarzanej produkcji wina, we wtórnej fermentacji (szampanizacji), kontrolowanej fermentacji jabłkowo-mlekowej i jabłkowo-alkoholowej oraz w celu poprawy jakości sensorycznej gotowych produktów. Jednak w skali przemysłowej drożdże immobilizowane wykorzystywane są jedynie w szampanizacji [13, 18].

### Zalety immobilizacji

Prowadzenie procesów z komórkami immobilizowanymi wiąże się z technologicznymi i ekonomicznymi korzyściami w porównaniu z tradycyjnymi procesami wykorzystującymi komórki wolne. Do korzyści tych można zaliczyć [18]:

- wydłużenie aktywności i stabilności biokatalizatora, ponieważ nośnik może działać ochronnie w przypadku zmian pH, temperatury i składu podłoża,
- zwiększenie gęstości komórek w przeliczeniu na jednostkę objętości fermentora, co prowadzi do wyższej produktywności, skrócenia czasu fermentacji oraz eliminacji fazy namnażania się komórek,
- lepsze wykorzystanie substratu, w związku z czym proces przebiega z wyższą wydajnością,
- możliwość prowadzenia procesów ciągłych,
- ograniczenie występowania zakażeń mikrobiologicznych,
- obniżenie pracochłonności i kosztów procesu, ponieważ biokatalizator wykorzystywany jest przez długi okres czasu.

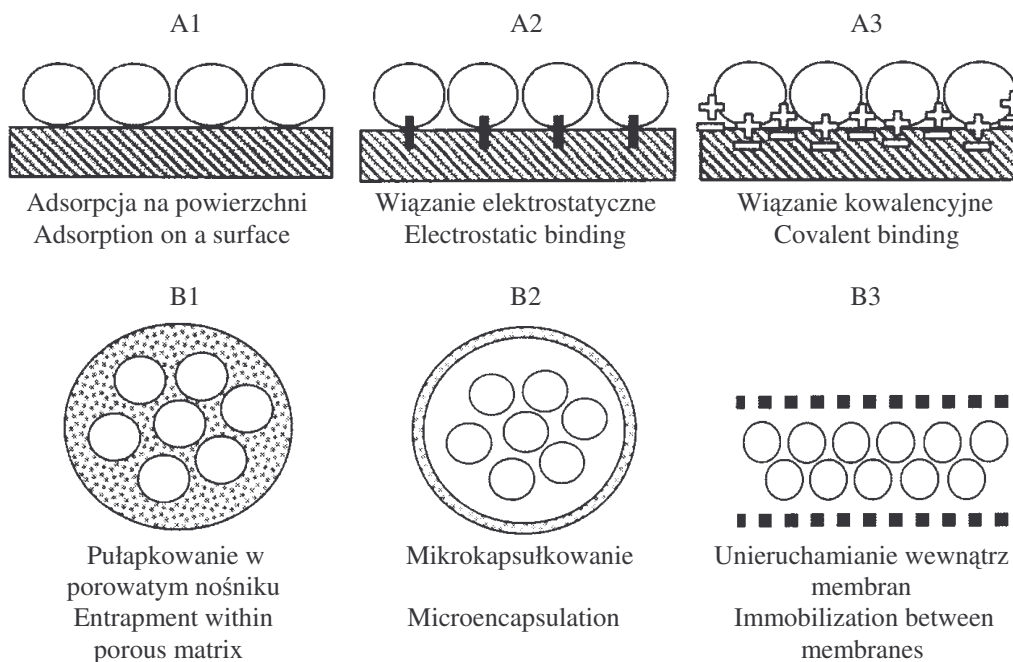
### Metody immobilizacji

W winiarstwie wykorzystywane są mikroorganizmy immobilizowane na powierzchni lub wewnątrz nośnika.

#### *Unieruchamianie na powierzchni nośnika*

Unieruchamianie na powierzchni nośnika występuje, gdy komórki wykazują naturalną zdolność przylegania do pewnych powierzchni lub innych organizmów, ewentualnie czynią to po zastosowaniu odpowiedniego chemicznego czynnika wiążącego. Jako nośniki w winiarstwie stosowane są m.in.: skały wulkaniczne (kissiris), szkło porowate, pochodne celulozy, gluten, jak również owoce. W metodzie tej mikroorganizmy unieruchamiane są na zasadzie adsorpcji lub adhezji. Podstawą immobilizacji jest oddziaływanie między nośnikiem a komórką dzięki tworzeniu wiązań: van der Waalsa, jonowych, kowalencyjnych, hydrofobowych lub też dzięki ich kombinacji (rys. 1 A). Uważa się, że w przypadku drożdży kluczową rolę w wiązaniu odgrywają oddziaływania jonowe między nośnikiem o dużej gęstości ładunków dodatnich a licznymi ujemnymi ładunkami na ścianie komórkowej [8]. Liczba komórek immobilizowanych na nośniku zależy od rodzaju nośnika [15], natomiast wydajność adsorpcji zależy od zastosowanych mikroorganizmów, ich wieku, metabolizmu i cech środowiska [16]. Zmiany składu pożywki podczas fermentacji obniżają stopień adsorpcji komórek. Ponadto może zachodzić częściowe uwalnianie komórek, które zależy głównie od szybkości przepływu fazy płynnej, turbulencji wokół powierzchni nośnika oraz od autolizy komórek niższych warstw [13]. W

przypadku unieruchamiania drożdży na powierzchni nośnika zalecane jest używanie materiału makroporowatego, o średnicy porów co najmniej czterokrotnie większej niż średnica komórek. Taka porowatość zapewnia normalny cykl życiowy drożdży - pączkowanie [16].



Rys. 1. Metody unieruchamiania komórek: A. Unieruchamianie na powierzchni nośnika, B. Unieruchamianie wewnątrz nośnika [18].

Fig.1. Methods of cell's immobilization: A. Immobilization on solid carrier, B. Immobilization within a carrier [18].

#### *Unieruchamianie wewnątrz nośnika*

Polega ono na „zamykaniu” komórek w materiałach włóknistych lub porowatych – pułapkowanie w kuleczkach żelu, zamykanie wewnątrz membran półprzepuszczalnych (rys. 1 B). Jako nośniki najczęściej stosowane są: alginiany,  $\kappa$ -karagenian, chitozan, agar, pektyna. W przypadku pułapkowania rozmieszczenie komórek w kuleczkach jest ograniczone dyfuzją substratów i tlenu przez warstwę żelu oraz wyższym, inhibującym stężeniem etanolu w części centralnej. Powoduje to, że drożdże tworzą warstwę w pobliżu powierzchni nośnika, a w części środkowej prawie nie występują [13, 18]. Zamykanie drożdży w żelach nie eliminuje przedostawania się komórek do fermentowanego podłoża. Zachodzi również pęknięcie kuleczek pod wpływem  $\text{CO}_2$  powstającego podczas fermentacji. W celu ograniczenia pęknięcia

kuleczek oraz zapewnienia maksymalnej żywotności immobilizowanych drożdży należy dobrać odpowiednią liczbę komórek w zależności od porowatości żelu i wielkości kuleczek. Ponadto celem ograniczenia ucieczki komórek z kuleczek prowadzi się utwardzanie, np. żelatyny - modyfikowaną skrobią [1]. Innym rozwiązaniem jest tworzenie płaszczu z alginianu wapnia, który ochrania kuleczki alginianowe z zamkniętymi w środku komórkami drożdży. Dzięki temu komórki, które wydostają się z żelu zatrzymują się w wolnej warstwie między kuleczką a płaszczem [11, 30]. Wykorzystywane najczęściej w fermentacji etanolowej żele alginianowe są w niewielkim stopniu przydatne do fermentacji winiarskiej, ponieważ w kwaśnym środowisku wina tracą swe właściwości mechaniczne, a przy dłuższym użyciu mogą ulegać destrukcji. Stabilność alginianu wapnia jest obniżana przez związki mające wysokie powinowactwo do jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Są to kwasy: winowy, fosforowy(V), cytrynowy i ich sole oraz jony  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ , a także związki chelatujące. Właściwości te uniemożliwiają powtórne wykorzystanie nośników, stąd ich zastosowanie jest nieekonomiczne [25]. Stwierdzono również negatywny wpływ alginianu na właściwości sensoryczne otrzymywanego wina [4]. Bardziej wytrzymałe w środowisku wina i nieoddziałujące negatywnie na jakość produktu są żele pektynowe [23].

### **Zastosowanie immobilizacji w winiarstwie**

#### *Fermentacja okresowa, powtarzana i fermentacja ciągła*

W fermentacji winiarskiej drożdże immobilizowane wykorzystywane są zarówno w procesach okresowych, powtarzanych, jak i w fermentacjach ciągłych. Prowadzone prace dotyczą doboru nośników, warunków procesu i ich wpływu na cechy wina.

W procesach okresowych, powtarzanych nośnik z unieruchomionymi drożdżami po zakończeniu fermentacji periodycznej jest przemywany 2-, 3-krotnie roztworem glukozy lub moszczem, a następnie wykorzystywany w kolejnej fermentacji. Stwarza to komórkom korzystniejsze warunki w porównaniu z procesem ciągłym, stąd takie drożdże wykazują aktywność fermentacyjną przez długi okres, np.: drożdże immobilizowane na wysuszonych rodzynekach przez ponad 4 miesiące [29], na kawałkach pigwy – w 40-okresowych fermentacjach, których łączny czas wynosił 8 miesięcy [21], a unieruchomione na delignifikowanej celulozie – w 55 kolejnych fermentacjach [6]. W cytowanych pracach uzyskiwano wytrawne wina gronowe, przy czym w kolejnych fermentacjach stopniowo obniżano temp. z 30 do 0°C. W całym zakresie temperatury produktywność była wyższa, a fermentacja zachodziła szybciej w porównaniu z procesem prowadzonym przy użyciu komórek wolnych, ponadto wino charakteryzowało się delikatnym aromatem.

Fermentację ciągłą moszczu gronowego ze stopniowym obniżaniem temp. z 30 do 5°C prowadzono z zastosowaniem drożdży psychrofilnych unieruchomionych na kawałkach jabłek [19] oraz na kawałkach pigwy [22]. W pierwszym przypadku proces trwał 95 dni, w drugim – 46 dni, a uzyskiwane wina charakteryzowały się dobrą jakością.

Do unieruchamiania drożdży stosowany jest również nieorganiczny nośnik o nazwie kissiris. Jest to porowaty, wulkaniczny minerał pochodzący z wysp greckich, który składa się z ok. 70% SiO<sub>2</sub>, 13% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> oraz innych tlenków. Drożdże unieruchomione na tym nośniku wykorzystano w trwającej 75 dni ciągłej fermentacji moszczu gronowego, ze stopniowym obniżaniem temp. z 27 do 5°C. Produkcja etanolu była wyższa w porównaniu z fermentacją klasyczną, przykładowo w temp. 7°C wzrost był 13-krotny [3]. W dalszych badaniach stwierdzono, że drożdże immobilizowane na kissiris wykazują aktywność fermentacyjną przez ponad 2,5 roku. W tym okresie unieruchomione drożdże wykorzystywano w powtarzanych, okresowych fermentacjach, a także w trwającej 64 dni fermentacji ciągłej. Temp. fermentacji wynosiła 30°C, natomiast pomiędzy poszczególnymi fermentacjami nośnik wraz z unieruchomionymi komórkami przechowywano w temp. 0°C, w roztworze rozcieńczonego moszczu. Zdaniem autorów długotrwała stabilność drożdży wynikała z biokatalitycznej, ochronnej właściwości kissiris [2].

Nośnikiem podobnym strukturalnie do kissiris jest szkło piankowe. Drożdże unieruchomione na szkle piankowym wykorzystywano w 3,5-miesięcznej ciągłej produkcji wina jabłkowego. Proces fermentacji ciągłej prowadzono przy użyciu dwóch szczepów drożdży odpornych na stosunkowo wysokie stężenie etanolu i cukru. Fermentacji poddawano nastawy zawierające ok. 320 g/cm<sup>3</sup> cukrów ogółem. W zależności od czasu pracy fermentora uzyskiwano ok. 13-17% obj. alkoholu [9].

W fermentacjach ciągłych drożdże są narażone przez cały czas trwania procesu na niekorzystne działanie etanolu, ubocznych produktów fermentacji i beztlenowego środowiska. W przypadku długotrwałej fermentacji nastawów wysokocukrowych stwierdzono, że drożdże wyizolowane z nośnika po zakończeniu pracy fermentora charakteryzowały się zróżnicowanymi kształtami, a w przypadku niektórych komórek również zmienioną strukturą wewnątrzkomórkową [10].

Należy ponadto zwrócić uwagę, że zastosowany do immobilizacji drożdży nośnik wpływa na ilość otrzymywanego alkoholu i produktywność procesu. Podczas fermentacji ciągłej prowadzonej w tych samych warunkach, z wykorzystaniem drożdży unieruchomionych na kissiris, tlenku glinu i pułapkowanych w alginianie stwierdzono, że najwyższą zawartością etanolu i produktywnością charakteryzowała się fermentacja z komórkami pułapkowanymi w alginianie, a najniższą – z unieruchomionymi na tlenku glinu. Prawdopodobnie było to związane z ochronnym dla drożdży mikrośrodowiskiem wewnątrz kuleczek, ponieważ proces prowadzono w temp. 7°C, a

szczep drożdży był wyizolowany z winogron [5]. Podczas fermentacji przebiegających z wykorzystaniem drożdży unieruchomionych na kawałkach jabłek, gruszek i pigwy najwyższą produktywność uzyskano w przypadku jabłek, a najniższą – gruszek [20].

Ważnym wyznacznikiem jakości win jest skład produktów ubocznych fermentacji. Jest on różny w zależności od tego, czy proces prowadzony jest z komórkami wolnymi, czy immobilizowanymi, a w tym ostatnim przypadku zależy również od rodzaju użytego nośnika. W winie produkowanym z drożdżami unieruchomionymi na różnych nośnikach stwierdzano wyższe ilości octanu etylu w porównaniu z fermentacją okresową z komórkami wolnymi [4, 6, 7]. W przypadku zastosowania kissiris, tlenku glinu i alginianu obserwowano mniejsze zawartości n-propanolu, alkoholu amylowego i alkoholu izobutylowego w porównaniu z fermentacją z komórkami wolnymi [4]. W przypadku zaś unieruchomienia drożdży na kuleczkach glutenu i na delignifikowanej celulozie nie zaobserwowano różnic w ilości alkoholu wyższych w porównaniu z procesem tradycyjnym [6, 7]. Szczególnie duże różnice w składzie produktów ubocznych stwierdzano w winach produkowanych z wykorzystaniem drożdży immobilizowanych na owocach (jabłka, gruszki, pigwa). Przy czym skład win był inny w przypadku zastosowania tego samego nośnika w procesie okresowym i ciągłym. Stwierdzono ponadto, że nośniki nadały winom owocowy aromat i korzystny smak, przy czym najlepszymi cechami jakościowymi odznaczały się wina produkowane z drożdżami immobilizowanymi na jabłkach [20, 21, 22].

#### *Fermentacja wtórna (szampanizacja)*

Drożdże pułapkowane znalazły zastosowanie w szampanizacji win metodą butelkową ze względu na zdolność do bardzo dobrej sedymentacji (remuage) i łatwość oddzielenia po zakończeniu fermentacji (degorgage). W procesie szampanizacji ważne jest, aby drożdże unieruchomione w nośniku nie wydostawały się na zewnątrz, stąd często stosuje się kuleczki pokryte dodatkową warstwą alginianu. Dzięki temu liczba uwalnianych komórek ulega zmniejszeniu w porównaniu z pułapkowaniem w samym alginianie wapnia. Produkty otrzymywane przy użyciu drożdży pułapkowanych są bardziej klarowne, charakteryzują się delikatniejszym perleniem i brakiem zmian w składzie chemicznym w porównaniu z produktami otrzymywanymi metodą tradycyjną, a produkcja CO<sub>2</sub> przebiega szybciej niż w procesie klasycznym [11, 30]. Zdaniem innych autorów wtórna fermentacja z drożdżami immobilizowanymi jest dłuższa, ale wykorzystanie substratów efektywniejsze. Powstający powoli CO<sub>2</sub> nie niszczy stabilności immobilizowanego systemu. Wolniejszy przebieg wtórnej fermentacji jest istotny także pod względem fizykochemicznym, ponieważ wiązanie CO<sub>2</sub> z rodnikami substancji organicznych jest trwalsze [26].



*Fermentacja jabłkowo-mlekowa i jabłkowo-alkoholowa*

Fermentacja jabłkowo-mlekowa jest procesem wtórnym i polega na przekształceniu przez bakterie mlekowe, głównie z rodzaju *Oenococcus*, *Lactobacillus*, kwasu L-jabłkowego do L-mlekowego i CO<sub>2</sub>. W procesie tym powstają także inne produkty uboczne, np. aldehyd octowy, diacetyl, octan etylu, alkohole wyższe. W konsekwencji kwasowość ogólna ulega obniżeniu, a właściwości sensoryczne i stabilność biologiczna wina polepszają się [24]. Prowadzenie fermentacji jabłkowo-mlekowej z komórkami wolnymi jest utrudnione, ponieważ bakterie są wrażliwe na warunki panujące w winie, do których zalicza się m.in. SO<sub>2</sub>, etanol, polifenole, cukry resztkowe, niskie pH, niską temperaturę i obecność bakteriofagów. W przypadku zastosowania komórek immobilizowanych mikrośrodowisko nośnika działa na komórki ochronnie [18].

W prowadzonych badaniach bakterie *Leuconostoc oenos* były unieruchamiane w sześciarach z poliakrylamidu, karagenianu i kuleczkach alginianu, które umieszczano w reaktorach kolumnowych lub w reaktorach z mieszaniem. Czas przepływu wina przez urządzenie wynosił kilka godzin i był równoważny z czasem trwania fermentacji jabłkowo-mlekowej, natomiast proces tradycyjny trwa kilka dni lub tygodni [13]. W fermentacji jabłkowo-mlekowej win czerwonych, w systemie półciągłym wykorzystano także bakterie *Oenococcus oeni* unieruchomione na celulozowych gąbkach. W ciągu 24 godz. obserwowano przekształcenie około połowy zawartego w winie kwasu jabłkowego. Bakterie wykazywały zdolności fermentacyjne także po 21 dniach przechowywania nośnika w temp. 4°C [24]. Ponadto nie stwierdzono różnic aktywności fermentacyjnej bakterii w zależności od sposobu immobilizacji. Zarówno bakterie *Lactobacillus casei* unieruchomione w kuleczkach pektynianu wapnia, jak i na powierzchni kuleczek modyfikowanego chitozanu, wykazywały o połowę większą zdolność rozkładu kwasu jabłkowego zawartego w winie Chardonnay w porównaniu z komórkami wolnymi. Ponadto komórki immobilizowane w pektynianie charakteryzowały się dobrą stabilnością fermentacyjną po 6 miesiącach przechowywania, a na powierzchni chitozanu po 2 miesiącach. Nie podano jednak warunków przechowywania unieruchomionych bakterii [17].

Zdolność przekształcania kwasu jabłkowego mają także drożdże *Schizosaccharomyces pombe* i niektóre szczepy z rodzaju *Saccharomyces*. Jednak przemiany biochemiczne są inne niż bakterii i zachodzi fermentacja jabłkowo-etanolowa. Drożdże *S. pombe* pułapkowane w kuleczkach o podwójnej warstwie alginianu zastosowano do ciągłego odkwaszania moszczu gronowego. Proces prowadzono przez 6 tygodni i w tym okresie drożdże wykazywały wysoką aktywność rozkładu kwasu jabłkowego [18].

### *Ko-immobilizacja*

Zaletą technologii z zastosowaniem komórek immobilizowanych jest możliwość ko-immobilizacji różnych rodzajów mikroorganizmów, co umożliwia przeprowadzenie dwóch rodzajów fermentacji w jednym zintegrowanym systemie. W przemyśle winiarskim ko-immobilizacja znalazła zastosowanie w produkcji cydru. W klasycznej technologii fermentacja zachodzi pod wpływem mikroorganizmów obecnych na skórkach jabłek. Przez pierwsze 2-3 tygodnie ma miejsce fermentacja alkoholowa, a następnie przekształcenie kwasu jabłkowego w mlekowy, czyli proces dojrzewania, który trwa do 8 tygodni. W przypadku fermentacji spontanicznej uzyskuje się często produkt o różnej jakości. Zastosowanie ko-immobilizacji pozwala na znaczne skrócenie czasu produkcji cydru i otrzymywanie napoju o wyrównanych cechach sensorycznych [18, 27].

W okresowej produkcji cydru zastosowano ko-immobilizację na gąbkopodobnym materiale celulozowym. W pierwszym etapie prowadzono fermentację przy użyciu unieruchomionych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, a następnie dodawano zawiesinę komórek bakterii *Lactobacillus plantarum*, które osadzały się na zawierającym już drożdże nośniku. Stwierdzono, że na jakość otrzymywanego produktu wpływał czas od rozpoczęcia fermentacji, w którym stosowano dodatek bakterii. Produkcja cydru, łącznie z dojrzewaniem, trwała cztery tygodnie, a napój zawierał więcej etanolu w porównaniu z fermentacją klasyczną i odznaczał się wysoką jakością sensoryczną [28]. Produkcję cydru można także prowadzić w sposób ciągły. W tym celu wykorzystano ko-immobilizowane w alginianie drożdże *Saccharomyces bayanus* wraz z bakteriami *Leuconostoc oenos*. Fermentacja zachodziła w ciągu kilku godzin, a w zależności od tempa przepływu uzyskiwano cydr o stosunkowo wysokim stężeniu cukru lub wytrawny. W produkcie otrzymywanym metodą ciągłą stwierdzono zmniejszenie zawartości octanu izoamylu i alkoholi wyższych oraz zwiększenie zawartości diacetylu i aldehydu octowego w porównaniu z cydrem otrzymywanym w sposób tradycyjny, jednak smak napoju był zadowalający [27].

### *Poprawa jakości sensorycznej wina*

Unieruchomione mikroorganizmy stosuje się również w celu poprawy smaku i zapachu wina. W ostatnich latach stwierdzono, że drożdże *Candida stellata* odgrywają pozytywną rolę w kształtowaniu cech jakościowych tego napoju. Wykazano możliwość zastosowania tych drożdży, unieruchomionych w alginianie, w ciągłej pre-fermentacji moszczu gronowego, który następnie poddawano okresowej fermentacji z wolnymi komórkami *Saccharomyces cerevisiae*. W efekcie uzyskano wina wysokiej jakości, które nie zawierały żadnych cukrów resztkowych, natomiast różniły się składem produktów ubocznych w zależności od tempa przepływu moszczu przez kolumnę z komórkami *Candida* [12]. W prowadzonym, w skali półtechnicznej,



procesie do fermentacji moszczu gronowego przez pierwsze 3 dni stosowano unieruchomione w alginianie komórki *Candida stellata*, następnie zaś dodawano drożdże *Saccharomyces cerevisiae*. Otrzymano wino o pozytywnym i interesującym profilu, które, w porównaniu z fermentacją bez *C. stellata*, charakteryzowało się wyższą zawartością glicerolu, kwasu bursztynowego, aldehydu octowego i octanu etylu, a niższą alkoholi wyższych [14].

### Podsumowanie

W pracach dotyczących wykorzystania mikroorganizmów immobilizowanych w winiarstwie drobnoustroje są unieruchamiane na różnych nośnikach. We wszystkich procesach z zastosowaniem immobilizacji dobry nośnik powinien charakteryzować się obojętnością w stosunku do unieruchamianych mikroorganizmów, dużą zdolnością zatrzymywania komórek, zapewniać właściwą dyfuzję substratu i produktu oraz wysoką żywotność i stabilność operacyjną immobilizowanych biokatalizatorów przez długi czas. Ponadto powinna cechować go wysoka mechaniczna, chemiczna, biologiczna i termiczna stabilność, niska cena, łatwa dostępność, możliwość regeneracji i kilkakrotnego użycia oraz możliwość zastosowania w skali przemysłowej. W winiarstwie oprócz powyższych cech bardzo ważne jest, aby nośniki były bezpieczne, odporne na alkohol i nie powodowały zmian jakości produktu. Ponadto końcowa zawartość alkoholu w winie powinna wynosić co najmniej 11,5 % obj. [6, 18].

### Literatura

- [1] Alteriis -de E., Porro D., Romano V., Parascandola P.: Relation between growth dynamics and diffusional limitations in *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as entrapped in an insolubilised gelatin gel. FEMS Microbiol. Lett., 2001, **195**, 245-251.
- [2] Argiriou T., Kanellaki M., Voliotis S., Koutinas A.A.: Kissiris-suported yeast cells: high biocatalitic stability and productivity im provement by successive preservations at 0°C. J. Agric. Food Chem., 1996, **44**, 4028-4031.
- [3] Bakoyianis V., Kanellaki M., Kaliafas A., Koutinas A.A.: Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. J. Agric. Food Chem., 1992, **40** (7), 1293-1296.
- [4] Bakoyianis V., Kanellaki M., Psarianos C., Koutinas A.A.: Low temperature, countinuous wine-making by immobilized cells: a comparative study of the effect of temperature on volatile by-products. Food Biotechnol., 1998, **12** (3), 187-207.
- [5] Bakoyianis V., Koutinas A.A., Agelopoulos K., Kanellaki M.: Comparative study of kissiris,  $\gamma$ -alumina and calcium alginate as supports of cells for batch and continuous wine-making at low temperatures. J. Agric. Food Chem., 1997, **45**, 4884-4888.
- [6] Bardi E.P., Koutinas A.A.: Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low-temperature wine making. J. Agric. Food Chem., 1994, **42**, 221-226.
- [7] Bardi E.P., Koutinas A.A., Psarianos C., Kanellaki M.: Volatile by-products formed in low-temperature wine-making using immobilized yeast cells. Process Biochem., 1997, **32** (7), 579-584.

- [8] Bekers M., Ventina E., Karsakevich A., Vina J., Rapoport A., Upite D., Kaminska E., Linde R.: Attachment of yeast to modified stainless steel wire spheres, growth of cells and ethanol production, *Process Biochem.*, 2000, **35**, 523-530.
- [9] Bonin S., Wzorek W.: Porównanie ciągłych fermentacji winiarskich prowadzonych przy użyciu dwóch szczepów drożdży immobilizowanych na szkle piankowym. *Acta Scien. Polon., Technol. Aliment.*, 2004, **3 (2)**, 83-93.
- [10] Bonin S., Wzorek W.: Wpływ długotrwałej ciągłej fermentacji winiarskiej na morfologię drożdży immobilizowanych na szkle piankowym. *Biotechnologia*, 2003, **4 (63)**, 167-181.
- [11] Busova K., Magyar T., Janky F.: Effect of immobilized yeasts on the quality of bottle-fermented sparkling wine. *Acta Aliment.*, 1994, **23 (1)**, 9-23.
- [12] Ciani M., Ferraro L.: Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *J. Appl. Microbiol.*, 1998, **85**, 247-254.
- [13] Divies Ch., Cachon R., Cavin J.F. Prevost H.: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Rev. Biotech.*, 1994, **14 (2)**, 135-153.
- [14] Ferraro L., Fatichenti F., Ciani M.: Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.*, 2000, **35 (11)**, 25-1129.
- [15] Fujii N., Sakurai A., Onjoh K., Sakakibana M.: Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. *Process Biochem.*, 1999, **34**, 147-152.
- [16] Klein J., Ziehr H.: Immobilization of microbial cells by adsorption. *J. Biotechnol.*, 1990, **16**, 1-16.
- [17] Kosseva M., Beschkov V., Kennedy J.F., Lloyd L.L.: Malolactic fermentation in Chardonnay wine by immobilized *Lactobacillus casei* cells. *Process Biochem.*, 1998, **33 (8)**, 793-797.
- [18] Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A.: Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 377-397.
- [19] Kourkoutas Y., Douma M., Koutinas A.A., Kanellaki M., Banat I.M., Marchant R.: Continuous winemaking fermentation using quince-immobilized yeast at room and low temperatures. *Process Biochem.*, 2002, **39**, 143-148.
- [20] Kourkoutas Y., Kanellaki M., Koutinas A.A., Tzia C.: effect of fermentation conditions and immobilization supports on the wine making. *J. Food Engin.*, 2005, **69**, 115-123.
- [21] Kourkoutas Y., Komaitis M., Koutinas A.A., Kaliafas A., Kanellaki M., Marchant R., Banat I.M.: Wine production using yeast immobilized on quince at temperatures between 30 and 0°C. *Food Chemistry*, 2003, **82**, 353-360.
- [22] Kourkoutas Y., Koutinas A.A., Kanellaki M., Banat I.M., Marchant R.: Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. *Food Microbiol.*, 2002, **19**, 127-134.
- [23] Krasny S., Malik F., Kozankova J., Nahalka J., Minarik E.: Immobilisierte Hefen im Gärungsprozeß von Apfelmost. *Mitt. Klosterneuburg*, 1993, **43**, 139-142.
- [24] Maicas S., Pardo I., Ferrer S.: The potential of positively-charged cellulose sponge for malolactic fermentation of wine, using *Oenococcus oeni*. *Enz. Microb. Technol.*, 2001, **28**, 415-419.
- [25] Malik F., Krasny S., Nahajka J., Minarik E.: Immobilisierte Hefen im Prozeß der sekundären Wiengärung. *Mitt. Klosterneuburg*, 1993, **43**, 8-11.
- [26] Malik F., Smogrovicova D., Halama D., Pach L.: Zur Charakterisierung einiger Eigenschaften immobilisierter Weinhefen. 2. Mitteilung: Untersuchung zur Respiration immobilisierter Zellen. *Mitt. Klosterneuburg*, 1990, **40**, 209-212.
- [27] Nedovic V.A., Durieux A., van Nedervele L., Rosseels P., Vadegans J.: Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enz. Microb. Technol.*, 2000, **26 (9/10)**, 834-839.

- [28] Scott J.A., O'Reilly A.M.O.: Co-immobilization of selected yeast and bacteria for controlled flavour development in an alcoholic cider beverage. *Process Biochem.*, 1996, **31** (2), 111-117.
- [29] Tsakiris A., Bekatorou A., Psarianos C., Koutinas A.A., Marchant R., Banat I.M.: Immobilization of yeast on dried raisin berries for use in dry white wine-making. *Food Chem.*, 2004, **87**, 11-15.
- [30] Yokotsuka K., Yajima M., Matsudo T.: Production of bottle-fermented sparkling wine using yeast immobilized in double-layer gel beads or strands. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1997, **48** (4), 471-481.

## APPLICATION OF IMMOBILIZED MICROORGANISMS IN WINE-MAKING

### S u m m a r y

Cell immobilization in alcoholic fermentation is a very beneficial due to its attractive technical and economic advantages compared to the conventional free cell system. However, the wine-making compared to fuel or chemical alcohol production has some additional prerequisites: a final alcohol content should be at least 11.5% v/v, the carrier must be food grade purity and must not affect product quality. This review describes issues concerning cell immobilization in wine-making, where immobilized microorganisms are used: repeated batch fermentation, continuous fermentation, production of sparkling wine ("champanois"), malolactic fermentation, cider-making and improvement of wine quality.

**Key words:** immobilization, wine-making, oenology, fermentation technology ☒