

STUDIUL MICROBIOLOGIC ȘI BIOTEHNOLOGIC AL TULPINILOR DE LEVURI IZOLATE LA FERMENTAREA SPONTANĂ A STRUGURILOR DIN SOIUL DE STRUGURI CU BOABE NEGRE „CODRINSCHII”

CZU: 663.252.6:579.6

DOI: <https://doi.org/10.52673/18570461.23.3-70.09>Doctor habilitat în tehnică, profesor universitar **Nicolae TARAN**

E-mail: taraninvv@yahoo.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1683-0378>Doctor în tehnică, conferențiar cercetător **Olga SOLDATENCO**

E-mail: soldatenco Olga1987@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7443-0757>Doctor în tehnică, conferențiar cercetător **Victoria ADAJUC**

E-mail: adajuc.victoria@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5878-101X>

IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologii Alimentare

MICROBIOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL STUDY OF YEAST STRAINS ISOLATED DURING SPONTANEOUS FERMENTATION OF BLACK GRAPE VARIETY "CODRINSCHII"

Summary. An important task in the field of wine microbiology is obtaining local yeast strains that can easily adapt to the specific environmental conditions, ferment the carbohydrates in the must, and produce natural wines with high organoleptic qualities. This work presents the results of microbiological research related to the isolation and selection of local yeast strains for the production of dry red wines. The isolated yeast strains were tested to identify those that could be used to produce wines with typical characteristics. Based on the assessment of biochemical and technological indices of 15 yeast strains isolated from the must of the "Codrinschii" variety, 9 yeast strains were selected for the production of dry red wines.

Keywords: grape must, isolation, selection, local strains, technological indices, red wines.

Rezumat. O sarcină importantă în domeniul microbiologiei vinului este obținerea levurilor locale care să se adapteze ușor la condițiile mediului dat, să fermenteze glucidele din must și să contribuie la obținerea vinurilor naturale cu un șir de calități organoleptice înalte. În lucrare sunt prezentate rezultatele cercetărilor microbiologice privind izolarea și selectarea tulpinilor de levuri locale destinate producerii vinurilor roșii seci. Tulpinile de levuri izolate au fost testate în scopul identificării tulpinilor care ar putea fi utilizate pentru obținerea vinurilor cu însușiri de tipicitate. În baza aprecierii indicilor biochimici și tehnologici a 15 tulpini de levuri, izolate din mustul soiului „Codrinschii”, au fost selectate 9 tulpini de levuri de perspectivă pentru producerea vinurilor roșii seci.

Cuvinte-cheie: must de struguri, izolare, selectare, tulpini locale, indici tehnologici, vinuri roșii.

INTRODUCERE

Izolarea și selectarea tulpinilor de levuri locale constituie un subiect de mare interes în biotehnologie, unul esențial pentru obținerea de produse alimentare de calitate superioară. Precizăm că tulpinile locale de levuri sunt cele care se găsesc în mod natural într-o anumită regiune sau loc, fiind adaptate la condițiile specifice de mediu și la substraturile de creștere [1; 2].

În ultimii ani, cercetătorii din toată lumea acordă o atenție sporită izolării și selectării tulpinilor locale de levuri pentru a le folosi în diferite procese bioteh-

nologice. Studiile efectuate au arătat că tulpinile locale de levuri prezintă o activitate enzimatică și o capacitate fermentativă mai mare decât cele comerciale, ceea ce le face atractive pentru utilizare în diverse domenii. Metodele de izolare a tulpinilor locale de levuri se bazează pe colectarea probelor din mediul natural, însămânțarea probelor pe medii nutritive specifice, izolarea în cultură pură a tulpinilor de levuri și caracterizarea fiziologo-biochimică a tulpinilor izolate. Selectarea tulpinilor locale de levuri se realizează în urma analizei performanțelor acestora în condiții specifice, precum și a analizei caracteristicilor lor biochimice și genetice [3-6].

Tulpinile locale de levuri selectate pot fi utilizate la producerea alcoolului, vinurilor, acidului lactic și/sau a enzimelor. Studiile efectuate în acest domeniu au demonstrat că utilizarea tulpinilor locale de levuri contribuie la îmbunătățirea calității și valorii produselor obținute [7-10].

MATERIALE ȘI METODE

Cercetările au fost efectuate în cadrul Laboratorului „Biotehnologii și Microbiologia Vinului” al IP Institutul Științifico-Practic de Horticultură și Tehnologie Alimentare.

Probele de struguri au fost prelevate în zona de sud al Moldovei, din satul Pleșeni, raionul Cantemir, centrul vitivinicol „Tigheci”, în luna octombrie 2022. Din plantațiile de struguri de soiul cu boabe negre „Codrinschii” au fost prelevați struguri și obținut must cu următorii indici inițiali: concentrația în masă a zaharurilor – 244 g/dm³, acizii titrabili – 7,1 g/dm³, pH=3,24. Fermentarea spontană a mustului a decurs în condiții de laborator în vase cu volum de 0,3 L, începând cu a 3-a zi după prelucrarea strugurilor. Concentrația în masă a zaharurilor în must a fost determinată prin metoda densimetrică, conform GOST 13192-73. Concentrația în masă a acidității titrabile s-a stabilit prin metoda aprobată de OIV. La determinarea indicelui pH s-a utilizat metoda potențimetrică la pH-metrul Metler Toledo. Studiul microbiologic s-a efectuat conform instrucțiunii privind controlul microbiologic al producției vinicole în vigoare (IC MD 67-42582515-:2010) și a surselor bibliografice microbiologice existente în industria vinicolă [11; 12].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Izolarea tulpinilor de levuri locale a fost realizată începând de la o singură celulă, prin metoda diluțiilor succesive, însămânțarea pe medii nutritive specifice fiind efectuată prin tehnica epuizării ansei și izolarea în cultură pură (figura 1).



Figura 1. Însămânțarea levurilor prin tehnica ansei epuizate pentru obținerea culturilor pure.

În urma cercetărilor, din must au fost izolate 15 tulpini de levuri și, pentru a le stabili gradul de puritate, s-a efectuat microscopia culturilor cercetate.

La determinarea caracteristicilor morfologice și fiziologice ale levurilor izolate și identificarea indicilor taxonomici cheie este necesar de a respecta un șir de condiții de examinare, care permit o caracterizare amplă a tulpinilor și determinarea exactă a categoriilor sistematice (gen, specie) ale tulpinilor de levuri studiate.

În scopul stabilirii dimensiunilor celulelor levurilor izolate, a fost efectuată microscopia culturilor cercetate. Tulpinile de levuri au fost incubate preventiv timp de trei zile pe mediu nutritiv (must de struguri) la o temperatură de 28 °C. În continuare s-au calculat dimensiunile a 100 de celule din fiecare tulpina de levuri. Este cunoscut faptul, că dimensiunile tulpinilor de levuri variază de la 1,5 până la 25 μm, ceea ce este specific pentru aceste microorganisme [11].

Analiza microscopică a levurilor oferă date despre puritatea tulpinilor, uniformitatea, omogenitatea și modul de înmugurire a celulelor. În urma cercetărilor microscopice s-a constatat că celulele tulpinilor studiate diferă după formă și dimensiuni, iar dimensiunile variază de la 3,5 până la 8 μm (figura 2).

De asemenea, s-a stabilit că celulele tulpinilor studiate sunt de tip eucariot și se află în stare de înmugurire. Testele de identificare conform Kudreavțev [11] au arătat că toate 15 tulpini izolate aparțin genului *Saccharomyces*.

Din literatura de specialitate se cunoaște că levurile din genul *Saccharomyces* au forma celulei rotundă sau elipsoidală, celulele levurilor din genul *Torulopsis* au formă sferică, iar forma de lămâie sau cilindrică este caracteristică pentru celulele genurilor *Hanseniaspora*, *Kloeckera*. S-a stabilit că levurile studiate nu formează micelii reale, toate se înmulțesc pe cale vegetativă prin înmugurire multilaterală și sexuat prin spori, ceea ce confirmă faptul că aceste tulpini aparțin genului *Saccharomyces*. În urma evaluării proprietăților morfologice, fiziologice și de reproducere s-a constatat că culturile de levuri noi izolate din microflora

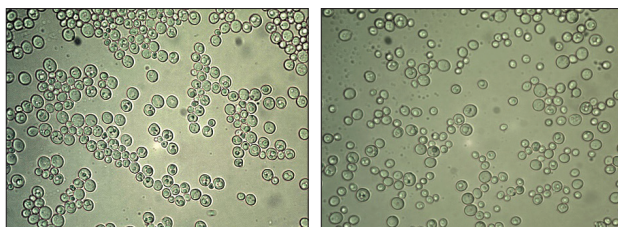


Figura 2. Imaginea microscopică a tulpinilor de levuri din genul *Saccharomyces* cu formă distinctă rotundă sau sferică.

indigenă se caracterizează prin celule de levuri uniforme și sunt microbiologic viabile.

Pentru identificarea speciilor tulpinilor de levuri care aparțin genului *Saccharomyces* este necesar de a stabili proprietățile fiziologice de bază, și anume metabolismul culturilor noi izolate, prin metoda de studiere a fermentării și asimilării selective a glucidelor. Conform taxonomiei Kudreașev, în calitate de mediu nutritiv a fost utilizat autolizatul de levuri (1:10) cu adăugare a câte 2 % din fiecare dintre glucidele studiate (lactoză, rafinoză, zaharoză, galactoză, maltoză, glucoză, xiloză, arabinoză). Această testare constituie cheia identificării celor mai frecvente specii de levuri *Saccharomyces*.

Studiul fermentării și asimilării selective a glucidelor a determinat că au fost izolate și identificate 15 tulpini *cerevisiae*. Tulpinile de levuri izolate au fost testate în scopul identificării tulpinilor care pot contribui la obținerea vinurilor cu însușiri de tipicitate.

În testul preliminar, pentru selectarea tulpinilor de levuri au fost evaluați așa parametri tehnologici ca:

rezistența la alcool, rezistența la SO₂, rezistența la Cu, rezistența la frig, abilitatea de a forma spuma, activitatea β-glucozidazică, factorul Killer. În consecință au fost selectate 9 tulpini de levuri locale din centrul vitivinicol „Tigheci”.

În testul de evaluare a caracteristicilor calitative, efectuat în laborator, cu utilizarea mediilor nutritive selective, a fost cercetată capacitatea tulpinilor de levuri selectate de a produce hidrogen sulfurat, acid acetic și apreciată activitatea β-glucozidazică. Rezultatele testărilor de laborator a tulpinilor de levuri izolate din centrul vitivinicol „Tigheci” sunt prezentate în tabelul 1. Constatăm astfel că majoritatea tulpinilor de levuri izolate sunt rezistente la alcool (de la 10 % vol. până la 14 % vol.), excepția constituind circa 27 % dintre levuri care nu se dezvoltă la atingerea concentrației alcoolului de 14 % vol. Rezistența la concentrații înalte de SO₂ a fost depistată la 100 % de levuri studiate.

Rezistența tulpinilor de levuri izolate la concentrații înalte de cupru a arătat că prezența acestuia nu influențează negativ asupra activității fermentative

Tabelul 1

Indicii biochimici și tehnologici ai tulpinilor de levuri izolate în centrul vitivinicol „Tigheci” (anul 2022)

Tulpina de levuri	Caracteristici tehnologice											Caracteristici calitative		
	Rezistența la alcool			Rezistența la SO ₂ , mg/L		Rezistența la Cu, μmol/L		Flocularea	Spumarea*	Fenotip*	Rezistența la frig	Producerea H ₂ S*	Formarea acidului acetic	Activitatea β-glucozidazică
	10 %	12 %	14 %	100	150	200	300							
Tulpini de levuri izolate din mustul „Codrinscii”														
1	+	+	-	+	+	+	+	+	++	N	+	++	-	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	++	N	+	-	-	+
3	+	+	+	+	+	+	+	-	++	N	+	-	-	+
4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	N	+	-	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	++	N	+	+/-	-	+
6	+	+	-	+	+	+	+	+	+	N	-	+/-	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S	+	+/-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	++	S	+	-	-	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	++	N	+	-	-	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N	+	+/-	-	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	++	N	-	-	+	+
12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	S	-	-	-	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	N	+	+/-	-	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+	++	N	+	-	-	+
15	+	+	-	+	+	+	+	-	++	S	+	-	-	+

*Notă: Spumare: + (fără spumare), ++ (spumare medie), +++ (spumare sporită); Fenotip: S (sensibil), N (neutru); producerea H₂S: + (se produce), - (nu se produce); +/- (nesemnificativ).

a tulpinilor studiate. De asemenea, a fost stabilit că 93 % dintre tulpinile cercetate au format foarte puțină spumă în primele 24-48 de ore de fermentare, 5 tulpini fiind chiar incluse în categoria de levuri „fără spumă”.

Cercetările efectuate și rezultatele obținute în baza acestui studiu au demonstrat că 73 % dintre tulpinile de levuri izolate din centrul vitivinicol „Tigheci” sunt de fenotip *Neutru*, adică nu pier în prezența tulpinilor de fenotip *Killer* și nu suprimă activitatea tulpinilor de fenotip *Sensibil*. Este cunoscut că factorul *Killer* constituie un indice foarte important pentru levuri, deoarece el este activ în diferite condiții de pH.

Evaluarea caracteristicilor tehnologice arată că 100 % de levuri au activitatea β -glucozidazică, dar această activitatea scade cu aproximativ 33 % la indicele pH între 2,8-3,5.

Studiile realizate au stabilit că 86 % dintre levurile izolate produc concentrațiile scăzute de acid acetic. Acest parametru poate varia în funcție de tulpină, concentrația zaharurilor din must, temperatura de fermentare. Selectarea levurilor cu capacitate scăzută de formare a acestui acid este foarte importantă pentru caracteristicile organoleptice ale vinului.

Formarea sau nu a H_2S este legată în mare măsură de prezența sau absența în must a aminoacizilor cu sulf. Rezultatele obținute au demonstrat că circa 40 % dintre levurile izolate produc H_2S . Astfel, în baza rezultatelor obținute și a aprecierii comparative a diferitor indici au fost selectate ca fiind de perspectivă pentru vinificație tulpinile de levuri izolate din mustul „Codrinschii”: nr. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 și 14.

CONCLUZII

Din mustul soiului cu boabe negre „Codrinschii” au fost selectate și izolate în cultură pură 15 tulpini de levuri, determinate conform testelor de identificare taxonomică după Kudreavțev ca fiind din genul *Saccharomyces cerevisiae*.

În baza aprecierii indicilor biochimici și tehnologici a 15 tulpini de levuri, izolate din mustul soiului „Codrinschii”, au fost selectate 9 tulpini de levuri de perspectivă pentru producerea vinurilor roșii seci.

BIBLIOGRAFIE

1. Lemos Junior WJF, de Morais MA Jr, de Morais Junior MA. Isolation and selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for champagne production. In: Brazilian Journal of Microbiology. 2016, 47(4): 913-921.
2. de Barros Pita W, de Morais MA Jr, de Morais MA. Identification and selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from the Ferreira wine region for winemaking. In: Annals of Microbiology. 2015, 65(4): 2037-2044.
3. López-Gómez A, Cordero-Otero R, García-Ribera R, Querol A. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. In: Applied and Environmental Microbiology. 2010, 76(19): 6660-6667.
4. Querol A, Fernández-Espinar MT, del Olmo M, Barrio E. Adaptive evolution of wine yeast. In: International Journal of Food Microbiology. 2003; 86(1-2): 3-10.
5. Pizarro F, Baeza M, Bravo N, Hernández C, Cordero-Bueso G, et al. Development of a new polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method for identification of non-*Saccharomyces* yeasts in cider. In: Food Microbiology. 2016, 60: 70-77.
6. Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Ortiz-Muñiz B, García-Garibay M, et al. Isolation and characterization of non-*Saccharomyces* yeasts present during spontaneous fermentations of Albariño wine. In: International Journal of Food Microbiology. 2009, 131(2-3): 115-120.
7. Duarte FL, Pimentel L, Almeida MJ, Teixeira JA. Ethanol tolerance of new potential probiotic *Lactobacillus* strains. In: International Journal of Food Microbiology. 2010, 144(1): 102-107.
8. Capozzi V, Garofalo C, Chiriatti MA, Grieco F, Spano G. Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. In: Microbiological Research. 2015, 181: 75-83.
9. Xiao X, Xu Y, Zhang Y, Wang Z, Lu J. Evaluation of the fermentation characteristics and probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. In: LWT-Food Science and Technology. 2019, 103: 82-89.
10. Lachance MA. Yeast biodiversity: how many and how much? Yeast. 2015, 32(1): 17-22.
11. Bur'yan N. Prakticheskaya tekhnologiya vinodeliya. Simferopol': Tavrida, 2003. 560 p.
12. Soldatenko O. Bazele științifice și practice ale utilizării levurilor în oenologie. Chișinău: Print-Caro. 2021, 184 p.

NOTĂ. Cercetările au fost efectuate în cadrul Programului de stat, proiectul 20.80009.5107.05 *Valorificarea la scara industrială a potențialului oenologic al soiurilor și clonelor de struguri asanate de selecție nouă și locale pentru fabricarea producției vinicole competitive pe piețele internaționale.*