

PLAN SECTORIAL-ADER 2022

Contractor: *Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie, Valea Calugareasca*

Obiectivul general: *ADER*

Contract: *7.1.2/2019*

Anul inceperii: *2019* Anul finalizarii: *2022*

Denumirea proiectului: **SELECTIA, CONSERVAREA SI VALORIFICAREA BIODIVERSITATII LEVURILOR DIN MICROBIOTA VITICOLA ZONALA**

Denumirea fazei nr. 2./2020: **Identificarea tulpinilor de drojdii, potential valoroase in procesul de vinificatie**

Durata (luni): 37

Persoana de contact (Directorul de proiect):

Dr. biolog. Elena BRINDUSE

Date contact (tel/fax, e-mail):

*0244401901/0244401902,
elabrinduse@gmail.com*

INSTITUTII IMPLICATE IN DERULAREA PROIECTULUI

COORDONATOR	Institutul de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultura si Vinificatie Valea Calugareasca (ICDVV Valea Calugareasca)
PARTENER 1	Stațiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Bujoru (SCDVV Bujoru)
PARTENER 2	Stațiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Iasi (SCDVV Iasi)
PARTENER 3	Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Bioresurse Alimentare (IBA București)

PROIECTUL NR. 7.1.2

Obiectivul general

- **Mentinerea si gestionarea diversității si a dinamicii microbiotei levuriene în relatie cu calitatile senzoriale ale vinului.**

Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului

- **Realizarea unei Baze de date asociată microflorei viticole specifice arealelor viticole nationale;**
- **Rezultate privind reactivarea tulpinilor de drojdii existente în colectiile de germoplasmă levuriană;**
- **Rezultate privind performantele metabolice si enologice ale tulpinilor de drojdii in anumite conditii de crestere; Caracterizarea biodiversității drojdiilor în areale viticole consacrate;**
- **Rezultate privind testarea tulpinilor selectate la nivel de microvinificatie si analiza fizico-chimică si organoleptică a vinurilor obtinute;**
- **Realizarea unei colectii nationale de drojdii autohtone *Saccharomyces* si non – *Saccharomyces* de catre Conducătorul de proiect în scopul conservării, la nivel national, a biodiversitatii drojdiilor de vinificatie;**
- **Promovarea și diseminarea rezultatelor obtinute.**

PROIECTUL NR. 7.1.2/ FAZA 2

Obiectivul fazei

- Evaluarea performanțelor metabolice și enologice ale tulpinilor de drojdie în anumite condiții de creștere.

Rezultate preconizate pentru atingerea obiectivului fazei

- Fișe de caracterizare a tulpinilor de drojdie *Saccharomyces* din punct de vedere al proprietăților fermentative și metabolice;
- Fișe de caracterizare a tulpinilor de drojdie *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* din punct de vedere al activității enzimaticice extracelulare;
- Culturi de drojdie *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* simple, duble sau/si secvențiale.

REZULTATE OBTINUTE

Activitatea 2.1

- Testarea in conditii de laborator a viabilitatii celulare;
- Screening calitativ pentru evidentierea activitatii enzimaticice extracelulare
- Caracterizarea metabolica a drojdiilor de vinificatie

PROVENIENTA TULPINILOR DE DROJDII

Origine: colectiile de microorganisme înființate la nivelul unităților partenerere

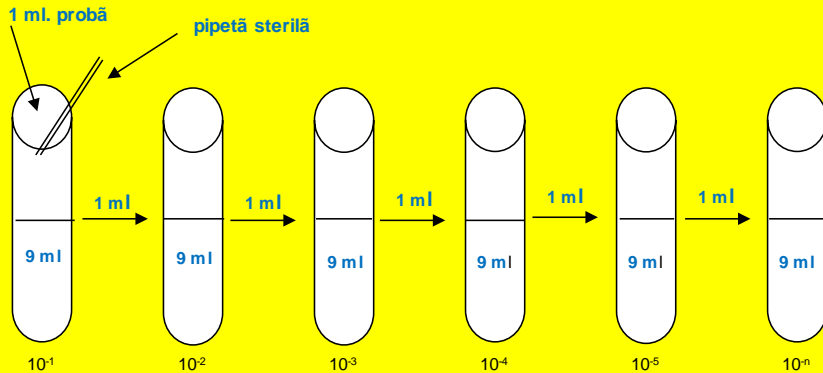
Nr. crt.	Tulpina de drojdie (Cod)	Specia	Proveniență
1	21; 23; 24; 26; 28; 29; 30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Izolată din mustul de Pinot noir la mijlocul fermentatiei (plantatie conventională)
2	33; 34; 35; 36; 37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Izolată din mustul de Pinot noir la mijlocul sau la sfârșitul fermentatiei (plantatie conventională)
3	52; 76; 77; 79		Izolată din mustul de Pinot noir la mijlocul fermentatiei (momentul 1) (plantatie ecologică)
4	137		Izolată de pe suprafata boabelor de strugure soiul Cabernet Sauvignon (plantatie conventională)
			Non Saccharomyces -
1	1; 5; 6	<i>Candida lusitanae</i>	Izolată de pe suprafata boabelor de strugure soiul Pinot noir (plantatie conventională)
2	47	<i>Torulaspora rosei</i>	Izolată de pe suprafata boabelor de strugure, soiul Pinot noir (plantatie conventională)
3	56; 57	<i>Candida utilis</i>	Izolată din mustul de Cabernet Sauvignon inceputul sau mijlocul fermentatiei (plantatie conventională)
4	136	<i>Candida sphaerica</i>	Izolată din mustul de Cabernet Sauvignon la sfârșitul fermentatiei (plantatie conventională)
5	75	<i>Torulaspora rosei</i>	Izolată din must in fermentatie tumultuoasă, soiul Cabernet Sauvignon
6	20 b	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Izolată din must in fermentatie tumultuoasă

ICDVV Valea Calugareasca

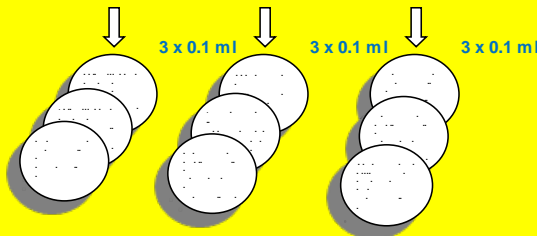
REZULTATE OBTINUTE

Testarea in conditii de laborator a viabilitatii celulare

1 Diluarea probei prin tehnica dilutiilor zecimale



2 Însământarea din dilutiile 10^{-1} 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} si 10^{-6}



3 Notarea si incubarea plăcilor la termostat 24 - 120 h

4 Calcularea numărului de celule vii din probă sub formă de unități

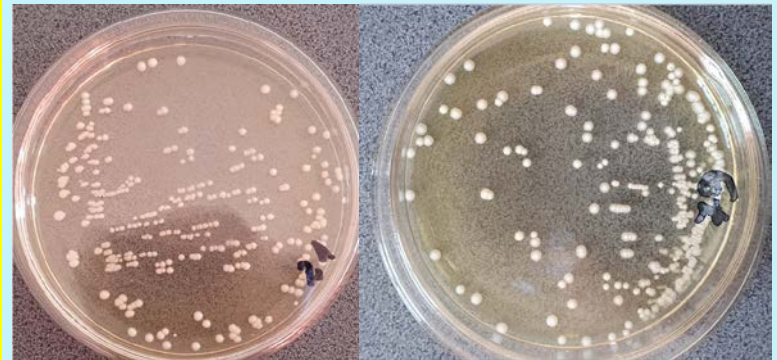
UFC = $m \times c \times 10$ în care:
 m = media aritmetică a coloniilor numărate pe 3 plăci însământate din aceeași dilutie
 c = inversul dilutiei din care s-a făcut însământarea;

După 6 ore de cultură

UFC/mL = 7.2×10^3 si 6.2×10^5

După 48 de ore de cultură

UFC/mL = 9.1×10^5 si 7.8×10^7



➤ **REZULTATE OBTINUTE**

➤ **Screening calitativ pentru evidentierea activitatii enzimaticice extracelulare**

67 de tulpini de drojdii din grupa *Saccharomyces*

25 de tulpini din grupa non-*Saccharomyces*, genurile *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rodotorula*, *Torulaspota*.

Tulpinile au fost testate pentru activitate β -glucozidazică, esterazică, preteazică si pectinazică, lipazică.

Analiza β -glucozidazei a fost realizată in conformitate cu metoda descrisă de Fernanda Gaensly si col., (2015), analiza esterazei a fost realizată prin utilizarea unui mediu de cultură recomandat de Slifkin, (2000), proteaza a fost determinată prin metoda descrisă de Comitini et al. (2011), iar pectinaza a fost determinată pe baza producerii de polygalactouronază in conformitate cu metoda descrisă de Strauss M.L.A. si col., (2001).

Interpretarea rezultatelor

Gradul de crestere a coloniilor	Interpretare
0 mm	fără activitate enzimatică
1.0 – 2.0 mm	activitate foarte scăzută
2.1 – 3.0 mm	activitate scăzută
3.1– 4.0 mm	activitate intensă
> 4.0 mm	activitate foarte intensă

REZULTATE OBTINUTE

Screening calitativ pentru evidentierea activitatii enzimatic extracelulare

Atât tulpinile de drojdii *Saccharomyces* cât și cele non-*Saccharomyces* au prezentat activitate enzimatică extracelulară pentru cel puțin două enzime.

Intensitatea activității enzimatic extracelulară înregistrată
la tulpinile de drojdii *Saccharomyces* (CO – ICDVV Valea Calugareasca)

Enzima	Tulpini pozitive		Fără activitate		Activitate foarte scăzută		Activitate scăzută		Activitate intensă		Activitate foarte intensă	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
β Glucozidază	13	76.47	4	23.53	9	52.94	4	23.53	0		0	
Esterază	16	94.12	1	5.88	5	29.41	2	11.76	7	41.18	2	11.76
Protează	15	88.24	2	11.76	4	23.53	2	11.76	2	11.76	7	41.18
Pectinază	13	76.47	4	23.53	5	29.41	8	47.06				

REZULTATE OBTINUTE

Screening calitativ pentru evidentierea activitatii enzimatice extracelulare

Fisă de caracterizare a drojdiilor non - *Saccharomyces* din punct de vedere al activității enzimatice extracelulare (CO – ICDVV Valea Calugareasca)

Tulpina de drojdie (Cod)	Activitate enzimatică extracelulară			
	β Glucozidază	Esterază	Protează	Pectinază
1	+	+	+	-
5	+	+	++++	+
6	-	+	+	+
47	+++	++	+	-
56	+	++++	+	-
57	+	+	++	+
136	+	+	++	-
75	-	++++	+	+
20 b	-	++	+++	-

Legendă: - fără activitate; + activitate foarte scăzută; ++ activitate scăzută; +++ activitate intensă; ++++ activitate foarte intensă.

REZULTATE OBTINUTE

Screening calitativ pentru evidentierea activitatii enzimatice extracelulare

Fisă de caracterizare a drojdiilor *Saccharomyces* din punct de vedere al activității enzimatice extracelulare (P1 – SCDVV Bujoru)

Tulpina de drojdie (Cod)	Activitate enzimatică extracelulară			
	β Glucozidază	Esterază	Protează	Pectinază
12; 28; 50; 53; 60; 69; 101	-	+	+	++
5; 40; 41; 55; 57; 58; 63; 71; 72	-	-	+	+
49	+	+	+	+
61; 93	+	-	+	+

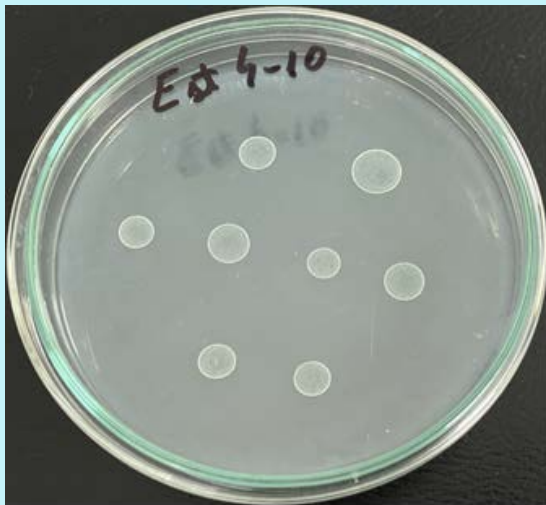
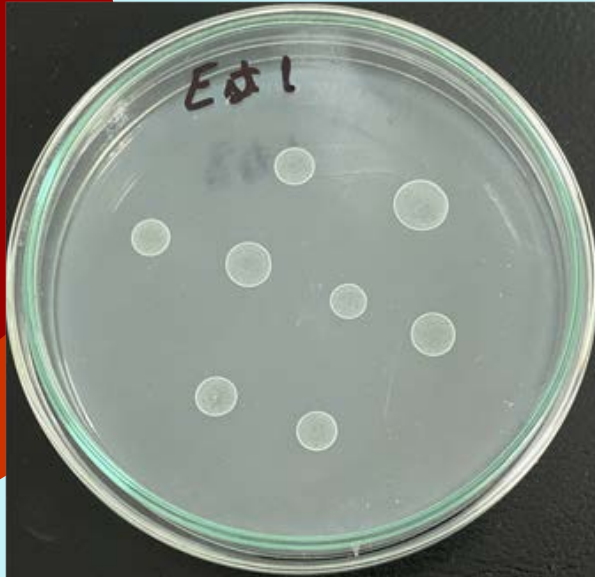
Legendă: - fără activitate; + activitate foarte scăzută; ++ activitate scăzută; +++ activitate intensă; ++++ activitate foarte intensă.

Intensitatea activității enzimatice extracelulară înregistrată la tulpinile de drojii *Saccharomyces*(P2 – SCDVV Iasi)

Enzima	Tulpini pozitive		Fără activitate		Activitate foarte scăzută		Activitate scăzută		Activitate intensă		Activitate foarte intensă	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
β Glucozidază	11	37 %	19	63 %	11	37%	0	0 %	0	0 %	0	0 %
Esterază	30	100%	0	0 %	16	53 %	14	47 %	0	0 %	0	0 %
Lipaza	12	40 %	18	60 %	12	40 %	0	0 %	0	0 %	0	0 %
Protează	27	90 %	3	10 %	15	50 %	5	17 %	7	23 %	0	0 %
Pectinază	16	53 %	14	47 %	4	13 %	4	13 %	6	20 %	2	7 %

REZULTATE OBTINUTE

Screening calitativ pentru evidentiarea activitatii enzimatiche extracelulare



Activitate esterazica

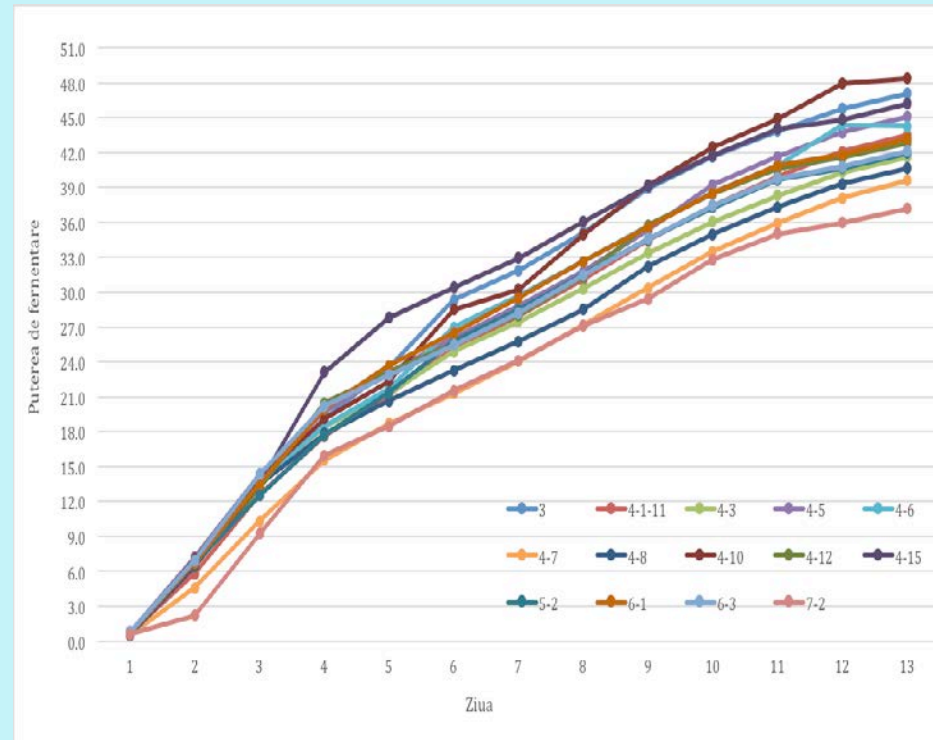
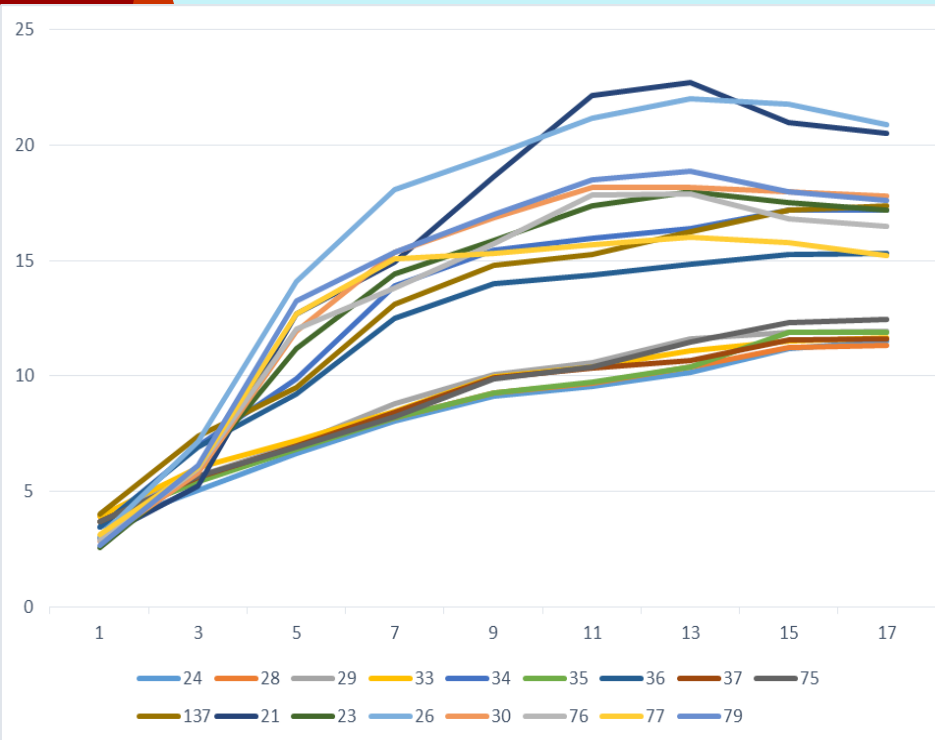
Activitate proteazica

Activitate pectinazica

REZULTATE OBTINUTE

Caracterizarea metabolica a drojdiilor de vinificatie (drojdii *Saccharomyces*)

CINETICA DE FERMENTARE A DROJDIILOR



CO – ICDVV Valea Calugareasca

- perioada de lag - mai mică de 24 ore pentru majoritatea tulpinilor de drojdii testate;
- perioada de creștere exponențială - intensă, la un număr de 39 tulpini si medie la 12 tulpini si s-a derulat pe parcursul a 9 – 10 zile;
- perioada de declin a durat 4 – 5 zile.

P2 – SCDVV Iasi

REZULTATE OBTINUTE

Caracterizarea metabolica a drojdiilor de vinificatie (drojdii *Saccharomyces*)

Toleranta tulpinilor de drojdii *Saccharomyces* la etanol

	I.C < 25 %	0
5%	I.C < 75 %	3 tulpini cu grad de inhibare parțială
	I.C ≥ 75 %	14 tulpini cu creștere similară matorului
10%	I.C < 25 %	1 tulpină cu grad de inhibiție mare
	I.C < 75 %	4 tulpini cu grad de inhibare parțială
	I.C ≥ 75 %	12 tulpini cu creștere similară matorului
15%	I.C < 25 %	3 tulpină cu grad de inhibiție mare

CO – ICDVV Valea Călugărească

	I.C < 25 %	0
5%	I.C < 75 %	3 tulpini cu grad de inhibare parțială
	I.C ≥ 75 %	11 tulpini cu creștere similară matorului
10%	I.C < 25 %	1 tulpină cu grad de inhibiție mare
	I.C < 75 %	2 tulpini cu grad de inhibare parțială
	I.C ≥ 75 %	11 tulpini cu creștere similară matorului

P2 – SCDVV Iasi

P1 – SCDVV Bujoru

Toate tulpinile de drojdii luate in studiu au fost tolerante la o concentrație de alcool de 5%.

La concentratia de 10%, din 20 de tulpini testate, 4 tulpini au prezentat cu grad de inhibare parțială si 16 tulpini au avut o creștere similară matorului.

Nicio tulpina nu a fost toleranta la concentratia de 15% alcool v/v.

REZULTATE OBTINUTE

Caracterizarea metabolica a drojdiilor de vinificatie (drojdii *Saccharomyces*)

Toleranta tulpinilor de drojdii *Saccharomyces* la Dioxid de sulf

Tulpina de drojdie	50 mg/L metabisulfit	100 mg/L metabisulfit	150 mg/L metabisulfit	200 mg/L metabisulfit
CO – ICDVV Valea Călugărească				
21; 28;	+++	+++	+	-
23; 29; 30; 33; 35; 36; 37; 52; 76; 77; 79	+++	+++	++	-
24; 34; 137	+++	+++	++	+
26	+++	+++	++	-
P1 – SCDVV Bujoru				
5; 39; 40; 57; 61; 93; 101	+++	+++	+	-
53; 55; 49; 68; 71; 28; 41; 58; 59; 60; 72;	+++	+++	++	-
50; 63	+++	+++	++	+
P2 – SCDVV Iasi				
3; 4-1-11; 4-3; 6-3	+++	+++	++	-
4-5; 4-15	+++	+++	+	+
4-6; 4-10; 5-2; 6-1	+++	+++	+	-
4-7	+++	++	++	-
4-8	+++	+++	+	-
4-12	+++	++	++	+
7-2	+++	++	+	-

Legendă:

- fără creștere;
+ creștere
foarte scăzută;
++ creștere
scăzută;
+++ creștere
intensă;
++++ creștere
foarte intensă

REZULTATE OBTINUTE

Activitatea 2.2

Monocultură cu tulpini de drojdii *Saccharomyces*

Cod tulpină	Concentrația alcoolică (% vol)	Aciditatea totală (g/L C ₄ H ₆ O ₆)	Aciditatea volatilă (g/LCH ₃ COOH)	Zaharuri reductoare (g/L)
CO – ICDVV Valea Călugărească				
26	10,55	7,04	0,52	1,4
29	10,10	7,08	0,38	3,4
36	10,45	6,65	0,45	1,0
52	10,70	7,10	0,38	1,2
76	10,65	6,42	0,56	1,0
137	10,35	6,70	0,34	3,6
P1 – SCDVV Bujoru				
28	10,60	7,4	0,46	1,8
49	10,65	6,8	0,43	4,8
93	10,45	7,80	0,34	1,6
101	10,45	6,45	0,36	3,6
P2 – SCDVV Iasi				
4.1.11	10,60	6,41	0,46	1,6
4.10	10,80	7,42	0,37	1,0
4.6	10,45	7,05	0,34	1,0
4.8	10,45	7,80	0,36	6,8
6.3	10,80	6,45	0,42	1,6
4.3	10,45	7,05	0,48	3,6

Au fost testate 16 tulpini de drojdii *Saccharomyces*, selectate în funcție de caracteristicile enologice și capacitatea de a produce enzime extracelulare;

Fermentațiile alcoolice au fost conduse la sec, cu excepția unei singure tulpini (4-8), cu valori ale alcoolului foarte apropiate și cu acidități volatile în limite admise.

REZULTATE OBTINUTE

Activitatea 2.2

Dubla cultură a drojdiilor non *Saccharomyces* și *Saccharomyces*

Combinatie tulpini (Coduri)	Concentrația alcoolică (% vol)	Aciditatea totală (g/L $C_4H_6O_6$)	Aciditatea volatilă (g/L CH_3COOH)	Zaharuri reductoare (g/L)
CO – ICDVV Valea Călugărească				
75 + 52	10,80	6,42	0,38	1,2
75 + 36	10,40	7,14	0,62	2,5
75 + 76	10,45	7,22	0,74	2,8
47 + 52	10,20	7,48	0,68	4,6
47 + 36	10,25	7,12	0,72	5,8
47 + 76	10,75	6,42	0,40	1,4
P1 – SCDVV Bujoru				
135 + 28	10,90	6,7	0,47	1,6
135 + 93	10,40	6,2	0,43	2,8
139 + 28	10,45	6,7	0,72	4,6
139 + 93	10,40	7,8	0,40	4,2
P2 – SCDVV Iasi				
10 + 4.1.11	10,90	6,37	0,42	1,0
10 + 4.10	10,80	7,12	0,28	1,0
10 + 4.6	10,45	6,97	0,36	2,0
10 + 4.8	10,40	7,72	0,30	6,8
10 + 6.3	10,70	6,22	0,70	1,0
10 + 4.3	10,45	6,97	0,44	3,6

In dubla cultura, in conditii de laborator, s-au constatat valori apropiate de cele obținute de fermentațiile în monocultură, privind în special valorile concentrațiilor de alcool. În schimb, valorile acidității volatile sunt mai mari decât în monocultură, cu foarte putine exceptii.

REZULTATE OBTINUTE

Activitatea 2.2

Cultura secvențială a drojdiilor non *Saccharomyces* și *Saccharomyces*

Combinatii de drojdii non *Saccharomyces* și *Saccharomyces*

CO – ICDVV Valea Călugărească

Torulaspota rosei, tulpina 75 + *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina 52;

Torulaspota rosei, tulpina 47 + *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina 76;

P2 – SCDVV Bujoru

Saccharomyces rosei, tulpina 135 + *Saccharomyces cerevisiae*, tulpina 28;

P3 – SCDVV Iasi

Torulaspota delbrueckii, tulpina 10 + *Saccharomyces cerevisiae*, tulpinile 4-6; 4-10

REZULTATE OBTINUTE

Activitatea 2.2

Cultura secventiala a drojdiilor non *Saccharomyces* și *Saccharomyces*

Coduri tulpini	Timp inoculare <i>Saccharomyces</i>	Concentrația alcoolică (% vol)	Aciditatea totală (g/L $C_4H_6O_6$)	Aciditatea volatilă (g/L CH_3COOH)	Zaharuri reductoare (g/L)
75 + 52	24 ore	10,70	6,80	0,40	3,02
	48 ore	10,36	7,30	0,60	5,60
	72 ore	10,40	7,11	0,60	4,80
47 + 76	24 ore	10,80	7,14	0,50	2,54
	48 ore	10,45	7,11	0,40	3,70
	72 ore	10,40	7,10	0,50	4,50
135 + 28	24 ore	10,30	7,14	0,45	1,68
	48 ore	10,30	7,12	0,44	1,30
	72 ore	10,30	7,09	0,50	1,30
10 + 4-6	24 ore	10,40	7,30	0,40	0,86
	48 ore	10,39	7,16	0,50	1,30
	72 ore	10,38	7,11	0,51	1,28
10 + 4-10	24 ore	10,39	7,48	0,37	1,32
	48 ore	10,38	7,25	0,32	1,49
	72 ore	10,38	7,26	0,38	1,47

Valorile acidității volatile sunt ușor mai ridicate, în comparație cu cele înregistrate în cultura dublă, dar apropiate când inocularea drojdiilor *Saccharomyces* s-a efectuat la 72 de ore.

CONCLUZII

Activitatile propuse pentru realizarea obiectivului fazei 2/2020 „Evaluarea performantelor metabolice si enologice ale tulpinilor de drojdii în anumite conditii de crestere” au fost realizate integral.

- A fost realizat un screening calitativ pentru 92 tulpini reactivate in scopul evidentierii activitatii enzimaticice extracelulare si a caracteristicilor metabolice ale acestora. Rezultatele obținute au fost prezentate în Fise de caracterizare a tulpinilor de drojdii *Saccharomyces* din punct de vedere al proprietatilor fermentative si metabolice si Fise de caracterizare a a tulpinilor de drojdii *Saccharomyces* si non-*Saccharomyces* din punct de vedere al activitatii enzimaticice extracelulare. Pe baza acestora au fost realizate culturi de drojdii *Saccharomyces* si non-*Saccharomyces* simple, duble si secventiale.
- În vederea realizării obiectivului final al proiectului, se va realiza evaluarea performantelor tehnologice ale tulpinilor selectate la nivel de microvinificatie, profilul compozitional al vinurilor, profilului senzorial al vinurilor si va fi elaborată tehnologia de cultura dubla si/sau secventiala de drojdii de vinificatie.