

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la o metodă de apreciere a capacității de fermentare secundară a tulpinii de levuri pentru producerea vinului spumant roșu.

Este cunoscută metoda de determinare a capacității de fermentare a glucidelor și alcoolilor în mediu lichid prin utilizarea mediului model de bază cu următoarele componente (g/dm^3): peptonă – 5,0; K_2HPO_4 – 1,0. Glucidele și alcoolii se pregătesc aparte ca hidrosoluții de 10%, soluția de glucide se supune autoclavizării la presiunea de 0,5 atm, iar cele de alcool se filtrează. Soluțiile sterile se adaugă la fonul de bază în așa proporții, ca concentrația lor în mediu să fie cuprinsă între 10...20 g/dm^3 . Soluția de bază se toarnă în eprubete de 8...10 cm^3 , se scufundă în fiecare eprubetă câte un tub întors cu fundul spre suprafață și se sterilizează la presiunea de 1 atm [1].

Mediul model după sterilizare se însămânțează cu microorganismele studiate și se incubează timp de 1...10 zile, creșterea și dezvoltarea microorganismelor se determină după tulburarea mediului, formarea peliculei sau a sedimentului. Acumularea de acizi se depistează după modificarea pH-ului, iar formarea gazelor după apariția camerei de gaz în tub.

Neajunsurile metodei constau în complicația utilizării ei în medii reale, în special pentru vinuri roșii, sterilizarea la temperaturi înalte duce la distrugerea unor componenți ai complexului fenolic și la modificări nedorite în vin. Tubul pentru gaz nu are volum interior suficient pentru a face o diferențiere comparativă între microorganismele testate, iar datorită dimensiunilor relativ mici există posibilitatea deteriorării lui în timpul sterilizării.

De asemenea este cunoscută o metodă, unde scurgerea bulelor de aer se realizează prin inversarea eprubetei cu amestecul fermentativ închis etanș ce conține tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Aceasta accelerează propagarea analizei având toată construcția asamblată din timp și elimină riscul deteriorării tubului interior în timpul sterilizării datorită fixării acestuia [2].

Neajunsurile metodei constau în necesitatea utilizării mediului model ce nu întotdeauna imită condițiile necesare, în special pentru vinurile roșii, sterilizarea la temperaturi înalte duce la distrugerea unor componenți ai complexului fenolic și la modificări nedorite în vin. Prin urmare, nu poate fi efectuată o selectare coerentă a capacității de fermentare secundară a tulpinilor de levuri în condițiile specifice de producere a vinurilor spumante roșii.

De asemenea se cunoaște metoda de testare a activității microbiene, care permite captarea bulelor de gaz, ce se formează în urma activității microorganismelor. Specificul acestei metode de testare este că tubul interior a fost modificat cu posibilitatea de a elimina camera de aer fără tratarea termică și fără inversarea tubului, sterilizarea este înlocuită prin proba martor de analiză. Această metodă prevede și testarea în câmp, totodată nu necesită o pregătire minuțioasă [3].

Neajunsurile metodei constau în faptul că nu este posibilă selectarea tulpinilor de levuri după dinamica acumulării de CO_2 în tubul interior în medii cu conținut înalt de substanțe fenolice și alcool. Înlocuirea sterilizării cu proba martor de analiză nu asigură o siguranță suficientă la utilizarea mediilor, precum vinul materie primă roșu.

Problema pe care o rezolvă invenția solicitată constă în elaborarea unei metode de determinare a capacității de fermentare secundară a tulpinilor de levuri destinate producerii vinurilor spumante roșii.

Esența invenției constă în aceea că metoda de apreciere a capacității de fermentare secundară a tulpinii de levuri pentru producerea vinului spumant roșu prevede adăugarea tulpinii de levuri, în cantitate de 3 mln. cel./ cm^3 în vin cu un conținut de zaharuri de 22 g/dm^3 și substanțe fenolice de 1000...2500 mg/dm^3 , menținerea vinului pentru fermentare în decurs de 5 zile la temperatura de 20°C într-o eprubetă cu diametrul de 2 cm și înălțimea de 15 cm, în care este amplasat cu gâtul orientat spre fundul eprubetei un tub sudat la un capăt, gradat cu scară de 0,071 cm^3 , cu diametrul de 0,3 cm și înălțimea de 10 cm, din care este evacuat aerul, și determinarea volumul de gaz acumulat în tub la fermentare, totodată dacă volumul gazului acumulat este mai mic de 0,063 cm^3 se consideră că tulpina de levuri nu are capacitate de fermentare secundară, dacă volumul gazului acumulat este de 0,064...0,254 cm^3 se consideră că tulpina de levuri are capacitate scăzută de fermentare secundară, dacă volumul gazului acumulat este de 0,255...0,510 cm^3 se consideră că tulpina de levuri are capacitate medie de fermentare secundară și dacă volumul gazului acumulat este mai mare de 0,510 cm^3 se consideră că tulpina are capacitate sporită de fermentare secundară.

În eprubetă se toarnă vin roșu filtrat prin filtre cu membrană cu $d=0,6 \mu\text{m}$, conținutul de zaharuri în vin este de 22 g/dm^3 , iar maioua de levuri conține 3 mln. cel./ cm^3 . Vinul se toarnă în eprubetă până când înălțimea lichidului depășește înălțimea tubului interior cu 1 cm. În același mod se pregătește proba de control cu excluderea însămânțării vinului cu tulpina de levuri.

Evacuarea bulelor de aer din tubul interior se realizează prin inversarea eprubetei ermetic închise, cu amestecul fermentativ și tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Operațiunea se repetă de câteva ori pentru a evacua bulele de aer până când tubul interior este plin cu lichid. Apoi eprubeta se astupă cu un dop steril din vată și se introduce în termostat la o temperatură constantă de 20°C. Procesul de fermentare secundară se studiază timp de 5 zile, din care 24 de ore este perioada de acomodare, iar măsurările se efectuează din ziua a 2-a. În calitate de obiect de control servește volumul de gaz (CO_2) format în procesul fermentării secundare.

Aprecierea capacității de fermentare secundară a tulpinii de levuri se efectuează după volumul gazului acumulat în tubul de fermentare în decurs de 5 zile.

Metoda elaborată permite de a selecta tulpinile în dependență de capacitatea de fermentare secundară a glucidelor în condițiile asemănătoare cu cele de la fermentarea secundară la producerea vinurilor spumante roșii, evidențiind pe cele mai rezistente datorită tubului interior gradat, în dependență de dinamica acumulării de gaz (CO_2) format în urma fermentației secundare. Excluderea sterilizării la temperaturi ridicate permite utilizarea construcției extinse a tubului interior, fără necesitatea fixării lui în interiorul eprubetei, totodată simplifică efectuarea analizei.

Exemplul 1

Vinul materie primă roșu pentru spumante, în volum de minim 50 cm³, cu parametri fizico-chimici: conținutul de alcool etilic – 11,0 % vol., aciditatea titrabilă – 5,7 g/l, pH - 3,2, conținutul de substanțe fenolice – 1100 mg/dm³, conținutul de zaharuri – 22 g/dm³, a fost filtrat prin filtrul cu membrană cu diametrul porilor de 0,6 μm. În vinul filtrat s-a administrat maiaua de levuri (tulpina de levuri CNMN-Y-R-91) din calculul 3 mln. cel./cm³, apoi amestecul fermentativ a fost turnat în eprubeta în care s-a introdus tubul gradat cu gâtul orientat în jos. Evacuarea bulelor de aer din tub s-a realizat prin inversarea eprubetei cu amestecul fermentativ închis ermetic și tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Procesul s-a repetat de câteva ori, până tubul interior s-a umplut cu lichid. Eprubeta a fost introdusă în termostat la temperatura de 20°C și monitorizată timp de 5 zile, determinând volumul de CO₂ acumulat.

După 48 h în tub s-au acumulat 0,26 cm³ de CO₂, după 72 h s-au format 0,45 cm³ CO₂, iar după 96 h volumul de dioxid de carbon a atins valoarea de 0,51 cm³ de CO₂. Prin urmare, tulpina de levuri posedă capacitățile necesare pentru realizarea fermentației secundare a vinurilor materie primă roșii la un conținut moderat de substanțe cu caracter fenolic.

Exemplul 2

Vinul materie primă roșu pentru spumante, în volum de minim 50 cm³, cu parametri fizico-chimici: conținutul de alcool etilic – 11,0 % vol., aciditatea titrabilă – 5,7 g/l, pH – 3,2, conținutul de substanțe fenolice – 2000 mg/dm³, conținutul de zaharuri – 22 g/dm³, a fost filtrat prin filtrul cu membrană cu diametrul porilor de 0,6 μm. În vinul studiat s-a administrat maiaua de levuri (tulpina de levuri CNMNY R-91) din calculul 3 mln. cel./cm³, apoi amestecul fermentativ a fost turnat în eprubeta în care s-a introdus tubul gradat cu gâtul orientat în jos. Evacuarea bulelor de aer din tub s-a realizat prin inversarea eprubetei cu amestecul fermentativ închis ermetic și tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Procesul s-a repetat de câteva ori, până tubul interior s-a umplut cu lichid. Eprubeta a fost introdusă în termostat la temperatura de 20°C și monitorizată timp de 5 zile, determinând volumul de CO₂ acumulat.

După 48 h în tub s-au acumulat 0,163 cm³ de CO₂, după 72 h s-au format 0,29 cm³ de CO₂, iar după 96 h volumul de dioxid de carbon atinge valoarea de 0,537 cm³. Prin urmare, tulpina de levuri posedă capacitățile necesare pentru realizarea fermentației secundare a vinurilor materie primă roșii la un conținut înalt de substanțe cu caracter fenolic.

Exemplul 3

Vinul materie primă roșu pentru spumante, în volum de minim 50 cm³, cu parametri fizico-chimici: conținutul de alcool etilic – 11,0 % vol., aciditatea titrabilă – 5,7 g/l, pH - 3,2, conținutul de substanțe fenolice – 2400 mg/dm³, conținutul de zaharuri – 22 g/dm³, a fost filtrat prin filtrul cu membrană cu diametrul porilor de 0,6 μm. În vinul filtrat s-a administrat maiaua de levuri (tulpina de levuri CNMN-Y-28) din calculul 3 mln. cel./cm³, apoi amestecul fermentativ a fost turnat în eprubeta în care s-a introdus tubul gradat cu gâtul orientat în jos. Evacuarea bulelor de aer din tub s-a realizat prin inversarea eprubetei, cu amestecul fermentativ închis ermetic și tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Procesul s-a repetat de câteva ori, până tubul interior s-a umplut cu lichid. Eprubeta a fost introdusă în termostat la temperatura de 20°C și monitorizată timp de 5 zile, determinând volumul de CO₂ acumulat.

După 48 h în tub s-au format 0,021 cm³ de CO₂, după 72 h s-au acumulat 0,063 cm³ de CO₂, însă în continuare volumul a rămas constant fiind de 0,063 cm³ CO₂. Prin urmare, tulpina de levuri CNMN-Y-28 nu poate asigura fermentarea secundară a glucidelor în vinul materie primă roșu cu concentrația sporită de substanțe fenolice.

Exemplul 4

Vinul materie primă roșu pentru spumante, în volum de minim 150 cm³, cu indicii fizico-chimici: conținutul de alcool etilic – 11,1 % vol., aciditatea titrabilă – 5,5 g/l, pH – 3,2, conținutul de substanțe fenolice – 2000 mg/dm³, conținutul de zaharuri – 22 g/dm³, a fost filtrat prin filtrul cu membrană cu diametrul porilor de 0,6 μm. În vinul studiat s-au administrat diferite tulpini de levuri (tulpini de levuri din Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene din Industria Oenologică (CNMNIO): CNMNIO Nr. 4, CNMNIO Nr. 81, CNMNIO Nr. 91 reieșind din calculul 3 mln. cel./cm³, apoi amestecul fermentativ a fost turnat în eprubete, în care s-a introdus tubul gradat cu gâtul orientat în jos. Evacuarea bulelor de aer din tub s-a realizat prin inversarea eprubetei, cu amestecul fermentativ închis ermetic și tubul interior imersat în lichid cu gâtul întors spre baza eprubetei. Procesul s-a repetat de câteva ori până tubul interior s-a umplut cu lichid. Eprubetele au fost introduse în termostat la temperatura de 20°C și monitorizate timp de 4 zile determinând volumul de CO₂ acumulat.

În eprubeta însăși mântă cu tulpina de levuri CNMNIO Nr. 4 nu s-a înregistrat acumularea gazului în tubul interior, prin urmare nu a avut loc fermentarea secundară și tulpina de levuri nu poate fi utilizată la fermentarea secundară a vinurilor spumante roșii. În eprubeta însăși mântă cu tulpina de levuri CNMNIO Nr. 81 s-a înregistrat acumularea gazului în tubul interior, însă cu o dinamică lentă, în a 5-a zi ajungând la doar 0,254 cm³ de CO₂. Prin urmare, tulpina CNMNIO Nr. 81 are o capacitate redusă de fermentare secundară la concentrații înalte de substanțe fenolice. Pentru tulpina de levuri CNMNIO Nr. 91 după 96 h volumul de dioxid de carbon acumulat a atins valoarea de 0,537 cm³. Prin urmare, această tulpină de levuri are capacitate sporită de fermentare secundară a vinurilor materie primă roșii cu un conținut înalt de substanțe fenolice.