



MD/EP 3622051 T2 2022.03.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3622051 (13) T2

(51) Int. Cl.: C12N 1/16 (2006.01.01)
C12G 1/022 (2006.01.01)
A23L 33/14 (2016.01.01)
C12R 1/85 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0275 (22) Data de depozit: 2018.05.11 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18731172.5, 2018.05.11 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3622051, 2020.03.18 (31) Numărul cererii prioritare: 201700051113 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.05.11 (33) Țara cererii prioritare: IT	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2022, 2022.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 40/2021, 2021.10.06 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2020, 2020.04.30
(71) Solicitant: BIOENOLOGIA 2.0 S.R.L., IT (72) Inventator: POLO Maurizio, IT (73) Titular: BIOENOLOGIA 2.0 S.R.L., IT (74) Mandatar autorizat: SKIDAN Natalia	

(54) Tulpină de drojdie *Saccharomyces bayanus*

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la o tulpină de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS și depusă la DBVPG cu numărul de depozit 36P. De asemenea, invenția se referă la utilizarea tulpinii de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS (DBVPG 36P) în calitate de inocul alimentar în producția de alimente obținute prin fermentație alcoolică, și la o metodă de selecție a tulpinilor de drojdie din specia *Saccharomyces* adaptate pentru fermentația alcoolică, în special a strugurilor, constând dintr-o etapă de izolare a unor astfel de drojdii din flori.

Revendicări: 11

Figuri: 4

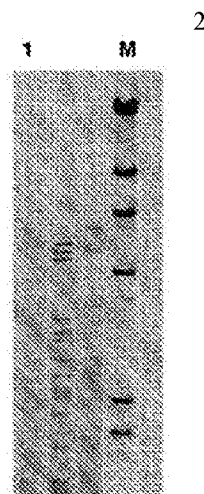


Fig. 2

MD/EP 3622051 T2 2022.03.31

(54) A strain of yeast *Saccharomyces bayanus***(57) Abstract:**

1

The invention concerns a strain of *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identified as SERIUS and deposited at the DBVPG with deposit number 36P. The invention further concerns the use of the strain of *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identified as SERIUS (DBVPG 36P) as a food inoculate in the production of foods obtained through alcoholic fermentation, and a selection

2

method for yeast strains of the group *Saccharomyces* adapted to alcoholic fermentation, particularly of grape, consisting of an isolation step for such yeasts from flowers.

Claims: 11

Fig.: 4

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

5

Prezenta invenție se referă la o tulpină de drojdie aparținând speciei *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, și la o metodă de selecție a drojdiilor de uz oenologic din flori. Mai mult, invenția se referă la utilizarea tulpinii de drojdie în producția fermentativă a alimentelor.

10 **Stadiul tehnicii**

Utilizarea culturilor de drojdie starter în producția de vin este o practică fundamentală care permite controlul și dirijarea procesului fermentativ.

15

Termenul drojdie selectată sau starter selectat înseamnă o tulpină de drojdie caracterizată prin proprietăți fiziologice, biochimice și oenologice care sunt optimizate în ceea ce privește cerințele tehnologice ale proceselor de fermentație din punct de vedere al purității (Pretorius, 2000).

20

Utilizarea de drojdii selectate asigură inițierea promptă a fermentației deoarece calitatea și cantitatea drojdiei adăugate la must sunt atent selecționate; aceasta permite un control mai mare al procesului fermentativ de către operatorul care optează pentru efectuarea fermentației fără ca procesul menționat să fie lăsat pe seama drojdiilor prezente în mod natural în struguri, care nu au întotdeauna caracteristici pozitive; ea reduce problemele de oprire sau încetinire a procesului, tipice proceselor de fermentație spontană; ea obține randamente bune de transformare a zahărului în alcool, reducând posibilitatea ca în vin să se stabilească alte microorganisme, astfel realizând degradarea acestuia (de exemplu bacterii acetice); ea reduce sau elimină caracteristicile organoleptice anormale și, nicidecum în

25

ultimul rând, contribuie la standardizarea producției unui anumit vin, permițând astfel ca acesta să fie recunoscut de consumator an de an (Fleet și Heard, 1993).

30

Predominant, selecția drojdiei se face prin izolarea tulpinilor de drojdie din must sau struguri, care sunt supuse fermentației și testării de caracterizare oenologică. Aceste teste sunt foarte laborioase și necesită mult timp, prin aceea că au în vedere studierea a numeroase caracteristici fiziologice și metabolice ale drojdiei. În plus, musturile și strugurii pot conține mai multe copii ale aceleiași tulpini, prin aceasta existând riscul de a izola copiile multiple menționate și, astfel, de a efectua teste duplicate.

35

Caracteristicile oenologice importante pot fi subîmpărțite în două grupe: cele cu importanță tehnologică, care influențează progresia procesului de vinificație, și cele care afectează calitatea, influențând caracteristicile chimice și senzoriale ale vinurilor (Zambonelli, 2003). Prin termenul caracteristici tehnologice se înțeleg caracteristicile asociate activității de fermentație a drojdiilor (putere alcooligenă absolută, forță fermentativă, viteza de inițiere a fermentației), în timp ce caracteristicile de calitate includ acele caracteristici care contribuie la aroma și, mai general, la nivelul organoleptic. calitatea vinului, cum ar fi, de exemplu, producția de glicerol, substanțe volatile și compuși sulfurați (Pretorius, 2000; Fleet, 2008).

40

Caracteristicile tehnologice importante includ puterea fermentativă sau alcooligenă, care, conform lui Delfini, este nivelul maxim de alcool (înțeles ca % etanol) produs de o drojdie dată prin fermentația unui must care conține zahăr în exces (Delfini, 1995). Principalul alcool etilic produs prin activitatea drojdiilor în condiții anoxice este compusul care exercită o acțiune inhibitoare asupra tuturor microorganismelor. Întrucât, pentru uz oenologic, drojdiile necesită caracteristici de performanță semnificative, de exemplu, pentru producerea vinurilor cu conținut ridicat de alcool, de asemenea și rezistența (toleranța la alcool) la alcool etilic are, evident, o importanță fundamentală.

4550

O caracteristică tehnologică suplimentară importantă este forța fermentativă (sau viteza de fermentație), care exprimă viteza cu care drojdia inițiază fermentația, chiar și în prezența antisepticelor la dozele permise legal și la temperaturi cuprinse între 15°C și 30°C. Inițierea rapidă a procesului fermentativ este una dintre caracteristicile pe care trebuie să le posedă o drojdie oenologică indiferent de tipul acesteia care este utilizată (proaspătă sau uscată) și de aceea trebuie considerată o cerință fundamentală în selecția drojdiilor pentru vinificație.

55

O caracteristică suplimentară, foarte importantă, este rezistența la dioxidul de sulf SO₂, mai precis capacitatea de a menține nealterată sau suficient de mare viteza de fermentație în prezența unor doze selective de SO₂ adăugat la musturi pentru a evita oxidarea și a obține o stabilitate microbiologică adecvată. Atunci când se produc vinuri suplimentate cu SO₂, este important așadar să avem disponibile tulpini rezistente la acest antiseptic, pentru a evita problemele de inițiere care afectează procesul de fermentație.

60

Un alt aspect important se referă la metodele de creștere, adică comportamentul celulelor de drojdie la finalizarea procesului de înmugurire, deoarece caracteristica menționată poate afecta

managementul procesului de fermentație. Creșterea drojdiilor poate fi diferențiată între creșterea pulverulentă, floculantă sau agregată. Viteza de sedimentare a tulpinii este astfel o caracteristică pozitivă suplimentară, deoarece ea ajută la operațiunile de limpezire și filtrare a vinului.

Tulpinile care tulbură vinul în modul cel mai enervant și persistent sunt tulpinile generatoare de spumă. Capacitatea de generare a spumei este o caracteristică dependentă de tulpină, asociată cu hidrofobia peretelui celular. La multe tulpini (20-30%) celulele aderă la bulele de CO₂ produse în timpul fermentației, iar aceste bule, după ce ajung la suprafață, mai degrabă decât să se rupă, fuzionează între ele și cresc în volum, dând naștere unor spume care capătă o culoare gri-brun din cauza prezenței celulelor. Absența spumei sau producerea redusă de spumă este o caracteristică pozitivă, atât în fermentațiile primare, cât și în refermentații, deoarece aceasta reduce volumul ocupat de must.

În ceea ce privește caracteristicile calitative, care vor fi descrise ulterior detaliat, principalele idei includ:

- producere scăzută sau zero de hidrogen sulfurat;
- producerea sau degradarea acidului malic (în funcție de must și de recolta oenologică);
- producere mare de glicerol;
- producere scăzută de acid acetic;
- potențial aromatic ridicat.

Din punct de vedere calitativ, compușii sulfurați constau în principal din hidrogen sulfurat (sau H₂S) și dioxid de sulf (SO₂); compușii menționați sunt întotdeauna produși de tulpinile de *S. cerevisiae* disponibile comercial ca starter de vin, chiar dacă în cantități diferite și variabile în funcție de tulpină.

Vinificația folosind drojdii neproducătoare sau slab producătoare de H₂S este deosebit de avantajoasă pentru acele soiuri care sunt în mod special predispuse la „reducere”. Într-adevăr, hidrogenul sulfurat este compusul principal dintre mercaptani ușori și are dezavantajul de a avea miros de ouă putrezite. Vinurile care prezintă defecte olfactive determinate de prezența H₂S au concentrații ale acestuia din urmă variind între 0,8 și 80 μg/l (Suzzi și Tofalo, 2014). H₂S poate, de asemenea, să reacționeze cu alți compuși prezenți în vin, modificând profilul aromatic. Acesta este produs în principal în timpul fermentației alcoolice, ca urmare a acțiunii drojdiei.

Prin urmare, utilizarea unei drojdii care nu produce, sau produce puțin hidrogen sulfurat, nu numai că permite fermentații mai curate și vinuri mai parfumate, dar și întârzie și/sau evită primul tiraj până la finalizarea fermentației, permițând vinului să rămână mai mult timp pe drojdie, cu îmbogățirea consecutivă a manoproteinelor și a altor substanțe rezultate din liza drojdiilor. Se știe că producția de H₂S la *Saccharomyces cerevisiae* variază de la 0 μg/litru până la 300 μg/litru și cantitatea produsă este o caracteristică dependentă de tulpină. Mai mult, datele din literatură arată că doar aproximativ 1% dintre tulpinile oenologice sunt incapabile să producă H₂S (Zambonelli și colab., 1984).

De asemenea, producerea de SO₂ de către drojdii prezintă o mare variabilitate. Anumite tulpini care produc cantități semnificative de SO₂ (100-120 mg/l) au, de asemenea, tendința de a produce cantități semnificative de acetaldehidă (pentru a se apăra împotriva antisepticului menționat) și rezultatul, la finalizarea fermentației, este o concentrație mare de SO₂ legat care poate compromite calitatea vinului. Prin urmare, în timpul operațiunilor de selecție a tulpinilor starter oenologice, ar trebui să se acorde preferință tulpinilor care produc niveluri scăzute de SO₂ (maximum 10-20 mg/l) (Vincenzini și colab. 2005).

În ceea ce privește producerea de acid malic în timpul fermentației alcoolice, aceasta reprezintă un avantaj în majoritatea proceselor de vinificație care implică struguri albi de calitate, prin aceea că prezența unor cantități mari de acid malic conferă o senzație crescută de prospețime vinului rezultat, în special o senzație acidă, considerată mai intensă, în comparație cu acidul tartric.

Un avantaj suplimentar este că producerea de acid malic permite un pH mai scăzut, rezultând o activitate crescută a dioxidului de sulf și, în general, o stabilitate microbiologică crescută în plus față de aciditatea globală crescută. Producerea menționată de către drojdii de interes oenologic a fost descrisă în stadiul tehnicii pentru anumite drojdii criotolerante, capabile să producă până la 1 g/l de acid malic în timpul procesului de fermentație (Castellari și colab., 1994).

Un alt produs secundar al fermentației de către drojdii este glicerolul.

După etanol și CO₂, glicerolul este compusul produs în cantitățile cele mai mari în timpul fermentației alcoolice. Acest lucru influențează semnificativ „corpul” vinului, contribuind la conferirea la vinuri a caracteristicilor de „plinătate” și „dulce”, cu un prag de percepție corespunzător la aproximativ 5,2 g/l. Concentrația de glicerol prezentă în vin depinde de concentrația de zaharuri prezente în must, de condițiile de fermentație și de tulpina de drojdie.

În special, în procesele de vinificație, *Saccharomyces* poate produce de la 2 la 10 g/l, în funcție de specia și tulpina de drojdie. În general, *S. cerevisiae* este drojdia care produce cele mai mici cantități de glicerol și acesta este motivul principal pentru randamentul său ridicat de etanol. În realitate, acest

compus nu este un produs secundar de fermentație deoarece este derivat direct din zaharuri și, indiferent de tulpină, cantitatea produsă este proporțională cu concentrația acestora (Zambonelli și colab., 2000).

Dintre produsele secundare, deși negativ, un rol foarte important îl joacă acidul acetic, care, în timpul fermentației, este derivat din degradarea zaharurilor din cauza oxidării acetaldehidei (Ribéreau-Gayon, 2000). Pe lângă specie, capacitatea de a produce cantități mai mari sau reduse de acid acetic este o caracteristică ce variază în funcție de tulpină.

Capacitatea menționată de a produce acid acetic este de fapt definită prin termenul de puritate fermentativă și este exprimată ca raportul între aciditatea volatilă formată și alcoolul etilic produs. Cele mai bune tulpini sunt cele care au cea mai scăzută valoare a purității fermentative și, în general, drojdiile utilizate pentru scopuri oenologice nu trebuie să producă cantități de acid acetic mai mari de 0,4 g/l.

Cu toate acestea, aciditatea volatilă a vinurilor poate avea mai multe origini și nu este doar rezultatul activității drojdiei. Într-adevăr, concentrația finală de acid acetic în vin depinde și de calitatea strugurilor și de condițiile de vinificație. Acetaldehida este cel mai important compus carbonil format în timpul fermentației și reprezintă peste 90% din conținutul total de aldehide al vinului. Ea este un produs normal al fermentației alcoolice, iar conținutul său în vin poate varia semnificativ (10-300 mg/l) în funcție de tulpina de drojdie și, de asemenea, de condițiile de vinificație, precum și de concentrația de dioxid de sulf, la care acetaldehida este legată. Evaluarea conținutului de acetaldehidă este utilizată ca indicator al gradului de oxidare a vinului. O concentrație scăzută a compusului menționat în vin îi conferă acestuia din urmă o aromă plăcută de fructe; totuși, la concentrații mai crescute, ea dă naștere unui miros înțepător și acru și o aromă de plante, astfel încât să determine ca vinul să nu mai poată fi comercializat atunci când concentrația de acetaldehidă depășește 500 mg/l.

Pentru vinurile albe, valoarea medie este în general de 80 mg/l. Se știe că unul dintre principalii factori care determină variabilitatea conținutului de acetaldehidă este tulpina de drojdie. De asemenea, se știe că dioxidul de sulf poate induce producerea de acetaldehidă de către drojdii datorită corelației dintre rezistența drojdiilor ca atare la dioxid de sulf.

Alcoolii superiori, reprezentați în general în vin de n-propanol, izobutanol, alcool amilic și alcool 2-fenil etilic, sunt produse secundare de fermentație a drojdiei și sunt compuși care pot influența semnificativ aroma vinului. Compușii menționați sunt derivați predominant din metabolismul aminoacizilor prezenți în must, dar și din metabolismul glucozei fără implicarea aminoacizilor precursori. Într-adevăr, nu există o corelație directă între cantitățile de aminoacizi prezenți în must și alcoolii superiori prezenți în vin. Producerea acestor compuși se datorează în principal acțiunii tulpinilor de drojdii care pot produce de la 100 până la 500 mg/l, în funcție de compoziția mediului, disponibilitatea oxigenului, sursa de azot și concentrația inițială de zahăr. În general, atunci când concentrația lor totală este sub 300 mg/l, aceștia contribuie pozitiv la complexitatea aromei, în timp ce atunci când sunt prezenți în concentrații mai mari de 400 mg/l, aceștia conferă o calitate negativă produsului (Suzzi și Tofalo, 2014). Excepția este 2-feniletanolul, care eliberează un parfum cu miros de trandafir și chiar și la concentrații mari contribuie pozitiv la aroma vinului (Vincenzini, 2005).

În timpul fermentației, drojdiile pot produce esteri rezultați din condensarea acidului acetic și a acizilor grași, preponderent cu lanț mediu, cu etanol sau alți alcooli prezenți în vin și ei înșiși produși și prin metabolismul drojdiei. Activitatea de esterază a drojdiei este foarte importantă în procesul de vinificație deoarece ea are un efect puternic asupra caracteristicilor senzoriale ale vinului, producând majoritatea și cele mai importante arome de fermentație. Influența esterilor asupra calității vinului poate fi negativă și nedorită, în special în cazul acetatului de etil, care conferă mirosul tipic de oțet (sau chiar de solvent). Pe de altă parte, producerea de acetat de izoamil sau acetat de izobutil este pozitivă, deoarece este responsabilă pentru un caracter fructat.

EP1978083 și Verspohl A. și colab., Appl Microbiol Biotechnol (2016) 101: 2507-2521 descriu tulpini de *Saccharomyces* care au câteva dintre proprietățile de mai sus, cum ar fi producerea de cantități mici de H₂S și cantități mari de glicerol atunci când sunt utilizate în procesele de fermentație și care sunt potrivite pentru fabricarea de vinuri.

Descrierea invenției

Scopul invenției este de a furniza o tulpină de drojdie din specia *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, dotată cu caracteristicile tehnologice și oenologice care permit o bună fermentație a mustului, permițând producerea unui vin plăcut cu complexitate aromatică sporită și echilibrată.

Un scop suplimentar este de a furniza o tulpină care produce acid malic și glicerol în cantități mari și, în același timp, nu produce hidrogen sulfurat în timpul fermentației alcoolice.

Un alt scop al prezentei invenții este de a identifica o tulpină de drojdie adecvată pentru utilizare ca tulpină părinte pentru obținerea de hibrizi de drojdii cu potențial oenologic. Furnizarea unei drojdii autolizate pentru a fi utilizată ca activator de fermentație este, de asemenea, un scop al prezentei invenții.

În niciun caz, scopul final al invenției nu este optimizarea unei metode perfecționate și rapide de selecție a tulpinilor de drojdie pentru uz oenologic, în special drojdii din specia *Saccharomyces cerevisiae* și *bayanus* izolate din flori.

Obiectivele menționate mai sus sunt realizate prin intermediul tulpinii de drojdie așa cum este caracterizată în revendicarea 1, și în mod exact printr-o tulpină de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată drept SERIUS, și depusă la DBVPG cu numărul de depozit 36P. De asemenea, în lucrarea de față este descrisă, dar nu este acoperită de invenția revendicată, o metodă de selecție a tulpinilor de drojdie de uz oenologic, ale căror caracteristici sunt stabilite ulterior, și în mod exact, printr-o metodă de selecție a tulpinilor de drojdie din specia *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* și *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, adaptate pentru fermentația alcoolică, în special a strugurilor, izolate din flori.

Tulpina de drojdie *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* conform invenției posedă caracteristici oenologice optime, atât tehnologice, cât și calitative, și a fost izolată din flori într-o zonă din regiunea Veneto cu activitate importantă de producere de vin din struguri. Tulpina a fost identificată prin denumirea SERIUS și a fost depusă în conformitate cu Tratatul de la Budapesta, pe 24 mai 2016 la "Industrial Yeasts Collection" DBVPG din Perugia, cu numărul de depozit DBVPG36P.

Tulpina a fost selectată, de asemenea, pentru producerea de hidrogen sulfurat practic inexistentă a acesteia, o caracteristică foarte rară la tulpinile de drojdie ale genului *Saccharomyces*. Într-adevăr, pe plăci de mediu de cultură cu agar Biggy, utilizat de preferință pentru a verifica capacitatea de a produce H₂S, coloniile sunt albe, demonstrând astfel incapacitatea tulpinii de a produce acest metabolit.

Un alt aspect pozitiv observat la această drojdie se referă la producerea de glicerol. Într-adevăr, în must, tulpina produce glicerol în concentrații mai mari în comparație cu tulpinile de *S. cerevisiae* disponibile comercial utilizate ca martor. În mod avantajos, cantitatea de glicerol produsă a fost analizată în musturi de struguri cu fructe albe și musturi de struguri cu fructe roșii și, la ambele tipuri de struguri, cantitatea de glicerol produsă în mod natural a fost mai mare față de mustul corespunzător obținut cu tulpina de referință disponibilă comercial. În mod avantajos, vinul produs folosind tulpina conform invenției are o concentrație de glicerol produsă în mod natural de tulpina respectivă mai mare de aproximativ 8,5 g/l, de preferință mai mare de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mare de aproximativ 10 g/l.

Prin termenul "produs de tulpină" (în lucrarea de față și în contexte similare) se înțelege că compusul a fost produs ca rezultat al fermentației folosind tulpina respectivă și nu a fost adăugat artificial.

Tulpina conform invenției a fost selectată, de asemenea, pentru capacitatea sa neașteptată de a produce acid malic.

În mod avantajos, tulpina conform invenției are capacitatea de a produce un vin cu o cantitate de acid malic mai mare de aproximativ 0,5 g/l, de preferință mai mare de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mare de aproximativ 2 g/l. Această moleculă este deosebit de avantajoasă în procesele de vinificație, în special pentru procesele cu struguri albi de calitate, deoarece ea conferă vinului o senzație sporită de prospețime. Un aspect suplimentar și avantajos este dat de faptul că o cantitate mare de acid malic face posibilă obținerea unui vin cu pH mai scăzut, caracteristică ce permite o activitate mai mare a dioxidului de sulf.

Tot în mod avantajos, tulpina conform invenției cu producția sa neașteptat de mare de acid malic face posibilă obținerea unei stabilități microbiologice sporite pentru vin, cu aciditate totală crescută.

Datorită calităților sale tehnologice, tulpina SERIUS este, prin urmare, net superioară tulpinilor comerciale disponibile în prezent.

În mod avantajos, tulpina are capacitate de fermentație bună, cu valori medii de scădere în greutate analoage celor observate la drojdii comerciale din speciile *Saccharomyces cerevisiae* și cu timpi de închidere a fermentației care variază în funcție de tipul de must folosit și de temperatura de fermentație, cu durate, la temperatura de fermentație optimă, cuprinse între 10 și 15 zile.

Tot în mod avantajos, tulpina conform invenției are o capacitate fermentativă bună, chiar și la temperaturi scăzute, în special la temperaturi cuprinse între 12°C și 15°C, permițând astfel și utilizarea sa pentru fermentația vinurilor la temperaturi scăzute, și crescând astfel posibilitatea activării unor reacții biochimice specifice cunoscute care conduc la producerea de compuși aromatici, adaptate pentru îmbunătățirea calității vinului.

Pentru tulpina conform invenției a fost evaluată și capacitatea de a produce acid acetic în mustul natural de fructe albe și roșii, iar rezultatele obținute demonstrează că tulpina SERIUS se caracterizează prin capacitatea de a menține valori foarte scăzute de aciditate volatilă; în special, valorile obținute sunt în general mai mici în comparație cu valorile obținute din fermentații comparative cu tulpini de *S. cerevisiae* disponibile comercial.

Tulpina conform prezentei invenții a fost de asemenea selectată pe baza așa-numitei sale activități ucigașe, mai precis capacitatea de a produce toxine care provoacă moartea altor drojdii; într-adevăr, în cazul în care sunt utilizate amestecuri de tulpini, tulpinile care urmează să fie utilizate trebuie

să fie neapărat compatibile între ele, și anume incapabile să producă toxine ucigăse care pot inhiba celelalte tulpini prezente în amestec. Din analiza efectuată s-a arătat în mod avantajos că tulpina SERIUS nu este capabilă să inhibe alte drojdii și, chiar mai avantajos, tulpina nu a fost la rândul ei inhibată de niciuna dintre drojdiile testate.

Tulpina a fost clasificată taxonomic la nivel de specie prin secvențierea regiunii ITS (Internal Transcribed Spacer) a operonului ribozomal și, ulterior, comparată prin alinierea cu regiunea omoloagă disponibilă pentru speciile mai înrudite filogenetic ale genului *Saccharomyces* Meyen ex Rees (1870), în conformitate cu Vaughan-Martini & Martini; analiza moleculară menționată a permis identificarea tulpinii SERIUS ca *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*.

Tulpina a fost de asemenea supusă caracterizării genotipice prin analiza profilurilor de restricție ale ADN mitochondrial folosind enzima *Hinf I*, așa cum este descris de Zilio și colab., și raportat în detaliu în exemplul 1, punctul 1.6 și, în plus, prin utilizarea unor markeri moleculari particulari, cunoscuți ca microsateliți, în conformitate cu o metodă, descrisă de asemenea în detaliu în exemplul 1, punctul 1.6.

Dacă este transferată într-un mediu de cultură adecvat în condiții de limitare de nutrienți, tulpina conform invenției este capabilă de sporulare. Condiții îmbunătățite pentru inducerea sporulării tulpinii SERIUS sunt obținute în mediu SP (1% acetat de potasiu; 0,1% extract de drojdie; 0,05% glucoză; 1,8% agar) incubat la 25°C timp de 7-10 zile.

Alte aspecte pozitive constatate pentru această drojdie au fost observate în timpul creșterii în must sintetic și natural (exemplul 2).

Tulpina conform invenției are caracteristicile oenologice prezentate mai jos: zaharuri consumate după 2 zile (putere fermentativă): aproximativ 4-5 g/100 ml; zaharuri consumate după 7 zile: circa 15-17 g/100 ml; 10-15 zile: durata fermentației la temperatura optimă; producție scăzută de spumă.

Un aspect pozitiv deosebit de avantajos observat la această drojdie se referă la producerea de H₂S, care este substanțial absentă.

În plus, tulpina este rezistentă la o concentrație de SO₂ de cel puțin 50, preferabil 100, chiar mai preferabil 200 și cel mai preferabil 300 ppm. Tulpina are, de asemenea, rezistență ridicată la cupru, în special ea este rezistentă la o concentrație de cupru de 300 μmol/l. În mod avantajos, respectiva concentrație de cupru s-a dovedit de asemenea, a fi superioară rezistenței la cupru a tulinilor de drojdie disponibile comercial, egală cu aproximativ 50-100 μmol/l. De preferință, tulpina este depozitată sub formă congelată (-80°C) în prezența de agenți crioprotectori corespunzători (40% g/g glicerol) sau conservată prin liofilizare/deshidratare. Congelarea sau liofilizarea/deshidratarea sunt realizate folosind metode cunoscute specialiștilor în domeniu.

Tulpina conform invenției poate fi industrializată în mod avantajos sub formă de cremă, formă deshidratată, formă liofilizată sau sub formă de pastă, în funcție de cerințele utilizatorului.

Tulpina conform invenției este adaptată pentru a fi utilizată ca inocul alimentar în producerea de alimente, obținute prin fermentație alcoolică. Alimentele care se pot produce cu această drojdie includ, de exemplu, pâine, produse pe bază de lapte, cidru, bere, spumant și vin. Alte băuturi alcoolice obținute din fermentația alcoolică a altor fructe sau cereale, cum ar fi grâul sau orezul, sunt de asemenea de luate în calcul. Tulpina este adaptată, de asemenea, pentru a fi utilizată ca probiotic în suplimente alimentare sau în alimente. Testele preliminare de caracterizare sugerează că această tulpină este rezistentă la aciditate și săruri biliare și, prin urmare, are posibilitatea de a supraviețui tranzitului gastric.

În mod avantajos, tulpina *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS conform invenției a fost adecvată în mod special pentru producerea unei drojdii autolizate care să fie utilizat ca activator de fermentație în producția de vin și alte băuturi alcoolice.

Conform unei variante de execuție preferate a invenției, tulpina este utilizată ca inocul în vinificație pentru a obține vinuri, de exemplu vinuri roșii, vinuri roze sau vinuri albe. În plus, ea poate fi folosită atât în fermentația primară, cât și în refermentație.

În mod avantajos, utilizarea tulpinii conform invenției într-un proces de vinificație permite producerea unui vin cu arome plăcute și echilibrate, cu o concentrație de H₂S practic inexistentă, concentrație mare de glicerol și concentrație mare de acid malic.

În mod avantajos, vinul este un vin produs din struguri selectați dintre struguri albi și struguri roșii. În plus, strugurii menționați pot fi derivați atât din soiuri autohtone de viță de vie, cât și din soiuri internaționale de viță de vie.

În special, testele de vinificație efectuate pe struguri selectați dintre garganega, kerner, trebbiano, merlot, nerello mascalese, nero d'avola și traminer au făcut posibilă obținerea unor vinuri cu aromă plăcută și gust echilibrat.

Conform variantei de realizare preferate a invenției, tulpina SERIUS este utilizată pentru producerea de vin care conține glicerol și acid malic, produs în mod natural de tulpină în următoarele concentrații: glicerol mai mult de aproximativ 8,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 10 g/l; acid malic mai mult de aproximativ 0,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 2 g/l. Tulpina SERIUS poate fi

cultivată cu ușurință și, prin urmare, este deosebit de potrivită pentru a fi utilizată pentru a produce biomasă, chiar și la scară industrială, folosind metode standard cunoscute. De preferință, producerea de biomasă folosind tulpina SERIUS se realizează pe un mediu sintetic care conține dextroză, extract de drojdie, vitamine și săruri minerale, cu fermentație de tip discontinuu în șarjă (primele 24 de ore) urmată de fermentație de tip continuu cu alimentare de șarje pentru încă 20-24 de ore. Mai preferabil, creșterea se realizează la o temperatură cuprinsă între 29 și 31°C. Tulpina produce etanol și, prin urmare, este aplicabilă în special în fermentația alimentară. Tulpina nu este patogenă pentru oameni sau animale.

Un alt aspect al invenției se referă la un inocul alimentar constând din tulpina *Saccharomyces bayanus* identificată ca SERIUS (DBVPG 36P).

De preferință, inoculul alimentar este un starter de vin.

Un aspect suplimentar, care nu este acoperit de invenția revendicată, este un vin care poate fi obținut prin utilizarea conform invenției. În mod avantajos, vinul este un vin obținut din fermentația unor struguri selectați dintre struguri albi și struguri roșii. În mod avantajos, strugurii respectivi pot proveni atât din soiuri autohtone de viță de vie, cât și din soiuri internaționale de viță de vie.

Culturi ale drojdiei *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS, care pot fi obținute prin multiplicarea tulpinii SERIUS din prezenta invenție, capabile de a fi utilizate ca inoculat alimentar pentru producerea de alimente obținute prin fermentație alcoolică, trebuie de asemenea înțeles că sunt protejate de prezenta invenție. Conform variantei de execuție preferate a prezentei invenții, tulpinile menționate sunt adaptate pentru a fi utilizate în procesele de fermentație alcoolică pentru producerea vinului, adică în procesele de vinificație.

Deosebit de preferate sunt culturile care pot fi obținute din multiplicarea tulpinii SERIUS conform invenției, adaptate pentru a fi utilizate pentru producerea vinului produs din struguri selectați dintre struguri albi și struguri roșii, în care strugurii menționați pot proveni atât din soiuri autohtone de viță de vie, cât și din soiuri internaționale de viță de vie.

De preferat, culturile menționate sunt adaptate pentru a fi utilizate pentru producerea unui vin care conține glicerol și acid malic, produse în mod natural de tulpini în următoarele concentrații: glicerol mai mult de aproximativ 8,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 10 g/l; acid malic mai mult de aproximativ 0,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 2 g/l.

Independent de specia lor, se știe că drojdiile se pot reproduce sexual pentru a asigura supraviețuirea speciei, creând o diversitate genetică, iar hibridizarea este o parte esențială a acestui ciclu de reproducere sexuală, care poate exista în natură ca atare sau poate fi indusă în laborator. Hibridizarea menționată mai sus permite obținerea de noi hibrizi de drojdie care provin dintr-o tulpină părinte, conform unui proces care este absolut non-OMG. În consecință, constituirea de tulpini hibride este un mod de evoluție pentru drojdiile naturale.

Tulpinile de drojdie obținute prin hibridizarea tulpinii SERIUS cu o tulpină de drojdie aparținând aceleiași specii, sau mai degrabă o tulpină de *Saccharomyces*, prin intermediul unei așa-numite hibridizări intraspecie, nu sunt acoperite de invenția revendicată.

Cu toate acestea, nu este exclus să poată fi obținute tulpini prin hibridizarea tulpinii SERIUS cu tulpini de drojdie de la alte specii, prin intermediul hibridizării interspecii. Un alt aspect neacoperit de invenția revendicată se referă la o metodă de selecție a tulpinilor de drojdie din flori, în special tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* și *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, adaptate la fermentația alcoolică, în special a strugurilor. Evident, prelevarea din flori poate fi transferată și către alte matrici de izolare a tulpinilor (de exemplu fructe, plante medicinale).

Metoda de selecție constă, de preferat, dintr-o etapă de izolare a drojdiilor din flori, de preferat o etapă de identificare a drojdiei, o fază de însămânțare a drojdiilor izolate pe plăci, în vederea identificării tulpinilor care sunt neproducătoare sau slab producătoare de H₂S, și o fază de inoculare în must și vinificație a strugurilor în scopul studierii caracteristicilor tehnologice și calitative ale acestora.

De preferință, strugurii utilizați sunt struguri selectați dintre struguri albi sau struguri roșii.

Se analizează vinul obținut în etapa de vinificație menționată mai sus și se determină concentrațiile de glicerol și acid malic prezente în acesta. De asemenea, se efectuează o evaluare senzorială cu scopul identificării mirosurilor neplăcute doveditoare pentru prezența compușilor sulfurați. O atenție deosebită este acordată identificării defectelor de reducere datorate prezenței H₂S. Ulterior, sunt selectate tulpini cu putere fermentativă sporită, care produc vinuri în care concentrațiile de glicerol și acid malic se încadrează în următoarele limite: glicerol mai mult de aproximativ 8,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 10 g/l; acid malic mai mult de aproximativ 0,5 g/l, de preferință mai mult de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 2 g/l; în plus, examenul senzorial nu trebuie să dea nicio percepție olfactivă a defectelor de reducere datorate prezenței H₂S, adică de preferință mai puțin de 1-1,5 μg/l.

În mod avantajos, analiza acestei combinații specifice de compuși s-a dovedit a fi foarte potrivită pentru înlocuirea unor procese de caracterizare suplimentare și laborioase și găsirea unor tulpini producătoare de vinuri cu aromă plăcută și echilibrată.

Într-o variantă preferată care nu este acoperită de invenția revendicată, metoda de selecție a tulpinilor de drojdie din specia *Saccharomyces* specificate anterior ca fiind adaptate la fermentația alcoolică, în special a strugurilor, constă din următoarele etape:

a) prelevarea de probe de flori, de preferat primăvara și în zone cu mare activitate viticolă, și chiar mai preferabil departe de crame, pentru a evita contaminarea cu drojdiile comerciale utilizate în crame care pot fi prezente nu doar în crame, ci și în zonele adiacente;

b) fermentația probelor pe substraturi adecvate și cultivarea probelor fermentate pe medii de izolare, de preferință conținând verde de bromcrezol;

c) dacă mediul de izolare conține verde de bromcrezol, identificarea presupuselor tulpini de drojdie din genul *Saccharomyces* pe baza morfologiei și culorii coloniei și diferențierea lor de drojdiile *non-Saccharomyces* de interes oenologic mai mic;

d) identificarea de materiale izolate aparținând genului *Saccharomyces* prin analiza genetică a coloniilor de drojdie izolate în etapa b) sau etapa c); în mod avantajos, analiza genetică menționată, efectuată folosind metode moleculare, permite atât identificarea speciilor de origine, cât și identificarea diferitelor tulpini, sau mai bine zis a celor individuale, prezente în cadrul unei specii date;

e) fermentația în laborator a tulpinilor selectate în etapa d) pe must sintetic și/sau pe must natural și selecția ulterioară a tulpinilor cu cele mai interesante caracteristici tehnologice și oenologice, și în același timp însămânțarea tulpinilor în mediu cu agar Biggy în vederea identificării celor care sunt neproducătoare sau slabe producătoare de H_2S ;

f) vinificația în cramă a tulpinilor selectate în etapa e) și selecția celor mai potrivite tulpini pe baza rezultatelor obținute prin analiza chimică a vinului obținut, incluzând de preferință pH-ul, zaharurile reziduale, alcoolul, aciditatea totală, parametrii de aciditate volatilă și, în special, cantitatea de glicerol, acid malic și, de preferat, hidrogen sulfurat, unde aceasta din urmă este evaluată prin mijloace olfactive.

În mod preferat, colectarea florilor și prelucrarea ulterioară a acestora se realizează cu evitarea atingerii florilor cu mâinile și cu o sterilizare periodică a echipamentului de prelevare, pentru etapele a) și b), cu scopul de a limita cât mai mult posibil contaminarea.

Cu titlu de exemplu nelimitativ, la sosirea în laborator, florile sunt transferate în baloane sterile care conțin 200 ml de must sintetic sau alt mediu de cultură capabil să susțină creșterea oricăror drojdii prezente. Adăugarea unui antibiotic la fiecare probă, pentru a evita proliferarea oricărei bacterii, s-a dovedit a fi deosebit de utilă.

În mod avantajos, preparatele sunt acoperite cu ulei de parafină steril pentru a evita dezvoltarea mucegaiului la suprafață.

Probele cu fermentație evidentă în curs sunt prelucrate pentru izolarea drojdiilor în etapa ulterioară b) sau c). Un mediu de izolare foarte potrivit și preferat pentru etapa menționată este mediul de izolare cu agar WL (4,0 g/l extract de drojdie, 5,0 g/l triptonă, 50 g/l glucoză, 550 mg/l fosfat de potasiu monobazic, 425 mg/l clorură de potasiu, 125 mg/l clorură de calciu, 125 mg/l sulfat de magneziu, 2,5 mg/l clorură feroasă, 2,5 mg/l sulfat de mangan, 22 mg/l verde de bromcrezol, 20 g/l agar, pH final $5,5 \pm 2$). Caracteristica importantă a acestui mediu este că el conține un colorant, verde de bromcrezol, care este capabil să fie absorbit de drojdii într-o măsură diferită. Prin urmare, este posibil să se caracterizeze microorganismul pe baza morfologiei coloniilor și a culorii pe care o presupune. Tulpini aparținând genului *Saccharomyces* absorb slab verde de bromcrezol și, prin urmare, coloniile lor capătă o culoare care variază de la crem la verde, permițând deosebirea lor de orice drojdie *non-Saccharomyces*. În mod avantajos, utilizarea verdelui de bromcrezol și executarea etapei c) permite reducerea simplă, și într-o etapă inițială a metodei, a numărului de tulpini care urmează a fi supuse la etapa d).

Tot în mod avantajos, înainte de etapa d), coloniile de analizat sunt supuse purificării prin intermediul uneia sau mai multor treceri de reînsămânțare pe mediu adecvat. De preferință, orice reînsămânțare are loc pe mediu de creștere cu agar WL. În mod avantajos, procedura se repetă pentru a garanta că fiecare material izolat provine cu siguranță dintr-o singură colonie.

Etapă c) este deja oarecum selectivă pentru izolarea tulpinilor aparținând grupului *Saccharomyces*, dar pe lângă *Saccharomyces* există și alte tulpini care, în acest mediu de cultură, pot prezenta morfologie și colorație foarte asemănătoare cu cele ale drojdiei *Saccharomyces*. Așadar, pentru a elimina aceste tulpini din probe și a realiza o identificare definitivă a izolatelor, este de preferat să se efectueze etapa d) care, printr-o metodă genetică rapidă și simplu de executat, face posibilă efectuarea screening-ului pe un mare număr de materiale izolate, eliminând astfel drojdiile care nu aparțin genului *Saccharomyces* și identificând oricare tulpini (=indivizi) care ar trebui să fie prezente în cadrul unei anumite specii.

În mod avantajos, evaluarea genetică preliminară menționată reduce riscul efectuării caracterizării tehnologice pe drojdii care potențial nu sunt adaptate la producerea de vin și, la fel de

avantajos, permite excluderea oricăror copii multiple ale aceleiași tulpini care pot fi prezente într-o probă dată.

Tot în mod avantajos, analiza preliminară menționată evită necesitatea testării tehnologice și chimice a tulpinilor care nu aparțin genului *Saccharomyces*.

În plus, în mod avantajos, analiza menționată face posibilă efectuarea caracterizării tehnologice și oenologice numai pe tulpini cu adevărat diverse, și nu pe orice posibile copii multiple ale aceleiași tulpini.

Pentru a confirma originea din genul *Saccharomyces* și, prin urmare, a exclude drojdiile aparținând unor genuri diferite și, astfel, neinteresante din punct de vedere oenologic, este de preferat să se utilizeze caracterizarea genetică ce vizează utilizarea tehnicii PCR. În acest scop pot fi utilizate atât tehnici de PCR specifice, capabile să recunoască diferitele specii de drojdie, cât și tehnici de RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA analysis), cunoscute specialiștilor în domeniu.

În mod avantajos, în cazurile în care utilizarea metodelor de PCR nu permite identificarea fiabilă a tulpinii, este posibil să se recurgă la analiza potențială a secvenței de ADN; această analiză face posibilă distincția între *S. cerevisiae*, *S. bayanus* și *S. bayanus* subsp. *uvarum*, specii care sunt strâns înrudite filogenetic și de mare interes oenologic, cu caracteristici metabolice astfel încât să le permită supraviețuirea și creșterea în vin. De preferință, secvențierea se referă la regiunea ITS (Internal Transcribed Spacer) a operonului ribozomal.

Conform variantei de realizare preferate a metodei neacoperite de invenția revendicată, caracterizarea genetică la nivel de tulpină în etapa d) este realizată prin intermediul analizei profilului de restricție al ADN-ului mitocondrial, obținut prin digestia enzimatică a ADN-ului total. Digestia enzimatică a ADN-ului total este de preferință efectuată folosind enzima *Hinf*I. Analiza genetică de acest tip face posibilă reunirea drojdiilor în grupuri, fiecare având un profil genetic diferit, comun tuturor materialelor izolate aparținând grupului respectiv. Pe baza datelor genetice colectate, este apoi posibilă efectuarea screening-ului pe drojdiile colectate, evitând selecția mai multor copii ale aceleiași tulpini.

Conform unei variante de execuție a metodei care nu este acoperită de invenția revendicată, caracterizarea genetică prin analiza polimorfismului de restricție al ADN-ului mitocondrial este utilizată în asociere cu analiza microsateliților. Microsateliții sunt secvențe repetitive de ADN necodificator, constând din unități repetate foarte scurte (1-5 pb) dispuse ca repetări în tandem care pot fi utilizate ca markeri moleculari ai locusurilor genetice. Conform variantei de realizare preferate a metodei neacoperite de invenția revendicată, analiza microsateliților pentru specia *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* se efectuează pe cele opt locusuri cele mai variabile, descrise de Masneuf-Pomarede și colab., în anul 2016. Condițiile de analiză sunt ulterior raportate detaliat (exemplu 1, pct. 1.6). În general, se efectuează o reacție pentru fiecare locus numit: SuYIL130W (16 forme alelice), SuYHR102W (8 forme alelice), SuYKR045C (10 forme alelice), SuHTZ1PLB3 (7 forme alelice), SuARS409 (5 forme alelice), SuYHR042-043 (5 forme alelice), SuYBR049C (5 forme alelice), SuYGC170W (4 forme alelice). Ulterior, pentru definirea profilului și caracterizarea tulpinilor, se realizează amplificarea produselor de PCR aferente celor opt locusuri menționate mai sus, în plus față de migrarea prin electroforeză pe gel de agaroză, în conformitate cu metode cunoscute.

În mod avantajos, conform metodei, ulterior etapei d), opțional, pentru caracterizarea drojdiilor *S. bayanus* subsp. *uvarum*, o analiză suplimentară a celor opt locusuri descrise mai sus este efectuată prin intermediul PCR multiplex, de preferință două reacții de PCR multiplex, definite ca PCR1 multiplex și PCR2 multiplex. Prin intermediul respectivei PCR multiplex, este posibil să se amplifice simultan mai mult de un locus la un moment dat. În special, PCR1 multiplex și PCR2 multiplex permit amplificarea a trei și, respectiv, cinci locusuri. În detaliu, PCR1 multiplex permite analiza profilului de ADN-microsateliți pentru locusurile SuYIL130W, SuYHR102W și SuYGC170W, în timp ce PCR2-multiplex face posibilă obținerea profilului de ADN-microsateliți pentru locusurile SuYKR045C, SuHTZ1PLB3, SuARS409, SuYHR042-043 și

Pentru a caracteriza în plus drojdiile *S. bayanus* subsp. *uvarum*, înainte de etapa e), este posibilă efectuarea unei analize genetice suplimentare prin electroforeză capilară bazată pe amplificarea celor patru locusuri caracterizate printr-un număr mai mare de forme alelice, selectate în conformitate cu datele raportate în literatură.

În mod avantajos, caracterizarea menționată face posibilă definirea mărimii exacte a produselor de PCR pentru locusurile luate în considerare.

Locusurile luate în considerare sunt următoarele: SuYIL130W, SuYHR102W, SuYKR045C și SuHTZ1PLB3.

De preferat, pentru caracterizarea etapei e) la nivel tehnologic se evaluează următorii parametri: putere fermentativă, înțelesă a fi cantitatea de zahăr consumată după 2 și după 7 zile și durata fermentației, capacitatea de producere a spumei, tipul de creștere, producția de hidrogen sulfurat (pe mediu Agar Biggy), producția de glicerol, producția de aciditate volatilă, capacitatea de a produce sau degrada acidul malic, profilul olfactiv al materialelor fermentate.

În ceea ce privește progresia fermentațiilor, acestea sunt monitorizate pe probe de must sintetic și/sau must natural, de preferat pe ambele tipuri de must. Principalii parametri monitorizați se referă de preferat la: pH, zaharuri reziduale, nivelul de alcool, aciditatea totală, aciditatea volatilă, puterea fermentativă, producția de glicerol, producția/degradarea acidului malic, profilul olfactiv. Testele de vinificație în cramă pentru etapa f) se efectuează de preferință pe musturi din struguri albi și musturi din struguri roșii.

În mod avantajos, analiza progresiei fermentației pentru tulpinile de pe musturi atât din boabe albe, cât și din boabe roșii, face posibilă verificarea progresiei și evaluarea activității unei tulpini pentru producerea de vinuri albe, roze și roșii, în funcție de nevoile specifice.

Deosebit de avantajos, faza de vinificație a metodei se realizează pe struguri atât din soiuri autohtone de viță de vie, cât și din soiuri internaționale de viță de vie. De preferat, în vinul obținut se determină concentrațiile de glicerol, acid malic și hidrogen sulfurat, iar tulpinile producătoare de vin sunt selectate atunci când concentrațiile îndeplinesc următoarele limite: glicerol mai mult de aproximativ 8,5 g/l, de preferat mai mult de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 10 g/l; acid malic mai mult de aproximativ 0,5 g/l, de preferat mai mult de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 2 g/l; și hidrogen sulfurat sub nivelul de percepție olfactiv, adică mai puțin de aproximativ 1-1,5 μg/l. În mod avantajos, vinul produs cu tulpina SERIUS se caracterizează prin prezența unor cantități mari de glicerol și acid malic, în timp ce cantitatea de hidrogen sulfurat este deosebit de redusă. În special, vinul produs de tulpina conform invenției are glicerol în cantități care depășesc 9 g/l, acid malic în cantități care depășesc 1,1 g/l și H₂S în cantități mai mici decât nivelul olfactiv de percepție.

Parametrii tehnologici și chimici examinați pot varia în funcție de caracteristicile cerute de tulpină și, de asemenea, depind de tipul de vin care urmează să fie produs folosind tulpina selectată. Selecția celor mai potrivite tulpini la sfârșitul etapelor individuale este de preferat o selecție combinată luând în considerare toate rezultatele tuturor analizelor efectuate.

Această metodă de selecție garantează selecția mai multor izolate de drojdie provenite din flori.

Exemple particulare de executare a etapelor individuale au fost descrise în exemplele 1, 2 și 3. Etapele individuale ar trebui considerate ca fiind independente una de cealaltă, adică executarea etapei d) într-un mod definit nu implică automat, de exemplu, executarea etapei e) exact așa cum este raportat în exemple. Parametrii dintr-o etapă (de exemplu, tipurile de parametri tehnologici testați) pot fi modificați independent de celelalte etape.

Scurtă descriere a figurilor

Figura 1 prezintă arborele filogenetic construit pe baza secvențelor ITS, în care tulpina SERIUS conform prezentei invenții este indicată ca P16063.BI01;

Figura 2 prezintă profilul de restricție al ADN-ului mitocondrial pentru tulpina conform invenției, obținut folosind enzima *Hinf*I, indicat prin numărul 1), în care profilul indicat ca M corespunde markerului de greutate moleculară;

Figura 3 prezintă rezultatele electroforezei pe gel de agaroză pentru fiecare produs de PCR obținut prin amplificarea ADN-ului din tulpina SERIUS la cele opt locusuri cele mai variabile. Ordinea de încărcare afișată este următoarea:

(M) Marker O'Gene Ruler (Fermentas),

(1) Produs de PCR pentru locusul SuYIL130W,

(2) Produs de PCR pentru locusul SuYHR1 02W,

(3) Produs de PCR pentru locusul SuYKR045C,

(4) Produs de PCR pentru locusul SuHTZ1 PLB3,

(5) Produs de PCR pentru locusul SuARS409,

(6) Produs de PCR pentru locusul SuYHR042-043,

(7) Produs de PCR pentru locusul SuYBR049C,

(8) Produs de PCR pentru locusul SuYGCI70W,

(9) profilul obținut prin încărcarea produselor de amplificare obținute în reacțiile de PCR individuale pentru locusurile SuYIL130W, SuYHR102W, SuYKR045C și SuHTZ1PLB3 în același godeu,

(10) profilul obținut prin încărcarea produselor de amplificare obținute în reacțiile de PCR individuale pentru locusurile SuARS409, SuYHR042-043, SuYBR049C și SuYGCI70W în același godeu;

Figura 4 prezintă rezultatul electroforezei pentru cele 2 reacții de PCR multiplex pe gel de agaroză 3%, în ordinea de încărcare corespunzătoare următoarelor:

(M) Marker O'Gene Ruler (Fermentas),

- (1) produs de multiplex-PCR1 pentru locusurile SuYIL130W, SuYHR102W și SuYGC170W,
 (2) produs de multiplex-PCR2 pentru locusurile SuYKR045C, SuHTZ1 PLB3, SuARS409, SuYHR042-043 și SuYBR049C.

5 EXEMPLUL 1 - Etape de izolare și selecție pentru tulpina conform invenției

1.1 Prelevarea de probe

10 Prelevarea de probe a fost efectuată prin colectarea florilor în timpul primăverii, într-o zonă din regiunea Veneto cu activitate mare de producție de struguri și vin.

Colectarea s-a realizat cu evitarea atingerii florilor cu mâna goală în toate etapele și sterilizarea periodică a foarfecelor, cu scopul de a limita pe cât posibil contaminarea.

15 Florile au fost recoltate în cantități suficiente pentru a umple un sac steril sigilat corespunzător. La sosirea în laborator, florile au fost transferate în baloane sterile care conțin 200 ml must sintetic, pregătit în prealabil în apă distilată, ajustat la pH 3,2 folosind KOH, și sterilizate prin filtrare, a căror compoziție este raportată în tabelul 1.

Tabelul 1

Categoria de componente	Componentă	Doză pe litru
Macroelemente	CaCl ₂	0,1 g
	NaCl	0,1 g
	KH ₂ PO ₄	1 g
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,5 g
	Acid tartric	3 g
Microelemente	NaMoO ₄ × 2H ₂ O	0,2 mg
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,4 mg
	H ₃ BO ₃	0,5 mg
	CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,04 mg
	KI	0,1 mg
	FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,4 mg
	MnSO ₄ × H ₂ O	0,4 mg
Vitamine	Clorhidrat de piridoxină	400 μg
	Clorhidrat de tiamină	400 μg
	Inozit	2000 μg
	Biotină	20 μg
	Pantotenat de calciu	400 μg
	Nicotinamidă	400 μg
	Acid p-aminobenzoic	200 μg
Componente variabile	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 g
	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,3 g
	Glucoză	200 g
	Hidrolizat de cazeină	0,2 g
	Acid malic	2 g

20 În plus, mustul sintetic a fost suplimentat cu antibioticul, oxitetraciclină, în concentrație de 0,1 mg/ml, pentru a se evita orice proliferare bacteriană. Preparatele au fost apoi acoperite cu ulei de parafină steril pentru a evita formarea mușgaiului. Baloanele au fost etanșate cu un dop de silicon găurit, în care a fost introdusă o pipetă Pasteur, curbată la capătul superior. Aceasta are scopul de a evita contaminarea potențială cu microorganisme prezente în mediu și de a permite CO₂ să se evacueze fără pierderi de

vapori de apă. Baloanele au fost plasate într-un incubator la o temperatură constantă cuprinsă între 22°C și 25°C.

Progresia fermentației a fost monitorizată prin măsurarea scăderii în greutate pentru fiecare balon (un indicator al fermentației zaharurilor la CO₂ și astfel al progresiei fermentației).

1.2 Izolarea tulpinilor din probe

Atunci când fermentația este completă, din fiecare balon s-au scos 10 ml de produs, s-a efectuat o primă diluție în serie 1:10, din care s-a îndepărtat 1 ml și s-au efectuat 5 diluții în serie ulterioare (1:10) în soluție Ringer; 100 μl din cele trei diluții finale au fost apoi însămânțate prin răspândire pe mediu WL agar (4,0 g/l extract de drojdie, 5,0 g/l triptonă, 50 g/l glucoză, 550 mg/l fosfat de potasiu monobazic, 425 mg/l clorură de potasiu, 125 mg/l clorură de calciu, 125 mg/l sulfat de magneziu, 2,5 mg/l clorură de fier, 2,5 mg/l sulfat de mangan, 22 mg/l verde de bromcrezol, 20 g/l agar) sterilizate corespunzător cu autoclavă și ajustate la un pH final de 5,5 ± 2. Plăcile au fost apoi incubate la 28°C timp de 3 zile în condiții aerobe. În acest mediu, colonii de drojdie din genul *Saccharomyces* apar cu culori variate, de la crem la verde deschis, cu o suprafață netedă-opacă și o consistență cremoasă. Numărarea drojdiilor a relevat o concentrație de *Saccharomyces* de aproximativ 10⁷ UFC/ml, cu prezența atât a coloniilor albe, cât și a celor verzi, cu o suprafață netedă-opacă și o consistență cremoasă.

1.3 Purificarea depozitarea izolatelor

Coloniile repicate de pe plăcile de izolare au fost reînsămânțate pe mediu de creștere WL agar, a cărui compoziție a fost specificată la punctul 1.2 din exemplul 1. Procedura a fost repetată de cel puțin două ori, pentru siguranța că fiecare izolat provine dintr-o singură colonie. Culturile pure obținute în urma trecerii finale pe plăci au fost repicate folosind o ansă sterilă și apoi crioconservate la -80°C după adăugarea de glicerol la 40% (g/g). Pe plăci, tulpina, identificată ulterior ca *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, apare sub formă de colonii mici, cu o culoare verde intens, în timp ce tulpini care pot fi atribuite speciei *Saccharomyces cerevisiae* provin din colonii mai mari, cu o consistență cremoasă, colorate în alb sau cu tendința spre verde deschis.

1.4 Identificarea izolatelor la nivelul de specie și tulpină

Presupusele colonii ale drojdiilor *Saccharomyces* au fost identificate la nivelul de specie prin RAPD-PCR folosind primerul M13, conform metodei descrise de Andrighetto și colab. în anul 2000. În analiza și prelucrarea ulterioară a profilurilor de amplificare pentru drojdiile izolate din flori, au fost incluse și tulpini tip și de referință din diferite specii de drojdie de interes oenologic și non-oenologic. Compararea profilurilor a făcut posibilă recunoașterea drojdiilor care pot fi atribuite speciei *S. cerevisiae* și *S. bayanus*.

Pentru a putea face deosebirea la nivelul de tulpină, au fost utilizate două tehnici:

- 1) Analiza profilurilor de restricție ale ADN-ului mitocondrial;
 - 2) Analiza microsateiților;
- care vor fi descrise în detaliu în exemplele de execuție din secțiunea 1.6.

Nu este exclus ca implementarea tehnicilor genetice menționate să poată fi realizată folosind metode în sine cunoscute specialiștilor în domeniu și, prin urmare, indicațiile tehnice descrise în lucrarea de față pot varia față de cele raportate în exemplele menționate mai sus.

1.5 Caracterizarea tehnologică a tulpinilor izolate

Pentru aprecierea caracteristicilor de fermentație, fiecare dintre drojdiile selectate a fost supusă testului de fermentație, folosind must natural sau sintetic conform compoziției descrise în tabelul 1.

Inoculul a fost preparat în must sintetic sau natural (în funcție de cum s-a efectuat testul de evaluare a puterii fermentative, pe must sintetic sau must natural), pornind de la un vârf de ansă de sarmă prelevat dintr-o cultură de creștere în pantă sau pe placă și a fost apoi incubat la 25°C timp de 24 de ore. Ulterior, acesta a fost inoculat la nivel de aproximativ 10% în must sintetic sau natural cu un volum final de 200 ml, în baloane etanșate cu un dop de silicon găurit central, în care a fost introdusă o pipetă Pasteur, îndoită astfel încât să permită evacuarea dioxidului de carbon fără pierderea de vapori de apă.

Scăderea în greutate din cauza pierderii de CO₂ din baloane, pregătite pentru testarea fermentației, a fost monitorizată zilnic până la finalizarea fermentației, corespunzând fazei în care scăderea în greutate a rămas constantă timp de câteva zile. Pentru fiecare izolat crescut, capacitatea de a produce spumă în timpul fermentației a fost evaluată prin intermediul evaluării vizuale. La fel, prin

intermediul evaluării vizuale, a fost evaluată metoda de creștere pentru tulpină în timpul fermentației (pulverulentă sau floculantă).

În cele din urmă, pentru evaluarea producției de hidrogen sulfurat, fiecare izolat a fost însămânțat pe mediu cu agar Biggy (Bismut Glucoză Glicină Drojdie Agar: 5 g/l citrat de bismut și amoniu, 3 g/l sulfit de sodiu, 10 g/l glucoză, 10 g/l glicină, 1 g/l extract de drojdie, 16 g/l agar, pH 6,8 ± 0,2) și incubat la 25°C timp de 5 zile, după care s-a evaluat culoarea coloniilor crescute pe plăci. Cantitatea de hidrogen sulfurat este direct proporțională cu intensitatea culorii, datorită formării sulfidului de bismut (maro închis dacă este prezent în cantități semnificative). Caracterizarea tehnologică a izolatelor din flori a făcut posibilă identificarea anumitor tulpini de drojdie *Saccharomyces*, inclusiv tulpina *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS, dotată cu caracteristici oenologice promițătoare.

1.6 Caracterizare genetică la nivelul de tulpină

Pentru a realiza caracterizarea la nivelul de tulpină au fost utilizate două tehnici:

- Analiza profilurilor de restricție ale ADN-ului mitocondrial;
- Analiza microsateliților.

Analiza profilurilor de restricție a fost efectuată urmând metoda raportată în Zilio și colab., în 1998, folosind enzima de restricție *Hinf I*. Separarea fragmentelor de ADN lineare a fost obținută prin electroforeză pe gel de agaroză 1%. Compararea profilurilor de restricție a fost realizată folosind software-ul GelComparII (Applied Maths, Belgia) care, prin construirea unei matrice, este capabil să calculeze nivelul de similitudine dintre profiluri și să exprime rezultatele grafic sub forma unei dendrograme. Profilul de restricție al ADN-ului mitocondrial pentru tulpina SERIUS conform invenției, obținut folosind enzima *Hinf I*, este prezentat în figura 2.

Analiza microsateliților are în vedere utilizarea tehnicii PCR cu primeri care sunt complementari regiunilor ADN-ului cunoscute sub numele de microsateliți, care sunt secvențe mici de ADN repetat în tandem (de la una la șase baze) care variază în numărul de repetări și pot fi localizate, de asemenea, în interiorul regiunii de codificare genomică (Legras, 2005). Acestea sunt extrem de variabile ca lungime, ca urmare a erorilor de replicare a ADN-ului și, prin urmare, prezintă un anumit grad de polimorfism între indivizii din aceeași specie. Analiza polimorfismului microsateliților este o metodă foarte reproductibilă, deoarece pentru amplificarea lor se folosesc primeri specifici și temperaturi ridicate de normalizare. Pentru caracterizarea tulpinii *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS, au fost luate în considerare cele opt locusuri cele mai variabile descrise de Masneuf-Pomarede și colab. în 2016 și s-a efectuat o reacție pentru fiecare locus denumit: SuYIL130W (16 forme alelice), SuYHR102W (8 forme alelice), SuYKR045C (10 forme alelice), SuHTZ1PLB3 (7 forme alelice), SuARS409 (5 forme alelice), SuYHR042-043 (5 forme alelice), SuYBR049C (5 forme alelice), SuYGC170W (4 forme alelice).

Reacția a fost efectuată într-un volum de 20 μl folosind 1 U de ADN polimerază în tampon 1x, cu adăugarea de clorură de magneziu (MgCl₂) la o concentrație de 1,5 mM, nucleotid trifosfați (dNTPs) la o concentrație de 200 μM și 1 μM pentru fiecare dintre primeri pentru fiecare reacție.

Amplificarea a fost efectuată într-un aparat Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf) cu un program termic unic pentru toate reacțiile de amplificare, cu excepția temperaturii de normalizare (Ta). Protocolul termic utilizat este raportat în tabelul 2 de mai jos (numărul de repetări pentru fiecare ciclu este raportat între paranteze).

Tabelul 2

Protocol de amplificare		
Ciclu	Temperatură	durată
Ciclul 1 (1x)	94°C	5 min
Ciclul 2 (30x)	94°C	30 s
	Ta°C	30 s
	72°C	30 s
Ciclul 3 (1x)	72°C	10 min

Ta utilizată a fost stabilită la 55°C pentru reacțiile PCR referitoare la locusurile SuYIL130W, SuYHR102W și SuYGC170W; în timp ce Ta menționată mai sus a fost stabilită la 50°C pentru reacțiile PCR referitoare la locusurile SuYKR045C, SuHTZ1 PLB3, SuARS409, SuYHR042-043 și SuYBR049C.

Amplificarea și migrarea prin electroforeză pe gel de agaroză a produselor de PCR referitoare la cele opt locusuri cele mai variabile din *S. bayanus* var. *uvarum*, au făcut posibil, pentru tulpina de

Saccharomyces bayanus subsp. uvar SERIUS, să se definească profilul unic și caracteristic reprodus în figura 3.

Pe lângă reacția PCR individuală, cele opt locusuri menționate mai sus au fost analizate și prin intermediul a două reacții multiplex, capabile de amplificarea simultană a trei și, respectiv, cinci locusuri.

În special, au fost utilizate două reacții multiplex-PCR: multiplex-PCR1 permite analiza profilului de ADN-microsateliți pentru locusurile SuYIL130W, SuYHR102W și SuYGC170W, iar multiplex-PCR2 permite obținerea profilului de ADN-microsateliți pentru locusurile SuYKR045C, SuHTZ1 PLB3, SuARS409, SuYHR042-043 și SuYBR049C.

Cele două reacții multiplex-PCR au fost efectuate într-un volum de 20 μ l, folosind 1,5 U și, respectiv, 1 U de ADN polimerază în 1 x tampon cu adăugare de clorură de magneziu ($MgCl_2$) la o concentrație de 1,5 mM și nucleotid trifosfați (dNTP-uri) la o concentrație de 200 μ M. Concentrația primerilor a fost optimizată după cum urmează.

În cazul multiplex-PCR1, cei doi primeri pentru locusul SuYIL130W au fost adăugați la o concentrație de 0,25 μ M, cei doi primeri pentru locusul SuYHR102W la o concentrație de 0,75 μ M, în timp ce cei doi primeri pentru locusul SuYGC170W la o concentrație de 1 μ M.

În cazul multiplex-PCR2, cei doi primeri pentru locusul SuYKR045C, SuHTZ1 PLB3, SuARS409, SuYHR042-043 și SuYBR049C au fost aplicați la o concentrație de 0,5 μ M.

Amplificarea a fost efectuată într-un aparat Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf) cu un program termic unic pentru toate reacțiile de amplificare, cu excepția temperaturii de normalizare (T_a). Programul termic utilizat este raportat în tabelul 3 de mai jos (numărul de repetări pentru fiecare ciclu este raportat între paranteze).

Tabelul 3

Protocol de amplificare		
Ciclu	temperatură	durată
Ciclul 1 (1x)	94°C	5 min
Ciclul 2 (30x)	94°C	30 s
	T_a °C	30 s
	72°C	30 s
Ciclul 3 (1x)	72°C	10 min

În cazul multiplex-PCR1, T_a utilizată a fost de 55°C, în timp ce în cazul multiplex-PCR 2 a fost de 50°C.

Profilurile obținute în urma analizei menționate mai sus sunt raportate în figura 4.

Mai mult, caracterizarea tulpinii conform invenției a fost realizată și prin intermediul electroforezei capilare bazată pe amplificarea celor patru locusuri care, conform datelor din literatură, sunt caracterizate printr-un număr mai mare de forme alelice.

În mod avantajos, caracterizarea menționată a făcut posibilă definirea mărimii exacte a produselor de PCR pentru cele 4 locusuri luate în considerare.

Locusurile luate în considerare sunt următoarele: SuYIL130W, SuYHR102W, SuYKR045C și SuHTZ1 PLB3. Amplificarea a fost efectuată conform protocolului raportat anterior, varianta unică constând în modificarea capătului 5' al primerilor direct cu o moleculă fluorescentă. În special, SuYIL130W-FW și SuYKR045C-FW au fost etichetate cu Hexaclorofluoresceină (HEX), în timp ce SuHTZ1 PLB3-FW și SuYHR102W-FW au fost etichetate cu 6-carboxifluoresceină (FAM).

Analiza profilului capilar a fost efectuată folosind filtrul D, cu referință internă ROX. Interpretarea a fost efectuată folosind software-ul Peak Scanner 2.0, cu următorii parametri: „standard de mărime: GS500 (-250)” și „metoda de analiză: dimensionare implicită - NPP”. Rezultatele obținute, și anume mărimile fragmentelor, sunt raportate în Tabelul 4 și sunt exprimate în perechi de baze (pp) cu o eroare de +/- 1 pb.

Tabelul 4

Tulpina	SuYIL 130W	SuYHR102W	SuYKR045C	SuHTZ1 PLB3
<i>Saccharomyces bayanus</i> var. <i>uvarum</i> SERIUS	179	219	300	259

Nu este exclus ca implementarea tehnicilor genetice menționate să poată fi efectuată folosind metode în sine cunoscute specialiștilor în domeniu și, prin urmare, indicațiile tehnice menționate mai sus să difere de cele raportate.

5 Exemplu 2 - Caracterizarea tehnologică a drojdiei

2.1 Producerea de hidrogen sulfurat

10 Producerea de hidrogen sulfurat de către tulpina SERIUS a fost evaluată prin incubare la 25°C timp de 5 zile în mediu de Agar Biggy (1 g/l extract de drojdie, 10 g/l glicină, 10 g/l dextroză, 5 g/l citrat de bismut amoniu, 3 g/l sulfit de sodiu, 16 g/l agar). La terminarea incubării, în acest mediu, coloniile apar cu culori diferite, în funcție de cantitatea de hidrogen sulfurat pe care o produc. Coloniile de culoare maro închis indică producție mare de hidrogen sulfurat, coloniile de culoare maro-bej limpede indică producție moderată, în timp ce coloniile albe se caracterizează prin faptul că sunt incapabile să o producă.

15 În urma incubării pe mediu de agar Biggy, coloniile tulpinii conform invenției apar de culoare albă, așadar, în condițiile testate, tulpina este incapabilă de a produce H₂S. Testarea s-a repetat și prin analiza producției de hidrogen sulfurat în mediu Agar cu acetat de plumb (15 g/l peptonă, 5 g/l pepton proteoză, 1 g/l dextroză, 0,2 g/l acetat de plumb, 0,08 g/l tiosulfat de sodiu, 15 g/l agar) incubat la 25°C, iar rezultatele obținute au fost analoge cu cele obținute cu mediul de agar Biggy.

20

2.2 Putere fermentativă

S-a evaluat puterea fermentativă a tulpinii conform invenției atât la mustul sintetic, ale cărui caracteristici sunt descrise în exemplul 1, punctul 1.1, cât și la diferite tipuri de must natural de struguri albi și de struguri roșii. Inoculul a fost preparat în must sintetic sau natural (în funcție de faptul dacă testul de evaluare a puterii fermentative s-a efectuat pe must sintetic sau must natural), pornind de la un vârf de ansă de sârmă prelevat dintr-o cultură cu creștere în pantă sau în plăci, și a fost apoi incubat la 25°C timp de 24 de ore. Ulterior, acesta a fost inoculat la nivel de aproximativ 10% în must sintetic sau natural cu un volum final de 200 ml, în baloane etanșate cu un dop de silicon găurit central, în care a fost introdusă o pipeta Pasteur, îndoită astfel încât să permită evacuarea dioxidului de carbon fără pierderi de vapori de apă. Astfel s-a putut urmări progresia fermentației prin monitorizarea scăderii în greutate datorată producției de CO₂, un indicator al fermentației zaharurilor. Incubarea s-a efectuat la o temperatură constantă de 25°C, iar evaluarea pierderii în greutate s-a efectuat la fiecare 1-2 zile, până la atingerea greutății constante. Folosind datele colectate, au fost realizate curbele de creștere și puterea fermentativă a tulpinii *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* SERIUS a fost comparată cu puterea fermentativă a tulpinilor comerciale de *Saccharomyces bayanus* și *cerevisiae*. În diferitele teste de fermentație, tulpina conform invenției a demonstrat o bună capacitate de fermentație, cu valori medii de pierdere în greutate la 2 și 7 zile care sunt analoge cu cele observate la drojdiile comerciale din specia *Saccharomyces cerevisiae*, iar timpii de finalizare a fermentației variază în funcție de tipul de must folosit (de la 10 la 15 zile).

40

Puterea fermentativă a tulpinii a fost evaluată și în mustul natural obținut din strugurii Trebbiano, prin incubare la temperaturi de 12, 15 și 24°C. Analiza relevă că tulpina are o capacitate fermentativă bună, chiar și la temperaturi de 12°C și 15°C.

În mod avantajos, această ultimă caracteristică a tulpinii conform invenției permite utilizarea acesteia în fermentațiile vinului la temperaturi scăzute, crescând astfel posibilitatea activării unor reacții biochimice specifice care conduc la producerea de compuși aromatici cu influență pozitivă asupra calităților organoleptice ale vinului produs.

45

2.3 Producerea de glicerol

50

Producerea de glicerol a fost evaluată prin HPLC (detector Jasco RI 930, coloană RezexTM ROA-Acid Organic H + 8% (300 X 7,8 mm) în must natural de struguri albi și de struguri roșii inoculat cu tulpina SERIUS, cu incubare la 25°C până la finalizarea fermentației.

În plus, au fost constituite teste comparative în care a fost inoculată o tulpină comercială de *Saccharomyces cerevisiae*. Rezultatele obținute sunt raportate în tabelul 5, unde cantitatea de glicerol produsă este exprimată în g/l. Se poate observa că tulpina conform invenției prezintă o producție semnificativă de glicerol, mai mare în medie decât cantitatea de glicerol produsă în același must de drojdia comercială utilizată drept comparație.

60

Tabelul 5

	musturi de struguri albi			musturi de struguri roșii		
Tulpină	Garganega	Kerner	Trebbiano	Merlot	Nerello Mascalese	Nero d'Avola
SERIUS	8,8	10,6	8,7	9,1	9,8	9,5
<i>S. cerevisiae</i> comercială	6,8	7,5	5,8	8,1	8,1	6,5

2.4 Producerea de acid malic

- 5 Tulpina conform invenției a fost testată pentru capacitatea de a produce acid malic în must natural de struguri albi și de struguri roșii, după incubare la 25°C până la finalizarea fermentației. În special, cantitatea de acid malic prezentă în diferitele musturi înainte și după fermentație folosind tulpina menționată mai sus a fost evaluată cu ajutorul detectorului HPLC Jasco UV 975, coloană Resex™ ROA-Acid Organic H+ 8% (300 X 7,8 mm). În mod analog cu exemplul 2.3, au fost efectuate teste comparative
- 10 cu un inocul al tulpinii comerciale de *Saccharomyces cerevisiae* folosită anterior. Rezultatele obținute sunt raportate în tabelul 6 unde cantitatea de acid malic este exprimată în g/l. Se poate observa că tulpina SERIUS este capabilă să producă acid malic, chiar dacă cu eficiență variabilă, în 5 din cele 6 musturi testate, spre deosebire de tulpina comercială, care se caracterizează prin capacitatea de a degrada parțial acidul malic.

Tabelul 6

Must	Înainte de fermentație	de Sfârșitul fermentației cu SERIUS	cu Sfârșitul fermentației cu <i>S. cerevisiae</i> comercială
Garganega	1,3	3,9	1,2
Kerner	3,0	4,0	2,1
Trebbiano	1,8	1,3	1,5
Merlot	2,3	3,0	1,2
Nerello Mascalese	2,8	3,1	1,4
Nero d'Avola	1,5	2,5	1,2

2.5 Producerea de aciditate volatilă

- 20 Capacitatea de a produce acid acetic a fost evaluată cu ajutorul detectorului HPLC Jasco RI 930, coloană Rezex™ ROA-Acid Organic H+ 8% (300 X 7,8 mm) în must natural de struguri albi și de struguri roșii inoculat cu tulpina SERIUS, incubat la 25°C până la finalizarea fermentației. Teste comparative inoculate cu o tulpină comercială de *Saccharomyces cerevisiae* au fost de asemenea constituite. Rezultatele obținute sunt raportate în tabelul 7, unde sunt raportate valorile producției de acid acetic, exprimate în g/l, demonstrând că tulpina conform invenției se caracterizează prin capacitatea de a produce o aciditate volatilă mică.

Tabelul 7

Must	Înainte de fermentație	de Sfârșitul fermentației cu SERIUS	cu Sfârșitul fermentației cu <i>S. cerevisiae</i> comercială
Garganega	0	0,11	0,29
Kerner	0	0,22	0,18
Trebbiano	0	0,16	0,23
Merlot	0	0,30	0,39
Nerello Mascalese	0	0,22	0,46
Nero d'Avola	0	0,1	0,18

2.6 Activitate ucigașă

Prezența activității ucigașe la drojdia SERIUS a fost studiată utilizând mediu de agar YEPD, preparat prin inocularea prealabilă și incubarea peste noapte a unei culturi dintr-o tulpină indicator sensibilă. Ca mod de operare, după ce s-au lăsat plăcile menționate incluzând tulpina indicator să se usuce, 10 μ l dintr-o cultură proaspătă a tulpinii SERIUS au fost depuși pe ele și aceleași plăci au fost lăsate să se incubeze timp de 48 de ore la 25°C. Ulterior, la încheierea perioadei de incubare, activitatea ucigașă a fost detectată prin apariția "halourilor de inhibare" (un halou de inhibare este înțeles ca fiind o zonă cu absența creșterii) în jurul coloniei tulpinii testate.

În ceea ce privește tulpina SERIUS, activitatea ucigașă a fost testată în raport cu 10 tulpini de drojdie oenologică aparținând speciei *S. cerevisiae* și, respectiv, *S. bayanus*.

Analiza a arătat că niciuna dintre drojdiile testate nu a fost inhibată de tulpina conform invenției. În plus, niciuna dintre cele 10 drojdii testate nu a demonstrat capacitatea de a inhiba tulpina SERIUS.

2.7 Rezistență la cupru și rezistență la dioxid de sulf

Rezistența la cupru a fost testată prin creșterea în mediu sintetic YNB (Drojdie Azot Bază), caracterizat prin absența aminoacizilor și prezența a 6,7 g/l sulfat, 20 g/l glucoză și 20 g/l agar, suplimentat cu diverse concentrații de CuSO_4 (50, 100, 200, respectiv 300 $\mu\text{mol/l}$). În ceea ce privește rezistența la dioxid de sulf, aceasta a fost evaluată prin creșterea pe plăci conținând agar, în must suplimentat cu metabisulfid de potasiu în astfel de concentrații încât să dea o concentrație de SO_2 finală corespunzătoare practic la 50, 100, 200 și 300 ppm. Ambele analize descrise mai sus au fost efectuate prin incubarea tulpinii SERIUS în mediu preparat anterior timp de 48 de ore la 26°C, și s-a evaluat o creștere vizibilă pe plăci.

Rezultatele obținute sunt raportate în tabelul 8, exprimate ca MTC (Concentrația maximă tolerată, de cupru sau, respectiv, de dioxid de sulf). După cum se poate observa din următorul tabel, tulpina SERIUS demonstrează capacitatea de a crește în prezența a 300 ppm de SO_2 și 300 $\mu\text{mol/l}$ de cupru.

Prin comparație, testele menționate mai sus au fost efectuate și pe 5 tulpini de *S. cerevisiae* pentru uz oenologic.

Tabelul 8

Tulpina	MTC SO_2 (ppm)	MTC CuSO_4 ($\mu\text{mol/l}$)
SERIUS	300	300
<i>S. cerevisiae</i> 1 comercială	300	50
<i>S. cerevisiae</i> 2 comercială	300	50
<i>S. cerevisiae</i> 3 comercială	50	50
<i>S. cerevisiae</i> 4 comercială	300	100
<i>S. cerevisiae</i> 5 comercială	300	100

2.8 Toleranța la etanol

Toleranța la etanol a fost testată folosind, creșterea pe plăci conținând agar, în must incluzând concentrații variate de etanol, corespunzătoare la 12, 14, 16 și, respectiv, 18%. Tulpina SERIUS a fost incubată în respectivul mediu timp de 48 de ore la 26°C, după care s-a evaluat creșterea vizibilă pe plăci.

Analiza arată că tulpina SERIUS are o valoare MTC pentru etanol egală cu 16% vol/vol.

2.9 Utilizarea sursei de carbon

Capacitatea tulpinii SERIUS de a asimila/fermenta diferiți compuși sursă de carbon a fost evaluată prin creșterea tulpinii menționate mai sus în medii care conțin extract de drojdie (10 g/l), peptonă (20 g/l) și zahăr/acid organic la o concentrație de 20 g/l.

Analiza a arătat că tulpina SERIUS este capabilă să utilizeze astfel de compuși organici precum galactoză, rafinoză, maltoză și acidul gluconic.

2.10 Producerea de compuși volatili și profilul aromatic

Producerea de acetaldehidă, acetat de metil, acetat de etil și alcooli superiori a fost evaluată la finalizarea fermentației în probe de must Trebbiano inoculate și fermentate folosind tulpina SERIUS și în

probe din același must inoculate și fermentate cu o tulpină comercială de *Saccharomyces cerevisiae*. Determinarea compușilor volatili a fost efectuată prin cromatografie în gaz, injectând mostre de vin distilat corespunzător direct într-o coloană polară ZB-WAX Plus (fază staționară de polietilen glicol, FID - Flame Ionization Detector).

5 Rezultatele obținute, exprimate în mg/l, sunt raportate în Tabelul 9.

Tabelul 9

Metabolit (mg/l)	SERIUS	COM 1
Acetaldehidă	52	42
Acetat de metil	<2	<2
Acetat de etil	41	25
Metanol	0,05	0,04
2-Butanol	<2	<2
N-propanol	55	23
Izobutanol	43	40
Acetat de izoamil	<2	<2
N-butanol	<2	<2
Izoamili	69	120

10 Tulpina SERIUS produce cantități ceva mai mari de acetaldehidă față de cele produse de drojdia comercială folosită pentru comparație, însă concentrații care nu sunt compromițătoare pentru calitatea vinurilor. Într-adevăr, se știe că o concentrație scăzută a compusului menționat în vin dă o aromă plăcută de fructe, în timp ce la concentrații crescute, vinul are tendința de a elibera un miros înțepător și iritant, astfel încât să devină nevandabil atunci când concentrația de acetaldehidă depășește 500 mg/l.

15 În ceea ce privește alcoolii superiori, tulpina SERIUS produce N-propanol în cantități mai mari comparativ cu tulpina comercială de referință, în timp ce produce cantități similare de izobutanol; totuși, acești alcooli nu joacă un rol olfactiv semnificativ în vin.

Pe de altă parte, în comparație cu tulpina *S. cerevisiae* comercială, tulpina SERIUS produce o cantitate mai mică de alcool izoamilic; alcoolul din urmă mai mult joacă un rol important, deoarece are ca rezultat așa-numitul miros "amilic", care este considerat foarte negativ din punct de vedere olfactiv.

20 Profilul aromatic al tulpinii SERIUS a fost evaluat prin tehnica extracției în fază solidă (SPE) utilizată pe mustul de struguri Trebbiano, obținut în urma incubării cu tulpina menționată mai sus la 25°C pentru o perioadă de timp suficientă pentru a ajunge la finalizarea fermentației. În plus, în mod analog, două tulpini *S. cerevisiae* comerciale au fost testate cu titlu de comparație.

25 Ca mod de operare, 10 ml din fiecare probă de tulpină (SERIUS și cele două tulpini comerciale) au fost diluate cu 30 ml de apă și adăugate cu standardul intern (1-heptanol) și absorbite pe coloana SPE C18. Eluarea a fost efectuată folosind diclormetan, iar eluatul redus la un volum mic a fost injectat în sistemul Shimadzu GC2010/QP2010 GC/MS. Identificarea compușilor rezultați a fost efectuată prin cercetarea celor mai recente versiuni ale bibliotecilor Wiley și NBS disponibile la momentul pregătirii prezentei cereri.

30 Din prezenta analiză, se demonstrează că tulpina conform invenției permite obținerea unui vin cu concentrații de acizi grași (acid izovaleric, acid hexanoic, acid octanoic, acid butanoic, acid decanoic) care sunt în medie de 2-3 ori mai mici decât cele detectate în vinurile obținute cu cele două tulpini comerciale. Se știe că anumiți acizi grași cu catenă medie și lungă (C6, C8, C10, C12) pot avea efecte inhibitoare în ceea ce privește activitatea fermentativă a drojdiilor. În special, chiar și la concentrații scăzute (câteva miligrame/litru), acidul decanoic (C10) prezintă o activitate antagonistă semnificativă în ceea ce privește procesele de fermentație.

35 O caracteristică suplimentară care diferențiază tulpina SERIUS de cele două tulpini comerciale utilizate cu titlu de comparație este producția semnificativ mai mare (în medie de 30 de ori mai mare) de ester de fenil etil ai acidului octanoic, compuși volatili care dau aroma tipică de cacao verde. În fine, vinul obținut cu drojdia SERIUS prezintă concentrații reduse de pirazină și piperazină, molecule responsabile de aromele de ierburi și plante.

Exemplul 3 - Caracterizarea oenologică a drojdiei, teste de vinificație

45 Tulpina conform invenției a fost testată prin intermediul testelor de vinificație în crămă pe musturi de struguri roșii și de struguri albi.

Procesul de producție utilizat a fost de tip alimentare în șarje, urmat de concentrarea culturii prin centrifugare. Apoi, o biomasă de drojdie a fost preparată sub formă de cremă cu un conținut de substanță uscată în esență egală cu 22% și o concentrație de drojdie de aproximativ 10 miliarde UFC/g.

Pentru inocularea ulterioară a mustului, biomasa a fost resuspendată într-o suspensie vinoasă formată din drojdie, must și activatori.

În special, pentru utilizare într-un rezervor de 5000 de litri, 1 kg de biomasă sub formă de cremă a drojdiei SERIUS a fost suspendat la o temperatură de 25°C în 200 de litri de must, completată cu activatori la concentrațiile de lucru recomandate de producător și cunoscute comercial. Suspensia a fost ținută în mișcare folosind un agitator sau o pompă de priticire timp de 2/4 ore. Ulterior, respectiva suspensie a fost adăugată la must prin intermediul priticirii.

3.1 Testul folosind must de struguri Traminer cu acidificarea mustului

Drojdia conform invenției a fost testată cu must de struguri Traminer (boabe albe) într-o cramă într-un rezervor de 50 hl.

Drojdia, preparată sub formă de cremă proaspătă, a fost folosită în doză de 20 g/hl. Adăugarea la must a 100 g/hl de drojdie autolizată și 140 g/hl de acid tartric a fost urmată de inocularea cu tulpina SERIUS, preparată anterior după metoda descrisă în secțiunea generală. Fermentația a fost efectuată la 13°C pentru o perioadă de 19 zile.

Tabelul 10 prezintă datele analitice privind mustul înainte de inocularea drojdiei și vinul la finalizarea fermentației. Se poate observa că tulpina produce în mod avantajos cantități mari de acid malic și glicerol și, în același timp, prezintă o producție scăzută de aciditate volatilă.

În ceea ce privește profilul aromatic, la finalizarea fermentației, se remarcă o complexitate florală mai mare, sinergică cu profilul terpenic, în comparație cu drojdia comercială.

Tabelul 10

	Must	Vin
Aciditate totală g/l	4,80	6,57
pH	3,47	3,46
Acid malic g/l	1,09	1,92
Acid citric g/l	0,12	0,2
Acid lactic g/l	0,10	0,22
Glucoză g/l	88,1	0,4
Fructoză g/l	106,9	6,5
Acid succinic g/l	0,07	0,99
Glicerol g/l	3,47	11,45
Acid acetic g/l	0,21	0,09
Etanol %	2,82	14,11

3.2 Testul folosind mustul de struguri Traminer fără acidificarea mustului

Drojdia SERIUS a fost testată cu must de struguri Traminer (boabe albe) într-o cramă într-un rezervor de 100 hl. Drojdia a fost preparată sub formă proaspătă (cremă) și folosită în doză de 20 g/hl. Prepararea inoculului a fost efectuată așa cum s-a descris anterior. Înainte de inoculare, la must s-au adăugat 90 g/hl de drojdie autolizată. Mustul nu a fost acidulat cu acid tartric. Fermentația a fost efectuată la 17°C pentru o perioadă de 7 zile.

Tabelul 11 prezintă datele analitice privind mustul înainte de inocularea drojdiei și vinul la finalizarea fermentației.

Rezultatele obținute evidențiază capacitatea tulpinii SERIUS de a produce cantități mari de glicerol și aciditate volatila scăzută. În ceea ce privește exemplul anterior din mustul Traminer, în care a fost observată producerea de acid malic, în acest caz, producerea de acid malic nu este observată. Trebuie remarcat faptul că mustul din exemplul 3.1 a fost acidulat cu acid tartric, în timp ce mustul din acest exemplu nu a fost supus suplimentării cu acid tartric. Prin urmare, producerea de acid malic de către tulpina SERIUS pare a fi corelată cu acidificarea cu acid tartric a mustului.

Analiza olfactivă confirmă rezultatele evidențiate în exemplul descris la punctul 3.1.

Tabelul 11

	Must	Vin
Aciditate totală g/l	6,70	6,29
pH	3,26	3,30
Acid malic g/l	1,24	1,10
Acid citric g/l	0,16	0,27
Acid lactic g/l		0,23
Glucoză g/l	81,5	0,3
Fructoza g/l	100,3	5,7
Acid succinic g/l		0,55
Glicerol g/l	3,54	10,15
Acid acetic g/l	0,08	0,15
Etanol %	2,72	13,10

3.3 Testul folosind must de struguri Garganega cu acidificarea mustului

Tulpina SERIUS a fost testată cu must de struguri Garganega (boabe albe) într-o cramă într-un rezervor de 150 hl. Drojdia a fost preparată sub formă proaspătă (cremă) și folosită în doză de 20 g/hl. Prepararea inoculului a fost efectuată așa cum este descris mai sus. Înainte de inoculare, la must s-au adăugat 120 g/hl de drojdie autolizată și 120 g/hl de acid tartric. Fermentația s-a desfășurat la 16°C pentru o durată de 15 zile.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 12. Se evidențiază capacitatea tulpinii SERIUS de a produce acid malic, cantități mari de glicerol și aciditate volatilă scăzută.

În ceea ce privește profilul aromatic, se raportează note florale marcate cu o notă de glicină.

Tabelul 12

	Must	Vin
Aciditate totală g/l	4,72	8,85
pH	3,53	3,27
Acid malic g/l	0,97	2,70
Acid citric g/l	0,16	0,23
Acid lactic g/l	0,01	0,24
Glucoză g/l	80,6	0,3
Fructoză g/l	90,4	9,2
Acid succinic g/l	0,02	1,36
Glicerol g/l	1,55	10,34
Acid acetic g/l	0,02	0,16
Etanol %	1,21	11,23

3.4 Testul folosind must de struguri Garganega fără acidificarea mustului

Tulpina SERIUS a fost testată cu must de struguri Garganega (boabe albe) într-o cramă într-un rezervor de 100 hl. Drojdia a fost preparată sub formă proaspătă (cremă) și folosită în doză de 20 g/hl. Prepararea inoculului a fost efectuată așa cum este descris mai sus. Înainte de inoculare, la must s-au adăugat 120 g/hl de drojdie autolizată. Mustul a fost acidulat cu acid tartric. Fermentația s-a desfășurat la 16°C pentru o perioadă de 12 zile.

Tabelul 13 prezintă rezultatele obținute cu mustul înainte de inoculare și cu vinul la finalizarea fermentației.

Se poate observa cum tulpina are capacitatea de a produce cantități mari de glicerol cu producție scăzută de aciditate volatilă. Din nou, în acest caz, în absența acidificării mustului cu acid tartric, nu se raportează producere de acid malic.

Profilul aromatic confirmă ceea ce s-a observat în exemplul 3.3, și anume prezența unor note florale marcate cu un strop de glicină.

Tabelul 13

	Must	Vin
Aciditate totală g/l	6,36	6,44
pH	3,47	3,59
Acid malic g/l	2,86	2,64
Acid citric g/l	0,40	0,46
Acid lactic g/l	0,02	0,13
Glucoză g/l	96,9	0,3
Fructoză g/l	105,8	3,7
Acid succinic g/l	0,08	0,56
Glicerol g/l	1,68	9,74
Acid acetic g/l	0,07	0,25
Etanol %	1,35	13,60

3.5 Testul în must de struguri Syrah, Petit Verdot, Cabernet cu acidificarea mustului

Tulpina SERIUS a fost testată cu must de struguri Syrah, Petit Verdot, Cabernet (boabe roșii) într-o cramă într-un rezervor de 100 hl. Drojdia a fost preparată sub formă proaspătă (cremă) și folosită în doză de 20 g/hl. Prepararea inoculului a fost efectuată așa cum este descris mai sus. Înainte de inoculare, la must s-au adăugat 150 g/hl de drojdie autolizată și 100 g/hl de acid tartric. Fermentația a fost efectuată la 20°C pentru o perioadă de 10 zile.

Tabelul 14 prezintă rezultatele obținute cu mustul înainte de inoculare și cu vinul la finalizarea fermentației. Din nou, în acest caz, se observă capacitatea tulpinii SERIUS de a produce acid malic și cantități mari de glicerol.

În ceea ce privește profilul aromatic, vinul produs cu tulpina SERIUS are note distincte de afine, zmeură și căpșuni sălbatice.

Tabelul 14

	Must	Vin
Aciditate totală g/l	4,85	7,48
pH	3,78	3,74
Acid malic g/l	1,37	3,70
Acid citric g/l	0,58	0,63
Acid lactic g/l	0,4	0,44
Glucoză g/l	125,7	1,6
Fructoză g/l	138,3	16
Acid succinic g/l	0,04	0,80
Glicerol g/l	2,2	12,46
Acid acetic g/l	0,19	0,15
Etanol %	1,4	16,62

Exemplul 4 - Hibridi obținuți din drojdia *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS

Tulpina *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS poate fi utilizată ca tulpină parentală pentru a obține hibridi de drojdie cu caracteristici oenologice suplimentare și îmbunătățite. S-a ales tehnica de hibridizare directă și s-a urmat un protocol standard de conjugare spor-spor cu mici modificări pentru a obține hibridi (Solieri și colab., 2008). Inițial, a fost efectuat un studiu de sporulare pe tulpinile selectate pentru hibridizare. Au fost testate mai multe medii de cultură în acest scop. Studiul viabilității sporilor și eficienței sporulării a permis selecția mediului SP (1% acetat de potasiu; 0,1% extract de drojdie; 0,05%

glucoză; 1,8% agar). Creșterea tulpinii pe SP la 25°C timp de 7-10 zile a fost urmată de digestia parțială a peretelui celular pentru a permite separarea ulterioară a sporilor din asce folosind un ac micromanipulator. Ascele, cu peretele celular semi-digerat, au fost plasate pe o parte a unei plăci YPD (2% glucoză; 2% peptonă; 1% extract de drojdie; 2% agar) și apoi supuse micromanipulării. Sporii celor două tulpini parentale au fost plasați aleatoriu unul lângă altul. Observarea continuă a permis identificarea conjugării reușite. După incubare la 25°C timp de 2-3 zile, coloniile selectate au fost reînsămânțate pe mediu YPD. Următoarea etapă a fost stabilizarea tulpinilor (realizată, de asemenea, pe mediu WL). Hibrizii au fost apoi confirmați prin intermediul analizei moleculare și apoi au fost supuși testării de fermentație în must împreună cu analize fenotipice pentru a le verifica caracteristicile fiziologice și potențialul oenologic.

EXEMPLUL 5 - Producerea de autolizate de drojdie pornind de la tulpina *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS

Tulpina *S. bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS poate fi utilizată pentru a produce un drojdie autolizată care să fie utilizat ca activator de fermentație în producția de vin și alte băuturi alcoolice. În acest scop, crema de drojdie, preparată conform descrierii de mai sus, este supusă unui tratament termic adecvat (40-60°C timp de 12-48 ore). Autolizatul obținut poate fi utilizat ca atare sau prelucrat suplimentar prin filtrare/centrifugare/decantare corespunzătoare cu scopul de a separa fazele solide sau lichide pentru aplicații adecvate ulterioare.

Prin urmare, pe baza celor de mai sus, prezenta invenție a atins toate obiectivele prestabilite.

În special, este realizat scopul de a furniza o tulpină de drojdie din specia *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum*, dotată cu caracteristicile tehnologice și oenologice care permit o bună fermentație a mustului, permițând producerea unui vin plăcut.

Un alt scop atins este acela de a furniza o tulpină care să permită obținerea unui vin caracterizat prin cantități mari de acid malic și glicerol, și în același timp să nu producă hidrogen sulfurat în timpul fermentației alcoolice.

Un alt scop atins de prezenta invenție se referă la posibilitatea utilizării tulpinii SERIUS ca tulpină parentală pentru a obține drojdii hibride cu potențial oenologic nou.

Un alt scop atins se referă la posibilitatea utilizării tulpinii care face obiectul invenției pentru a obține o drojdie autolizată care să fie utilizat ca activator al fermentației.

Bibliografie

1. Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. (2000): Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, 30:5-9;
2. Cai J., Roberts I.N. și Collins M.D. (1996): Phylogenetic relationships among members of the ascomycetous yeast genera *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, and *Kluyveromyces* deduced by small-subunit rRNA gene sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 542-549;
3. Castellari L., Ferruzzi M., Magrini A., Giudici P., Passarelli P., Zambonelli C. (1994): Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. noncryotolerant *Saccharomyces* strains Vitis, 33, 49-52;
4. Delfini C. (1995): Scienza e tecnica di microbiologia enologica. Edizioni Il Lievito, Asti;
5. Esteve-Zarzoso B, și colab. (1999): Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1: 329-37;
6. Fleet G.H (2008): Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res 8; 979-995;
7. James S.A., Collins M.D. și Roberts I.N. (1996): Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46: 189-194;
8. Legras J. L., Ruh O., Merdinoglu D., Karst F. (2005): "Selection of hypervariable micro satellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains", International Journal of Food Microbiology 102: 73-83;
9. Masneuf-Pomarede I., Salin F., Borlin M., Coton E., Coton M., Jeune C.L., Legras J.L. (2016): Microsatellite analysis of *Saccharomyces uvarum* diversity. FEMS Yeast Res. 16(2): fow002;
10. Suzzi G, Tofalo R. (2014): Microbiologia Enologica Edagricole;
11. Pretorius IS (2000): Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking Yeast 16: 675-679;
12. Ribereau-Gayon P., Dubordieu D., Doneche B., Lonvaud A. (2000): Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinification, John Wiley & Sons Ltd;

13. Solieri L, Antunez O, Perez-Ortin JE, Barrio E, Giudici P. (2008): Mitochondrial inheritance and fermentative oxidative balance in hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* Yeast. 25 (7) :485-500;
14. Vaughan-Martini A. & Martini A. (2011): Chapter 61 - *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870). In: The Yeasts (Ediția a cincea). London: Elsevier;
- 5 15. Vincenzini M., Romano P. e Farris G.A. (2005): Microbiologia del vino. Edizioni Ambrosiana;
16. White T.J., Bruns T., Lee S. și Taylor J. (1990): PCR protocols. A guide to methods and applications. In Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds) Academic Press, San Diego;
- 10 17. Zambonelli C, Soli MG & Guerra D (1984): A study of H₂S nonproducing strains of wine yeasts. Ann Microbiol 34: 7-15;
18. Zambonelli C., Tini V. și Castellari L. (2000). Guida all'uso dei lieviti selezionati in enologia (a cura del Centro Ricerche Produzioni Vegetali) Ed. agricole;
19. Zambonelli C. (2003): Microbiologia e Biotecnologia dei Vini. Edizioni Agricole;
- 15 20. Zilio F., Lombardi A., Galeotto A., Comi G. (1998): Profili di restrizione del DNA mitocondriale di ceppi di *Saccharomyces* isolati nella zona di produzione del vino Soave DOC. Riv. Vitic. Enolog. 3:33-41.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- VERSPOHL ALEXANDRA ET AL: "Exploration of genetic and phenotypic diversity within *Saccharomyces uvarum* for driving strain improvement in winemaking", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, DE, vol. 101, no. 6, 8 December 2016 (2016-12-08), pages 2507-2521, XP036164221, ISSN: 0175-7598, DOI: 10.1007/S00253-016-8008-4 [retrieved on 2016-12-08] -& ALEXANDRA VERSPOHL ET AL: "Findings from University of Modena and Reggio Emilia in the Area of Applied microbiology and biotechnology Described (Exploration of genetic and phenotypic diversity within *Saccharomyces uvarum* for driving strain improvement in winemaking)", BIOTECH WEEK, 26 April 2017 (2017-04-26), XP055443997, ISSN: 1535-2757
- EP-A1- 2 277 990
- MARIANA TRISTEZZA ET AL: "Autochthonous fermentation starters for the industrial production of Negroamaro wines", JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY ; OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 39, no. 1, 21 June 2011 (2011-06-21), pages 81-92, XP019996857, ISSN: 1476-5535, DOI: 10.1007/S10295-011-1002-Z
- EP-A1- 2 634 247
- EP-A2- 1 978 083
- ETJEN BIZAJ ET AL: "A breeding strategy to harness flavor diversity of *Saccharomyces* interspecific hybrids and minimize hydrogen sulfide production", FEMS YEAST RESEARCH, vol. 12, no. 4, 1 June 2012 (2012-06-01), pages 456-465, XP055443493, GB, NL ISSN: 1567-1356, DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00797.x

(57) Revendicări:

1. Tulpină de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS și depusă la DBVPG cu numărul de depozit 36P.

2. Tulpină conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** aceasta este sub formă de cremă, formă deshidratată, formă liofilizată sau sub formă de pastă.

3. Utilizarea tulpinii de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS (DBVPG 36P) conform oricăreia dintre revendicările precedente, ca un inocul alimentar în producția de alimente obținute prin fermentație alcoolică.

4. Utilizare a tulpinii conform revendicării 3, **caracterizată prin aceea că** alimentul este un vin și fermentația alcoolică este un proces de vinificație.

5. Utilizare a tulpinii conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** vinul este un vin produs din struguri selectați dintre struguri albi sau struguri roșii.

6. Utilizare a tulpinii conform oricăreia dintre revendicările 4 sau 5, **caracterizată prin aceea că** vinul conține glicerol și acid malic produse în mod natural de tulpină în următoarele concentrații: glicerol mai mult de aproximativ 8,5 g/l, de preferat mai mult de aproximativ 9,5 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 10 g/l; acid malic mai mult de aproximativ 0,5 g/l, de preferat mai mult de aproximativ 1 g/l, mai preferabil mai mult de aproximativ 2 g/l.

7. Utilizare a tulpinii de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS (DBVPG 36P) conform oricăreia dintre revendicările 1 sau 2, ca probiotic în suplimente alimentare și alimente.

8. Inocul alimentar cuprinzând tulpina de *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* identificată ca SERIUS și depusă la DBVPG cu numărul de depozit 36P.

9. Inocul alimentar conform revendicării 8, **caracterizat prin aceea că** inoculul alimentar menționat este un starter de vin.

10. Cultură de drojdie *Saccharomyces bayanus* subsp. *uvarum* SERIUS care poate fi obținută prin multiplicarea tulpinii conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** aceasta este adecvată pentru a fi utilizată pentru o utilizare conform oricăreia dintre revendicările 3 până la 7, cultura menționată fiind selectată dintre o cultură proaspătă sub formă lichidă, sub formă de cremă sau de pastă sau o cultură uscată sub formă deshidratată sau liofilizată.

11. Tulpină conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** aceasta este sub forma unui autolizat.

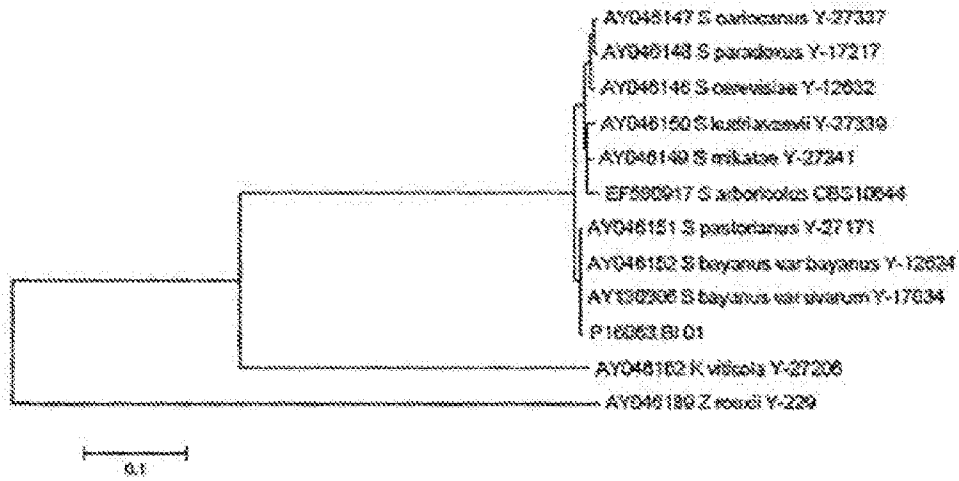


Fig. 1

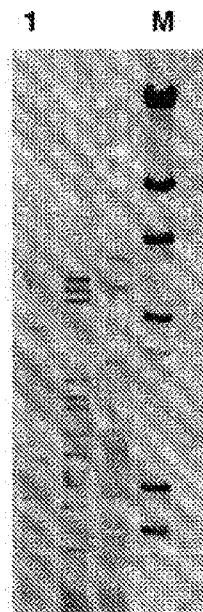


Fig. 2

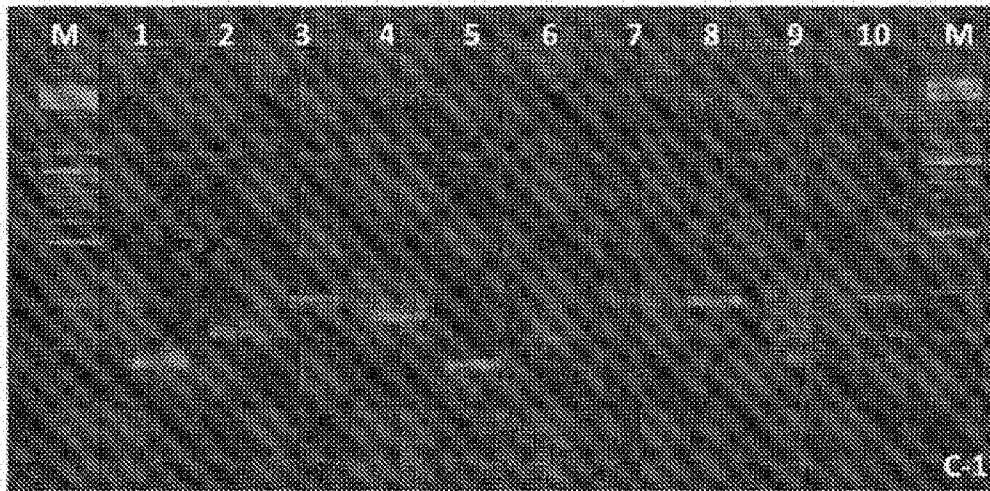


Fig. 3

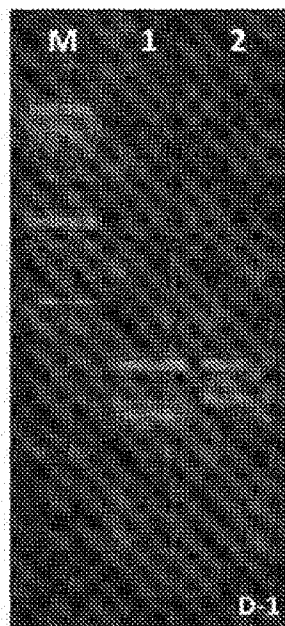


Fig. 4