

INFLUENȚA FACTORILOR BIOCHIMICI ASUPRA PROCESULUI DE MACERARE-FERMENTARE LA PRODUCEREA VINURILOR ROȘII

A. Cravcesco, drd.

Universitatea Tehnică a Moldovei

INTRODUCERE

Vinurile roșii au o compoziție mult mai complexă decât vinurile albe. Pe lângă alcoolii, acizi organici, compuși azotați săruri minerale, mai conțin cantități importante de molecule fenolice necoloidale (antociani, proantocianidine, flavonoizi, acizi fenolici) sau aflate la limita coloizilor (taninurile condensate, complecși antocianitaninuri, taninuri proteine și taninuri-polizaharide). Acest ansamblu de compuși fenolici provine din părțile solide ale strugurilor negri și sunt extrași prin procesul de macerare-fermentare pe boștină.

Prezența compușilor polifenolici în vinurile roșii, conferă acestora însușiri organolptice și de calitate deosebite: culoare roșie-rubinie, catifelare, astringență păstrare. Acțiunea polifenolilor din vin s-a dovedit a fi benefică pentru organismul uman, de aceea preferințele consumatorilor pentru vinurile roșii au crescut în ultima vreme, în toate țările. Asistăm la o cerință tot mai mare de vinuri roșii pe piața internă și la export [6].

În tehnologia producerii vinurilor roșii, extracția compușilor fenolici, iar dintre aceștia în mod deosebit compușii fenolici colorați are loc prin procedeul specific numit fermentarea macerarea pe boștină. Extracția acestora din urmă are loc după următorul mecanism: în prima etapă, sub influența acidității, temperaturii, SO₂ și eventual a alcoolului format, are loc mortificarea celulei boabei. Această mortificare este însoțită de o deteriorare a membranei cromoplastidelor existente, vacuolelor celulelor din pielețe, cromoplastide în care sânt localizate substanțele colorante. În cea de a doua etapă, are loc difuzia între cele două faze, adică din celule, respectiv din cromoplastide, în lichidul din imediata apropiere și apoi în întreaga masă a mustului [12]. Difuzia, care este însoțită totdeauna de un transport de substanțe colorante, este asigurată de mișcările interne ce iau naștere în mod spontan în masa de mustuală datorită diferențelor de temperatură și degajării de CO₂. Difuzia poate fi însă mult accelerată prin măsuri care permit îndepărtarea straturilor de lichid din imediata apropiere a fazei solide și înlocuirea lor cu altele. În practica vinicolă această reînnoire a straturilor de lichid, necesară pentru o extracție rapidă și

completă a substanțelor colorante, se realizează în funcție de procedeul de macerație fie prin amestecarea boștinei cu mustul, fie prin recircularea mustului prin boștină. Ca urmare a proceselor de dizolvare și de difuzie a antocianelor din celulele pielețelor, intensitatea lichidului crește progresiv pînă atinge un maximum [2].

După dizolvare și difuzie, intervine un proces de absorbție datorită căruia parte din substanțe colorante sunt fixate de componentele solide ale mustului. În afară de pielețele, care le-au cedat, substanțele colorante mai sunt adsorbite de ciorchine, semințe și levuri. Datorită acestui fapt, culoarea vinului scade, iar scăderea este cu atît mai vizibilă cu cît durata de macerare se prelungește peste o anumită limită [1].

Fixarea substanțelor colorante de către levuri este ușor de constatat la fermentația unui must separat de boștină a cărei culoare roșii a fost extrasă în prelabil din pielețe prin încălzirea mustuielei. În acest caz diminuarea culorii devine evidentă în faza fermentării tumultoase, cînd levurile se găsesc într-un număr foarte mare [15].

În fine, tot în timpul macerației, datorită modificării pH-lui dar mai ales a potențialului Redox apar și unele modificări în starea fizico-chimică a substanțelor colorante, care, de asemenea, determină o diminuare a culorii.

Astfel, la scăderea potențialului Redox, așa cum se întîmplă în timpul fermentației, parte din antociani se transformă în forme incolore. După fermentare cînd datorită aerărilor, ocazionate de pritocuri, potențialul redox crește, unii compuși incolori revin la forma colorată, alții din contra suferind modificări ireversibile rămîn incolori, încît intensitatea colorantă a vinului nu mai revine la valoarea maximă atinsă anterior [18].

În timpul macerației, pe lângă substanțele colorante, boștina mai cedează vinului și alte substanțe cum sânt cele tanante, arome, azotate, pectice, minerale etc.

Prezența acestora în anumite proporții face ca vinurile roșii să se diferențieze de cele albe nu numai sub aspectul culorii ci și din punct de vedere al astringenței, aromei, extractului etc.

Cînd însă concentrația lor depășește anumite limite ele pot fi însoțite și de alte substanțe care

imprimă vinurilor un gust neplăcut erbaceu, amar de verdeață. Din aceste considerente, procesul de macerație trebuie astfel condus încât în vin să treacă, de preferință, substanțele care contribuie la realizarea unor calități gusto-olfactive cât mai plăcute și în concordanță cu tipul de vin.

O extracție suficient de selectivă pentru nevoile practicii este totuși oricând posibilă deoarece substanțele din prima categorie, prin natura lor sînt cedate în timpul macerării mai ușor și mai repede decît cele a căror prezență în vin este mai puțin dorită. Pentru realizarea unei extracții selective mai trebuie ținut seama și de bogăția părților solide ale strugurelui în substanțe utile în raport cu cele mai puțin utile [13].

Soiurile valoroase, cultivate în podgorii consacrate, sînt în general bogate în substanțe cu gust bun și mai sărace în componente ce prejudiciază calitatea, comparativ cu soiurile care asigură strugurilor materie primă pentru vinuri de consum curent.

Pentru primele, o macerație de lungă durată este necesară, întrucît numai așa vinurile rezultate reflectă fidel particularitățile soiului și podgoriei din care provin, particularități ce le îndreptătesc la denumire de origine.

La producerea viurilor de consum curent o macerare de lungă durată nu numai că n-ar ameliora caracterile gusto-olfactive, ci, din contra, ar contribui la apariția de gusturi și mirosuri mai puțin plăcute. De asemenea, trebuie reținut și faptul că pentru același soi, conținutul în substanțe utile este mai mare în strugurii bine copti și sănătoși decît în cei care n-au ajuns la maturitate sau sunt avariați, putrezi etc. [10]. Alegerea unei durate optime de macerare prezintă și în acest caz o importanță deosebită pentru obținerea unei extracții selective.

La majoritatea procedurilor de obținere a vinurilor roșii și îndeosebi la cele tradiționale, extracția compușilor fenolici se obține prin macerația părților solide în faza lichidă în timpul fermentației alcoolice. Practic aceasta înseamnă că macerția boștinei se desfășoară în același timp cu fermentația mustului în care se găsește. Datorită acestui fapt ambele procese sunt cuprinse într-o singură operațiune tehnologică cunoscută sub numele de macerare fermentare sau cum se spune obișnuit în limbajul oenologic fermentare pe boștină. Operațiunea este specifică tehnologiei de obținere a vinurilor roșii și constă în fermentarea mustului în contact cu părțile solide ale strugurilor sau numai cu o parte din aceasta.

Cele două procese, macerarea și fermentarea, având loc simultan, înseamnă că ele se influențează reciproc, iar desfășurarea lor are loc în același condiții. Așa, de exemplu, din cauza creșterii temperaturii și formării alcoolului, ca urmare a

fermentației, procesul de macerație este mai rapid și mai complet decît dacă boștina ar sta în contact cu un must care nu fermentează. Vinurile fermentate pe boștină au un grad alcoolic mai mic. În prezența boștinei fermentația alcoolică se desfășoară mai activ, datorită pielitelor care dispun de un număr foarte mare de levuri ce determină o descompunere mai rapidă a zahărului. Ori, o fermentare mai rapidă face ca pierdirile de alcool prin volatilizare să fie mai mari. La aceasta se adaugă și faptul că suprafața de contact între lichidul în fermentare și aer este mai mare. Cât privește procesul de fermentație acesta se desfășoară la fel ca și în tehnologia preparării vinurilor albe. La supravegherea și dirijarea lui trebuie însă să se țină seama de câteva particularități. Astfel, datorită macerării, relația între densitatea mustului și concentrația lui de zahăr este ceva mai eronată decît la vinificația în alb [17].

1. ENZIMELE

Enzimele sunt componenți naturali ai organismelor vii. Celulele strugurilor conțin, în mod natural, o anumită cantitate de enzime, dar într-o cantitate insuficientă pentru a juca un rol vizibil în timpul vinificației. Din acest motiv este necesară „întărirea” efectului acestora prin adăugarea unor cantități suplimentare de enzime.

Enzimele enologice au rolul de a ameliora câteva faze ale vinificației:

- obținerea unei cantități mai mari de must ravac
- limpezirea mai rapidă și mai bună a mustului
- extracția culorii;
- extracția aromelor și îmbunătățirea expresivității aromatice a soiurilor;
- ameliorarea filtrabilității vinurilor.

Toate aceste operații sunt îngreunate de prezența pectinelor ce sunt extrase din struguri în momentul obținerii mustului. Pectinele sunt constituenți importanți ai pereților celulari și sunt eliberate în must în timpul zdrobirii, scurgerii, presării. Moleculele de mari dimensiuni ale substanțelor pectice împiedică clarifierea eficientă a mustului, precum și tratamentele de limpezire a vinului și filtrabilitatea acestuia [11].

Enzimele utilizate în timpul scurgerii-presării ajută la degradarea pereților celulari și astfel favorizează eliberarea mustului ravac. În același timp se realizează și o extracție rapidă a substanțelor colorante și a taninurilor în cazul vinurilor roșii și o ameliorare a extracției de arome în cazul strugurilor aromați.

Enzimele adăugate în must, prin micșorarea viscozității acestuia și diminuarea efectului de

coloid protector al pectinelor ajută la decantarea rapidă a impurităților din must și la îmbunătățirea filtrabilității acestuia.

Enzimele adăugate în mustuiala de struguri roșii, prin degradarea compușilor pectici și celulozici din pereții celulari, îmbunătățesc extracția substanțelor colorante.

Enzimele adăugate în mustuiala de struguri albi aromați, prin degradarea compușilor pectici și celulozici din pereții celulari, îmbunătățesc extracția substanțelor de aromă. Deasemenea, există enzime care se folosesc fie pentru eliberarea substanțelor aromate din precursorii de aromă, fie pentru ameliorarea filtrabilității vinurilor obținute din struguri supramaturați sau mucegăiți.

2. LEVURILE SELECȚIONATE

În comparație cu alte biotehnologii fermentative, în vinificație materia primă nu se pasteurizează înainte de a fi introdusă în fluxul tehnologic și conține o microfloră de levuri și bacterii, de o valoare tehnologică incertă. De aceea, folosirea levurilor selecționate se impune ca o condiție esențială pentru obținerea vinurilor de calitate.

Selecția unei sușe (tulpini) de levuri valoroase este o muncă îndelungată, 4-5 ani. Variabilitatea genetică a levurilor din microbiota epifită a strugurilor, reprezintă principala sursă de selecția a levurilor. Criteriile de selecție sunt următoarele:

- comportamentul levurii în timpul fermentației (viteza de fermentare, rezistența la factorul Killer, gradul de spumare, cantitatea de depozit formată);
- randamentul în alcool și puterea alcooligenă, cantitatea de zaharuri rămase nefermentate;
- capacitatea de formare a glicerolului și alcoolilor superiori;
- aciditatea volatilă care se formează (compuși volatili);
- rezistența la temperaturile ridicate și temperaturile scăzute.

Levurile deși sunt organisme simple monocelulare, dispun de un echipament enzimatic foarte complex și anume: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze sau sintetaze. Dintre enzimele care activează în procesul de fermentație alcoolică, menționăm: hexokinaza, aldolaza, deshidenrogenaza, fosfohexoizomeraza, fosfohexokinaza, trioizomeraza, piruvatkinaza, piruvatdecarboxilaza, aldodeshidrogenaza etc. Mai mult de 12 enzime diferite provenite de la levuri, sunt implicate în fermentația alcoolică.

Ținând cont de calitățile deosebite care le posedă levurile selecționate folosite în vinificație și

compoziția lor biochimică complexă, putem afirma contribuția lor directă și indirectă în ceea ce privește procesele de extracție la producerea vinurilor roșii:

- conțin o serie de enzime din clasa hidrolazelor care au capacitatea de a distruge peretele celular al celulei vegetale favorizând prin aceasta extracția compușilor valoroși;
- având putere alcooligenă sporită, produc cantități importante de alcool, care în consecință contribuie la mortificarea celulei boabe. Această mortificare este însoțită de o deteriorare a membranei cromoplastidelor în care sunt localizate substanțele colorante. În cea de-a doua etapă, are loc difuzia între cele două faze, adică din celule, respectiv din cromoplastide, în lichidul din imediata apropiere și apoi în întreaga masă a mustului; fiind termotolerante, levurile selecționate permit fermentarea mustuiei la temperaturi cuprinse între 28-30 °C. La acest nivel, extracția compușilor fenolici decurge mai bine decât la 20 °C [12].

3. LEVURILE IMOBILIZATE

În acest caz, drojdiile sunt încapsulate într-o matrice a cărei porozitate permite schimburile nutritive între drojdi și mediul de fermentație.

Drojdiile incluse se prezintă sub forma unor bile cu un diametru de câțiva milimetri și au densitatea mai mare decât a vinului. Remuajul se realizează în câteva secunde, poziționând sticla cu gâtul în jos, ceea ce ne permite să colectăm aceste drojdi incluse în bile de alginat la nivelul gâtului sticlei. Nu rămâne decât să degorjăm butelia după sistemul ales [4]. Astfel simplificată, operația de remuaj va permite rezolvarea principalelor probleme legate de această operație, care nu are decât un rol mecanic și nu influențează calitățile spumantelor obținute.

Unei soluții de alginat de sodiu 4%, sterilizată, i se adaugă o suspensie de celule de drojdi selecționate, amestecul fiind omogenizat. Picăturile de gel sunt produse prin picurarea suspensiei de celule-polimer printr-un capilar într-o soluție de clorură de calciu. Astfel, gelul este polimerizat sub forma unei sfere de câțiva milimetri diametru, numită în mod generic „bilă”.

Eliberarea ionilor de calciu Ca_2^+ este inițiată de adăugarea unui acid organic cum este acidul acetic pentru obținerea unui pH de 6,5. Bilele obținute trebuie spălate pentru eliminarea ultimelor urme de clorură de calciu [5].

Drojdiile se regăsesc incluse în gel. Principalii parametri ce pot influența comportarea drojdiilor incluse și, în consecință, calitatea vinului spumant obținut, sunt: tipul alginatului, concentrația

alginatului, drojdiile starter folosite, concentrația drojdiilor, calitatea operației de clătire a bilelor, modul de conservare al bilelor, reactivarea drojdiilor incluse înainte de folosire.

Trebuie îndeplinite următoarele criterii:

- absența fenomenului de reeliberare, deoarece diferitele celule de drojdie pot scăpa din bile;
- determinând o creștere a turbidității;
- absența bilelor flotante. Bilele au o densitate mai mare decât vinul. Nu trebuie să existe bile plutitoare care nu se depun la nivelul gâtului sticlei înainte de degorjare;
- calitatea organoleptică și compoziția analitică foarte asemănătoare cu cea obținută prin
- utilizarea celulelor de drojdie libere;
- perfecta stabilitate proteică și tartrică a vinurilor spumante obținute;
- absența urmelor de alginat în vin, după degorjare [8].

Pentru eliminarea posibilității ca celulele de drojdie existente pe suprafața bilelor obținute să difuzeze în masa vinului după îmbuteliere și să determine creșteri ale turbidității, acestea sunt imersate într-o soluție de alginat de sodiu 4%, după ce în prealabil aceasta a fost sterilizată, și sunt trecute apoi într-o soluție de clorură de calciu. Se obțin astfel sfere cu dublu înveliș, eliminându-se posibilitatea de reeliberare a celulelor [7].

4. IMOBILIZAREA ENZIMELOR

Izolarea și purificarea enzimelor, în particular a celor intracelulare, este relativ destul de scumpă. De aceea s-a căutat ca pierderea lor prin utilizarea în procese batch să fie înlocuită prin identificarea posibilităților pentru utilizarea lor repetată sau chiar în sistem continuu. Realizarea acestor cerințe se poate efectua prin „*imobilizarea enzimelor*”.

Reținerea enzimelor într-o fază insolubilă a determinat realizarea a numeroase cercetări deoarece prin apropierea stării de existență a enzimelor cu cea din celule permite o mai bună cunoaștere a comportării lor reale „*in vivo*”.

Astăzi se știe că cele mai multe dintre enzime în stare naturală, „*in vivo*”, nu se află în stare liberă ci legate la nivelul membranelor celulare sau a organelor din celule [7].

De asemenea în sol, enzimele eliberate de către microorganisme acționează legate de compuși argiloși sau humici. Astfel dacă din punct de vedere biochimic putem caracteriza și înțelege funcționarea enzimelor în soluție nu înseamnă că vom ști în mod clar și comportamentul lor in situ.

Din punct de vedere practic, imobilizarea enzimelor oferă o serie de posibilități. Astfel

dezvoltarea realizării de enzime imobilizate a condus și la realizarea de tehnici de imobilizare a celulelor, realizări deosebit de importante pentru biotehnologie deoarece acestea au aplicații diverse. Câteva aplicații principale ale tehnicilor de imobilizare sunt:

Enzime imobilizate : izomerizarea glucozei, producerea de acid 6-aminopenicilanic, hidroliza lactozei, sinteza unor aminoacizi (lizina, alanina), separarea formelor D și L ale aminoacizilor, hidroliza proteinelor și poliglucidelor, producerea de acrilamidă.

Microorganisme imobilizate : tratamentul apelor și efluenților (filtre bacteriene, denitrificare, metanizare), sinteza de aminoacizi (acid aspartic, alanina, fenilalanina, triptofan), producerea de etanol, sinteza hidroxifenilglicina, izomerizarea glucozei [20].

Celule animale imobilizate : producerea de vaccinuri, producerea de anticorpi monoclonali, producerea de hormoni.

În ultimele decenii au fost puse la punct o serie de metode de imobilizare.

Prin imobilizarea enzimei se înțelege limitarea gradului de „libertate” al moleculei proteice datorită legării sale de un suport prin intermediul altor funcții decât cele care fac parte din situsul activ al enzimei.

Enzimele imobilizate prezintă o serie de avantaje care permit utilizarea lor în biotehnologiile actuale: separarea ușoară din amestecul de reacție, reciclarea catalizatorului, stabilitatea lui, conducerea în sistem continuu a unui proces, reglarea vitezei de reacție, modificarea controlată a proprietăților și chiar a specificității enzimelor, obținerea unui bioproduct de puritate avansată, posibilitatea de studiu a aspectelor fundamentale a enzimologiei și biologiei moleculare [19].

Deși există și o serie de dezavantaje (sterilizarea reactoarelor, limitări difuzionale, modificarea proprietăților enzimatică, colmatarea de suporturi și reactoare), avantajele le compensează și determină utilizarea lor la nivel industrial.

Principalele căi de imobilizare sunt de includere sau de legare a enzimelor în diferite suporturi insolubile sau care devin insolubile după ce se combină cu enzima. Aceste căi pot fi de : adsorbție, incluziune și legare covalentă.

Indiferent de modul prin care se realizează imobilizarea trebuie să se asigure condiții în care se menține stabilitatea conformației native a enzimei (temperaturi scăzute, pH optim de acțiune etc.) și suportul trebuie să : nu denatureze enzima, să fie rezistent la modificările de pH sau temperatură și să posedă proprietăți hidrofili.

Până acum nu există încă procedee și condiții standard care să poată fi aplicate tuturor enzimelor

tocmai datorită caracterului personal al fiecăreia, astfel încât modul în care trebuie să se realizeze imobilizarea pentru o enzimă dată se stabilește în mare măsură empiric [8].

CONCLUZII

Imobilizarea celulelor a devenit o practică importantă în biotehnologiile ultimilor ani ducând la creșterea performanței și economicității proceselor fermentative.

Utilizarea microorganismelor fixate și imobilizate în vinificație sunt înalt apreciate în întreaga lume de aceea pentru sporirea performanței industriei vinicole în Republica Moldova s-au făcut cercetări pentru creșterea biomasei levurilor pure.

Desfășurarea procesului de fermentație alcoolică cu levuri imobilizate permite acumularea biomasei de levuri pure.

Bibliografie

- Anghel, I., Toma, M., Voica, C., Cojocaru, I.** *Biologia și tehnologia drojdiilor. Vol. I, București: Ed. Tehnică, 1989.*
- Busova, K., Magyar, I., Janky, F.** *Effect of immobilized yeasts on the quality of bottle-fermented sparkling wine, Acta Alimentaria, 1994.*
- Clemansa, T.** *Microbiologie alimentară. București: Agir, 2004. 296 p.*
- Coulon, P., Duteurtre, B., Charpentier, M., Parenthoen, A.** *Nouvelles perspectives dans la methode champenoise: Utilisation de levures incluses lors du tirage. Le Vigneron Champenois, 1983.*
- Dey, P. M. & Harborne, J. B.** *Methods in plant biochemistry. Carbohydr. Academic Press, 1993. vol. 2. 529 p.*
- Duteurtre, B., Charpentier, P., Ors, P., Hennequin, D.** *Les levures incluses pour la prise de mousse: historique et fabrication des billes, Conferences de l'Association des Techniciens Superieurs en Viticulture et Oenologie, 1990.*
- Duteurtre, B., Charpentier, P., Ors, P., Hennequin, D.** *The use of immobilized yeast in the champagne making process. Agro Food Industry Hi-Tech, 1992.*
- Gaina, B.** *Biotehnologii ecologice viti – vinicole. Monografie. Chișinău, 2007. 264*
- Gomez A., et al.** *Slr2 and Rim101 Contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in S. cerevisiae. In: Eukar. Cell, 2009, vol. 8(9).*
- Hatman, M., Ulea, E.** *Microbiologie – Curs. Universitatea Agronomică Iași – Centrul de multiplicare. Iași, 1993.*
- Jallerat, E.** *Un proges important pour le champagne et les vins de „methode traditionnelle”, Les Nouvelles Techniques de Tirage, Association des Techniques Superieurs en Viticulture et Oenologie. Epernay, 1990.*
- Jirku, V., Masak, J., Cejkova, A.** *Yeast cell attachment: A tool modulating wall composition and resistance to 5bromo-6azauracil. In: Enz. and Microb. Technol., 2000.*
- Klis F. M., et al.** *Dynamics of cell wall structure in S. cerevisiae. In: FEMS Microbiol. Rev., 2002, vol. 26.*
- „Les nouvelles techniques de tirage”. 3eme Conference de l'Association des Techniciens Superieurs en Viticulture et Oenologie, 1990.**
- Lesage, G., Bussey, H.** *Cell Wall Assembly in S. cerevisiae. In: Microbiol. and Mol. Biol. Rev., 2006*
- Musteață, G., Gherciu, L., Bîșca, V.** *Enochimie. Metode volumetrice de analiză: indicații metodice pentru efectuarea lucrărilor de laborator. Chișinău: U.T.M, 2006. 56 p.*
- Popa, A.I., Teodorescu, Șt. C.** *Microbiologia vinului. București: Ceres, 1990. 298 p.*
- Ribereau-Gayon, P. și colab.** *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, Vol. 1. British Library Catalogue, 2006.*
- Ribereau-Gayon, P. și colab.** *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, Vol. 2. British Library Catalogue, 2006.*
- Sîrghi, C., Zironi, R.** *Aspecte inovative ale enologiei moderne. Chișinău: Sigma, 1994, p. 261.*