

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
“ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI**

ing. chim. Constantin – Bogdan NECHITA

TEZĂ DE DOCTORAT

**CONTRIBUȚII LA STUDIUL COMPUȘILOR
VOLATILI DIN STRUGURII ȘI VINURILE OBȚINUTE
ÎN PODGORIA COTNARI**

*Conducător științific:
Academician Valeriu D. COTEA*

IAȘI – 2010

REZUMAT

Teza de doctorat are ca temă "Contribuții la studiul compușilor volatili din struguri și vinurile obținute în Podgoria Cotnari".

Obiectivul principal îl constituie studiul compușilor volatili din strugurii și vinurile obținute în podgoria Cotnari, precum și optimizarea metodelor de analiză a acestora, respectiv injecție de lichide SPE – „solid – phase extraction”, injecție head-space (HS) și injecție ITEX (in tube extraction = extracție în tub).

Teza de doctorat este structurată în șase capitole, din care trei alcătuiesc partea generală și trei partea experimentală. În prima parte este prezentat ecosistemul viticol al Podgoriei Cotnari (capitolul 1), stadiul actual al cercetărilor privind compușii volatili din struguri și vin (capitolul 2) precum și informații generale privind cromatografia în fază gazoasă (capitolul 3). În a doua parte sunt tratate aspecte legate de cadrul organizatoric (capitolul 4), obiectivele cercetării abordate, materialul și metoda de cercetare (capitolul 5) precum și rezultate și discuții (capitolul 6).

Cadrul natural al podgoriei Cotnari arată că această vestită podgorie întrunește condiții favorabile de cultură a viței de vie, unii ani manifestându-se ca ani viticoli de excepție ce se remarcă în special prin calitatea strugurilor din care se obțin vinurile tipice de Cotnari. Amplasată la limita nordică de cultură a viței de vie, podgoria beneficiază de un climat valoros, soiurile autohtone din sortiment, Grasă de Cotnari, Tămâioasă românească, Frâncușă și Fetească albă, beneficiind de condiții optime pentru obținerea unor producții ridicate atât din punct de vedere cantitativ cât și calitativ.

Analizele complexe efectuate, folosind tehnici de gaz–cromatografie (GC), au permis detectarea a numeroși compuși volatili, prezența acestor compuși poate fi asociată aromei vinului.

Vinurile analizate au provenit din recoltele anilor 2005 și 2007 pentru soiul Frâncușă, 1994, 2002 și 2003 pentru Fetească albă, 1979, 1984, 1996, 2000, 2002, 2003 și 2005 pentru

soiul Grasă de Cotnari și 1995, 2000, 2002, 2003 și 2005 pentru soiul Tămâioasă românească. Analizând principalele caracteristici fizico chimice ale acestora se poate remarca faptul că recoltele anilor 2000, 2002, 2003 și 2005 au fost excepționale în vederea păstrării lor la vinotecă.

Pe lângă compușii identificați în struguri, în vin mai apar și o serie de alți compuși în special datorită proceselor de fermentație ce au loc în timpul obținerii vinurilor. În cazul vinurilor analizate, fiind vorba de vinuri obținute în sistem industrial, compușii volatili identificați depind foarte mult de levurile utilizate precum și de tehnologia de vinificație folosită.

Analizând compușii identificați în struguri s-a constatat că în ceea ce privește alcoolii la toate soiurile în boabe predomină 1-dodecanolul și 1-hexanolul. La soiul Grasă de Cotnari se mai observat prezența în cantitate mare și a alcoolilor izoamilici. De asemenea s-a remarcat prezența 1-dodecanolului (alcool laurilic), ce face parte din grupa alcoolilor grași, în cantitatea cea mai mare în toate soiurile. Acesta are o aromă caracteristică de gras, ceară. Apariția lui se datorează prezenței sale în compoziția cerurilor de pe pielea strugurilor.

Un alt alcool gras identificat în struguri a fost 2-etil-1-hexanolul. Acesta apare în plantă în cadrul ciclurilor biosintezei palmitaților și a oleaților. Izomerii 3-metil-1-butanol (alcool izoamilic) și 2-metil-1-butanol (alcool amilic activ) nu au putut fi separați în condițiile cromatografice utilizate. Din acest motiv ei au fost raportați ca alcool amilic total. Aceștia conferă un caracter fructuos atât vinului cât și strugurilor. Prezența alcoolilor amilici în boabele de struguri analizate este mai mult ca sigur datorată unui început de fermentare în timpul păstrării și manipulării acestora.

De asemenea au fost identificați următorii alcooli: 1-butanolul (apare în urma unei reacții de hidrogenare a butiraldehidei și are rol de inhibitor enzimatic în plantă, 1-hexanolul (se formează în plantă ca produs de oxidare a lipidelor sub acțiunea lipoxigenazei), 2-metil-1-propanolul (prezent în cadrul ciclului de degradare a valinei în *Saccharomyces cerevisiae*), 1-octen-3-ol - ul (considerat un indicator al stării de sănătate a recoltei de struguri), 1-pentanolul (apare în boabe ca urmare a transformării norleucinei prin calea Erlich), trans-2-Hexen-1-ol (apare în cadrul căii biochimice de transformare a 13-lipoxigenazei și 13-hidroperoxid liazei).

În boabele strugurilor nu au putut fi identificați acizi volatili, singurul acid observat a fost acidul acetic. Prezența acestuia poate fi pusă pe seama apariției de procese biochimice

nedorite ce au apărut începând cu recoltarea până la analiza boabelor.

În ceea ce privește esterii din struguri, cel mai probabil, toți compușii identificați au apărut în timpul păstrării probelor, ca urmare a unor procese de degradare (fermentare).

Dintre aldehide n-hexanalul a fost identificat în toate soiurile analizate. Acesta apare, împreună cu 2 hexenalul, ca produs secundar în cadrul ciclului biosintezei linoleatului și α -linoleatului, fiind regăsit în concentrația procentuală cea mai mare dintre toți compușii identificați.

În ceea ce privește cetonele, acetofenona identificată la boabele soiului Fetească albă este prezentă în mod normal în ciclul biochimic de degradare a etilbenzenului (anaerob). Este posibil ca prezența sa să fie datorată condițiilor de păstrare a probelor. De asemenea au mai fost identificate 1-octen-3-ona, compus aromat, ce conferă senzația de gust și/sau miros metalic și de ciuperci și 6-metil-5-hepten-2-ona ce apare ca produs în cadrul biosintezei cerurilor cuticulare la plante.

În urma analizei ITEX în soiul Grasă de Cotnari nu au fost identificați compuși terpenici. În schimb, contrar ideii că soiul Francușă nu este un soi aromatic, în acest soi au fost identificați totuși o serie de compuși terpenici (ulterior, o parte din aceștia au fost identificați și în vinuri), în total, reprezentând 12,11 % din totalul compușilor identificați. În soiul Tămâioasă românească au fost identificate cele mai multe terpene, între acestea remarcându-se α -terpineolul, α -trienolul, mircenul, β -ocimenul.

În boabele de struguri s-a observat prezența în procent mare a dietil ftalatului (raportat la compușii identificați în cromatograme), care este utilizat pe scară mare ca plastifiant în aproape orice material polimeric produs.

Vinurile analizate au făcut parte din colecția de vinuri (vinoteca) a S.C. Cotnari S.A.. Dintre acestea, cel mai vechi a fost vinul obținut din Grasă în anul 1979, iar cel mai tânăr a fost vinul obținut din soiul Francușă în anul 2007. Vinurile analizate au fost obținute prin tehnologiile de vinificație ale podgoriei ce au fost aplicate în anul de producere. Ca și criteriu de selecție a vinurilor pentru analiză au fost luați în calcul anii cu recoltele cele mai bune din punct de vedere calitativ.

Se observă că în toate cele patru soiuri au fost identificați următorii alcooli indiferent de anul de recoltă: alcoolii amilici (3-metil-butanol + 2-metil-butanol), alcoolul fenil etilic, 1-hexanolul, alcoolul izobutilic.

În majoritatea probelor analizate a fost identificat 3-hexenolul, numit și alcool de

frunze. Acest fapt poate conduce la concluzia că în timpul procesării, strugurii de Frâncușă și Fetească albă aveau o cantitate mai mare de resturi vegetale (frunze, vârfuri de lăstari), iar strugurii din soiurile Grasă de Cotnari și Tămâioasă românească au venit în contact un timp mai îndelungat cu rahisul pe parcursul procesului de premacerare.

În ceea ce privește metodele de analiză utilizate s-a constatat că în cazul metodei de analiză ITEX, procentul de alcooli identificați este cel mai mare. Pe de altă parte, prin metoda SPE a fost identificat numărul cel mai mare de alcooli.

În cazul soiului Grasă de Cotnari s-a remarcat faptul că prin învechire este posibil ca datorită proceselor reductive ce au loc în vinuri o parte din aldehide, cetone sau acizi să fie transformați în alcoolii corespunzători. Acesta a fost evidențiat prin toate cele trei metode de analiză utilizate

Puținii acizi volatili care se regăsesc în vin sunt produși în cea mai mare parte prin fermentație levuriană. Acizii alifatici superiori (hexanoic, octanoic și decanoic) au fost regăsiți la vinurile luate în studiu, aceștia formându-se în urma fermentației levuriene împreună cu alți esteri.

Prin analiza ITEX a fost evidențiat acidul formic în toate vinurile analizate în procent scăzut, prezența acestuia se justifică prin posibilitatea ca recolta de struguri să fi fost mucegăită sau ca urmare a oxidării neenzimatice a acidului glioxilic.

Este interesant de remarcat prezența acidului benzoic în cantități relativ mici. Este posibil ca acesta să apară în urma desfășurării proceselor biochimice naturale din plante (biosinteza benzoatului I, II, III sub acțiunea coenzimei A).

În vinurile analizate predomină esterii etilici responsabili de nota specifică fructuoasă, stabilă în timp. Acumularea lor este influențată de condițiile de fermentație: temperaturi scăzute, substanțe azotate în cantități mici în mediul de fermentare și deburbarea mustului.

S-a constatat că tehnica head-space favorizează extracția în cantitate mare a esterilor în timpul analizei. De asemenea, tot prin analiza head-space a fost identificat acetatul de etil, unul dintre cei mai importanți esteri ai vinului. Acesta se formează în cantitate mică, sub acțiunea levurilor, în timpul procesului de fermentație, dar poate apărea în doze ridicate și ca urmare a intervenției bacteriilor acetice îndeosebi în timpul maturării la butoi, când vinul este încă în contact cu aerul.

Un alt ester identificat a fost acetatul izoamilic (acetat de 3-metil-1-butanol) care apare în cursul fermentației alcoolice și formează buchetul de fermentație al vinurilor tinere.

Vinurile ce conțin cele mai puține aldehide sunt cele provenite din Frâncușă.

Heptanalul, identificat în vinurile provenite din soiurile Fetească albă, Grasă de Cotnari și Tămâioasă românească, conferă o puternică aromă de fruct.

Benzaldehida, identificată de asemeni în cele trei soiuri enumerate mai sus, conferă o aromă specifică de migdale amare.

Aldehida izovalerică (3-metil-butanalul), identificată în vinurile provenite din toate soiurile studiate, are un miros puternic de măr.

Aldehida acetică și formaldehida nu au putut fi identificate pe cromatograme datorită faptului că semnalul specific a fost acoperit de cel al alcoolului etilic (majoritar), în toate cazurile studiate.

În ceea ce privește prezența cetonei, s-au identificat acetoina, acetolul și diacetilul în vinurile obținute din soiul Tămâioasă românească. Acetolul a mai fost identificat de asemeni și la vinurile obținute din soiurile Grasă de Cotnari și Fetească albă.

Acetona este prezentă în toate vinurile, mai puțin cele obținute din soiul Frâncușă. Diacetilul, în concentrații mici, poate influența plăcut aroma vinului, conferind o tentă de alună. Acetoina intervine în buchetul vinului, iar în cazurile studiate aceasta apare datorită faptului că vinurile au avut rest de zahăr în momentul sulfitării.

Compusul 3-metil-4-heptanonă, identificat prin SPE în vinul din anul 2007 provenit din soiul Frâncușă, nu a mai fost raportat în vinuri până acum. Masa moleculară este 128,21, temperatura de fierbere 150,47 °C, solubilitatea în apă: 1371 mg/L, presiunea de vapori: 525 Pa.

Se cunoaște faptul că terpenele se găsesc în struguri și vin atât în stare liberă cât și legată. Formele legate au în componență ca rest glicozidic glucoza, arabinoza, ramnoza și apioza, aceste forme fiind nevolatile. În general, terpenele nu se modifică în timpul fermentației. Cu toate acestea soiurile de struguri ce conțin β -glicozidaze, pot elibera terpenele din formele legate în condiții normale de vinificație. Compoziția finală a terpenelor din vin este dependentă de tipul și timpul de maturare.

Deși soiul Frâncușă nu este considerat un soi aromat, am identificat totuși atât în boabe cât și în vinuri compuși terpenici: în boabe putem remarca mai ales mircenul, limonenul și β -ocimenul iar în vinuri se poate remarca mai ales α -pinenul și β -ocimenul. De asemeni, au fost identificați un număr destul de mare de terpene și în soiurile Fetească albă și Grasă de Cotnari, cu toate că nu sunt în cantități semnificative. În cazul soiului Fetească albă,

se poate remarca în cantitate mai mare α -pinenul și β -ocimenul. La Grasă de Cotnari, în cantitatea cea mai mare a fost identificat α -terpineol. Cu toate acestea, compușii terpenici în cazul acestui soi, ca și la Fetească albă nu s-au regăsit în cantități semnificative. Așa cum era de așteptat, în vinurile și boabele de Tămâioasă Românească, au fost identificate cele mai multe terpeni și în cantitățile cele mai mari.

Comparativ cu raportările din literatura de specialitate legate de soiurile luate în studiu în această teză, la soiul Tămâioasă românească au fost identificate mult mai mulți compuși terpenici decât până acum. Se poate observa că metoda SPE și chiar celelalte două metode sunt eficiente în extragerea și identificarea compușilor terpenici. Acest fapt, coroborat cu determinările cantitative ulterioare, pot aduce informații prețioase asupra caracteristicilor de aromă ale soiului Tămâioasă românească și nu numai.

Din câte s-a observat, metoda de extracție pe cartușe SPE este cea mai utilă în separarea lactonelor. Principalele lactone identificate au fost: butirolactona, pantolactona, γ -caprolactona, δ -nonalactona.

Chiar dacă ftalații nu sunt specifici atât viței de vie cât și proceselor fermentative, în condițiile în care prelucrarea strugurilor se face utilizând tehnologiile moderne, apariția acestei clase de compuși era inevitabilă. În cazul vinurilor, sursele posibile de contaminare pot fi: pungile din material plastic folosite la transportul pesticidelor, gălețile de plastic în care se recoltează strugurii, sacii din plastic în care se transportă strugurii la punctele de prelucrare etc.

Dietil ftalatul și dimetil ftalatul au fost identificați în toate probele analizate. În afară de vinurile provenite din soiul Fetească albă, în toate celelalte au mai fost identificați și dibutil ftalatul și diizobutilftalatul. S-a constatat că pentru această clasă de compuși sunt utile numai analiza ITEX și head-space. Extracția inițială prin SPE nu a fost utilă deoarece acești compuși nu sunt solubili în diclormetan (solventul utilizat în acest caz).

Cercetările efectuate în cadrul tezei de doctorat au condus la identificarea principalilor compuși volatili din strugurii și vinurile obținute în podgoria Cotnari, realizându-se și o analiză exhaustivă pe ani a vinurilor în vederea unei prime evaluări a evoluției compușilor volatili din vinurile supuse învechirii.

Gradul de noutate l-a constituit utilizarea a trei metode moderne de prelucrare a probelor, respectiv extracție pe fază solidă (SPE - solid phase extraction), head-space (preluarea fazei de vapori de deasupra unui lichid) și ITEX (extragerea și concentrarea în tub

- "in tube extraction"). Acestea pot fi aplicate complementar în vederea identificării și determinării cantitative a unui număr cât mai mare de compuși.