

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ
VETERINARĂ**

**”ION IONESCU DE LA BRAD” IAȘI
FACULTATEA DE HORTICULTURĂ**

**DOMENIUL: HORTICULTURĂ
SPECIALIZAREA: VITICULTURĂ ȘI OENOLOGIE**

**Doctorand,
Niculaua Marius**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Coordonator științific,
Prof. univ. dr. Valeriu V. COTEA**

2010

REZUMAT

Prezentul studiu a avut drept principal obiectiv studiul acizilor prezenți în vinuri din podgoriile Moldovei, în vederea unei caracterizări cât mai obiective a modului în care acești compuși sunt repartizați în vinurile din diverse zone de producție precum și obținerea unor eventuale configurații ale paletelor compuşilor cu funcție acidă caracteristice diverselor vinuri.

Materia primă utilizată, strugurii, au fost recoltați din podgoriile Iași-Copou (19.09.2006; 19.09.2007); Iași-Uricani, culeși la două perioade de timp diferite în anul 2006 (23.09.2006 și 17.10.2006), precum și în 2007 (27.09.2007); Cotnari (27.09.2006; 11.09.2007) Huși (18.09.2006; 07.09.2007); Târgu Bujor (21.09.2006); Panciu (18.09.2006) și Odobești (19.10.2006; 22.10.2007). Gradul de acumulare a zaharurilor la diferitele soiuri luate în studiu a fost, în mod caracteristic, specific perioadei respective. Evaluarea vinurilor prin concentrația alcoolică a arătat că nu toate soiurile folosite ca materie primă au avut și capacitatea de a genera vinuri superioare sau, la unele soiuri, nici chiar vinuri de consum curent. Necesitatea evaluării acestor soiuri a fost legată de o posibilă valorificare a strugurilor respectivi ca parteneri de cupajare (cu aciditate crescută) sau pentru evaluarea potențialului fermentativ în privința unui sau altui acid în particular, ca material de valorificare secundară.

În studiul de față s-au obținut și s-au caracterizat 101 vinuri din strugurii unor soiuri autohtone recoltați în anii 2006 și 2007 din șase podgorii de pe întreg cuprinsul Moldovei, sub aspectul acidității totale, pH, conductivității, acidității volatile, acizilor (fiecși) tartric, malic, lactic, succinic, acetic, citric, fumaric, shikimic, protocatehic, p-hidroxibenzoic, vanilic, galic, siringic, gentisic, cafeic, clorogenic, p-cumaric, ferulic și sinapic. Pe lângă acești parametri cantitativi s-a efectuat și o evaluare calitativă a vinurilor prin prisma acizilor acetic, butiric, izobutiric, hexanoic, octanoic și decanoic, constituenți ai acidității volatile, cu ajutorul tehnicii ITEx-GC-MS. Soiurile de struguri avute în lucru au fost: Amurg, Arcaș, Băbească gri, Băbească neagră, Balada, Bătută neagră, Blasius, Cioinic, Codană, Creață de Banat, Cruciuliță, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Frâncușă, Furmint de Miniș, Gordan, Gordin, Grasă de Cotnari, Mustoasă de Măderat, Negru aromat, Negru de Căușani, Negru de Drăgășani, Negru moale, Negru vârtos, Novac, Șarbă, Selenă, Vulpe, Zghiheară în cazul podgoriei Iași-Copou pentru anul de producție 2006; Băbească gri, Băbească neagră, Balada, Bătută neagră, Blasius, Busuioacă de Bohotin, Cioinic, Codană, Creață de Banat, Cruciuliță, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Frâncușă, Furmint de Miniș, Galbenă de Odobești, Gordan, Gordin, Miorița, Mustoasă de Măderat, Negru de Căușani, Negru de Drăgășani, Negru moale, Negru vârtos, Șarbă, Tămâioasă românească în cazul podgoriei Iași-Copou pentru anul de producție

2007; Fetească regală și Fetească neagră (2006 și 2007) în cazul podgoriei Iași-Uricani; Frâncușă, Fetească albă, Grasă de Cotnari, Tămâioasă românească în cazul podgoriei Cotnari pentru anii de producție 2006 și 2007; Busuioacă de Bohotin, Fetească albă, Fetească regală, Zghihară în cazul podgoriei Huși pentru anul de producție 2006; Băbească neagră, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Zghihară în cazul podgoriei Huși pentru anul de producție 2007; Băbească neagră, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală în cazul podgoriei Târgu Bujor pentru anul de producție 2006; Plăvaie și Fetească neagră în cazul podgoriei Panciu pentru anul de producție 2006; Băbească gri, Băbească neagră, Codană, Fetească neagră, Fetească regală, Galbenă de Odobești, Mustoasă de Măderat, Plăvaie, Șarbă în cazul podgoriei Odobești pentru anul de producție 2006; Băbească gri, Codană, Fetească albă, Fetească neagră, Fetească regală, Galbenă de Odobești, Plăvaie, Șarbă, Tămâioasă românească în cazul podgoriei Odobești pentru anul de producție 2007.

Pe lângă probele de vin amintite au mai fost realizate și o serie de experimente controlate, care au vizat studiul acizilor în urma unor procese de pasteurizare, tratament cu plasmă rece, precum și comportamentul acizilor din vin în cursul unor tratamente cu produse oenologice: bentonită+cazeină, gelatină și carboximetilceluloză CMC (coloid protector, potențial substituent al gumei arabice).

Din evaluarea impactului pe care diferite tratamente oenologice îl pot avea asupra compoziției de acizi din vinuri s-a observat că acizii aflați în concentrații de nivelul g/L au o variație puțin semnificativă, indiferent de tratamentul la care vinul a fost expus, iar cei aflați în concentrații mai mici (de nivelul mg/L) variază semnificativ, lucru care poate depinde și de tipul vinului. Se mai poate preciza că macroparametri precum aciditatea volatilă și cea totală nu prezintă variații semnificative pe când fiecare acid în parte are o evoluție particulară funcție de echilibrul în care se găsește în vin la momentul realizării tratamentului. Evoluția per ansamblu a tuturor acizilor din vin este compensatorie astfel încât macroparametrii menționați nu fluctuează semnificativ. Tratamentele de limpezire și stabilizare aplicate vinurilor nu influențează extrem de semnificativ compoziția unor acizi organici prezenți în vinuri în mod obișnuit (cu mici excepții), astfel încât tratamentele studiate pot fi utilizate fără rezerve în oenologie.

Metoda de analiză a acizilor organici majoritari (tartric, malic, lactic, succinic, acetic, citric, fumaric, shikimic) din vinuri, pusă la punct în cadrul prezentei lucrări, este eficientă, chiar dacă este mai îndelungată, în a separa convenabil și a caracteriza acești compuși din orice probă de vin.

În cazul acestui studiu s-a realizat o evaluare a tuturor metodelor propuse de Organizația Internațională a Viei și Vinului ca variante de separare și identificare a acizilor organici prin tehnica lichid cromatografiei (LC sau HPLC). Cele două metode standardizate nu au fost viabile

având neajunsuri majore precum rezoluție scăzută în condiții extreme de temperatură și pH (coloanele tip stiren divinilbenzen S-DVB) sau eluant instabil și rezoluție relativ mică (cuplarea a două coloane și folosirea unui eluant tampon de fosfat). Toate aceste neajunsuri s-au rezolvat în timp prin optimizări graduale a metodelor și prin alegerea judicioasă a componentelor care pot duce la o separare convenabilă.

În condițiile tehnicii moderne (lichid cromatografie) s-au caracterizat vinurile obținute din toate cele 35 soiuri românești din punctul de vedere al concentrației în acid shikimic, compus extrem de important în evaluarea vinului prin prisma soiului de proveniență, dar și cu un rol bioactiv semnificativ. Avem astfel, pentru vinurile albe, un interval de variație cuprins între 6,1 mg/L la Blasius Copou 2007 și 70,5 mg/L la Zghișărești Huși 2006. Pentru vinurile roșii, valorile de minim se întâlnesc la Băbească neagră Huși 2007 (9,6 mg/L) și cea maximă la Arcaș Copou 2006 (101,2 mg/L). De precizat că datele din literatură referitoare la diversele vinuri obținute din multe soiuri românești lipsesc, iar în urma acestui studiu s-a realizat o analiză de caz destul de completă a acestui compus.

Metoda de analiză a acizilor fenolici a fost optimizată pentru a obține informații referitoare la aproape toți compușii de interes fiziologic pentru organismul uman (acizii protocatehic, p-hidroxibenzoic, vanilic, galic, siringic, gentisic, cafeic, clorogenic, p-cumaric, ferulic și sinapic) rezultați fie în urma proceselor de biosinteză în plantă, fie în timpul fermentațiilor. În cazul acizilor fenolici s-a reușit practic punerea la punct a două metode de separare și dozare care pot fi utilizate în analiza unui număr mare de compuși din vin, dar și din struguri. Diferențele dintre cele două metode constau în stabilitatea eluantului utilizat, pe de o parte, dar și utilizarea simultană a unui al doilea detector. În cazul utilizării a doi detectori se pot identifica cert și, bineînțeles, doza mai mulți compuși chimici care prezintă proprietăți fizice complementare celor doi detectori (DAD și fluorescență). Practic capacitatea de picuri (substanțe) în cazul acestor metode poate ajunge și până la 120-180 într-un timp de 90 minute, cât se derulează separarea. La unii acizi care se cunosc că provin din struguri în urma proceselor de biosinteză vegetală (acidul protocatehic, galic, p-cumaric, cafeic și ferulic) s-a dovedit, prin evaluarea variantelor tehnologice, că există o favorizare tehnologică în sensul acumulării acestora în vin prin diverse metode de extracție mai dure (termomacerare, rotovinificare, tehnica de intensificare a culorii), cum este cazul vinurilor de Fetească neagră.

Evaluarea compușilor volatili din vinurile autohtone a reprezentat o noutate deoarece până în momentul de față nu sunt cunoscute în literatura de specialitate date în acest sens privind vinurile respective. De precizat că s-a dezvoltat, pentru prima dată, o metodă care implică tehnica de concentrare online tip ITEX (în tub extraction method) cuplată direct la cromatograful de gaze în scopul analizelor pentru vinuri (în mod direct). S-au evaluat rezultatele obținute prin

intermediul a două metode distincte de separare: o primă metodă constă în introducerea probei de vin într-o fiolă pentru analiză de vapori (headspace) și concentrarea conform programului ITEX; prin adăugarea unui amestec de NaCl, Na₂SO₄ și KH₂PO₄ în proba de vin se favorizează eliberarea compușilor volatili ce sunt apoi concentrați conform programului ITEX cu aceiași parametri de concentrare, dar rezultând un produs de injectare mai concentrat. Folosind aceste tehnici s-au identificat un număr mare de esteri care provin din struguri, din fermentație și din semințe (esteri ai acizilor grași). Rezultatele sunt comparabile în ambele cazuri de concentrare (cu și fără sare), dar de multe ori s-a constatat că în fracția de headspace a vinului sunt prezenți mai mult acizii în forma liberă, iar la aplicarea unei suprasaturări cu săruri alcaline predomină esterii vinului.

Chiar dacă evaluarea nu s-a efectuat cantitativ, s-au putut exprima concluzii referitoare la compoziția de acizi grași ca de exemplu corelația care se realizează între acizii hexanoic și octanoic pentru vinurile de Fetească neagră indiferent de an, podgorie sau tehnologia de producere utilizată.

Cu ajutorul cromatografiei de gaze cuplată la spectrometrul de masă s-a identificat, în unele probe salifiate de vin, cu probabilități de peste 80 % față de o bază de date spectrală NIST08, acidul acetohidroxamic la vinul de Fetească albă din zona Copou 2006, precum și acidul 2-etil-heptanoic la vinurile de Negru de Căușani (probă fără sare), Selena (probă cu sare) din centrul viticol Copou, anul 2006 și Fetească regală din podgoria Huși, anul de producție 2007. În cazul podgoriei Huși, tot în 2007, s-a putut identifica la probele cu sărare din Fetească neagră, acidul 2-metil-butanoic. La vinul din Plăvaie la podgoria Panciu în anul de producție 2006 s-a putut pune în evidență, în condițiile sărării, acidul izopropilpiruvic sau acidul 4-metil-2-oxovaleric cu o probabilitate 79 % față de baza de date NIST08, care este un compus de metabolizare. Acidul acetohidroxamic poate apare în vinuri atunci când activitatea lacazei este în plină desfășurare sau când strugurii sunt afectați de *Botrytis cinerea*.

Prin evaluarea pe doi ani de studiu a vinurilor din soiuri diferite existente în podgoriile consacrate ale Moldovei s-a observat că în anul 2006 aciditatea vinurilor este mai mare decât în anul 2007 (an mai ploios în perioada de recoltare), indiferent de zona de proveniență a strugurilor.

Un aspect particular al studiului a fost reprezentat de compararea vinurilor obținute din soiul Fetească neagră prin diferite tehnologii de macerare-fermentare (obținerea vinurilor albe din soiuri de struguri negri, obținerea vinurilor rozé, macerația carbonică, macerația clasică, macerația în cisterne rotative, termomacerația, concentrarea intensității colorante) sub aspectul macroparametrilor și compușilor acizi constituenți. Există diferențe de la un acid la altul sub aspectul influenței tehnologice. De precizat că în cazul unor acizi precum shikimic, galic, cafeic,

sinapic, hexanoic, octanoic, decanoic s-a evidențiat o diferențiere netă în raport cu zona de producere a strugurilor utilizați în experimentări de o parte și de alta a unei linii de demarcație între zona nordică și cea sudică a arealului studiat. Influența anului de producție este netă atât la nivel de macroparametri cât și în evaluarea cantitativă sau calitativă a fiecărui acid în parte.

Prin evaluarea cantității de acizi malic și lactic se poate stabili care dintre probele de vin au realizat procesul de fermentație malo-lactică care, de multe ori, nu poate fi evaluat prin determinarea rapidă a parametrului pH. Din analizele efectuate s-a observat că singura tehnologie care poate conduce facil la realizarea acestui proces apare la vinurile roșii la care s-a folosit macerația carbonică. Prin evaluarea celorlalți acizi se observă că în urma macerației carbonice, în cele mai multe cazuri, aceștia scad semnificativ sau dispar, iar în unele cazuri se află în concentrații mult mai mari (acidul cafeic) comparativ cu celelalte variante tehnologice. Acest procedeu destul de controversat modifică foarte mult distribuția firească a acizilor alterând, am putea spune foarte mult, tipicitatea vinului din soiul respectiv.

Conductivitatea vinurilor este un macroparametru care este influențat nu doar de acizii prezenți în număr mare sau de cantitatea lor ci, semnificativ, și de alți parametri care nu au făcut obiectul acestui studiu: concentrația diverselor specii anionice prezente în vin, diverse proteine sau enzime cu rol de coloid protector și concentrația ionilor metalici care au rol de complexare facilă.

Dintre toți cei 11 acizi fenolici evaluați, mai importanți pentru vinurile avute în lucru s-au dovedit a fi acidul vanilic, galic, cafeic și p-cumaric care au valori de ordinul a zecilor de mg/L, iar alții precum acidul protocatehic, p-hidroxibenzoic, clorogenic și ferulic au valori sub sau egale cu un mg/L. Ceilalți acizi rămași (siringic, gentisic și sinapic) sunt prezenți la vinurile luate în studiu în cantități foarte mici și, nu de multe ori, sub limitele de detecție ale metodei. Vinurile roșii prezintă cantități mai mari de acizi fenolici comparativ cu vinurile albe dar, în condițiile climatice ale unor anumiți ani (2007), cantitățile sunt comparabile între cele două tipuri de vinuri (albe și roșii) chiar în aceleași podgorii.