

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Cuvinte cheie: osmoza inversă, vin bază, levuri, Muscat Ottonel, metoda tradițională, vinuri spumante

Vinurile efervescente se caracterizează prin concentrații ridicate de dioxid de carbon, fiind considerate *vinuri speciale*. În conformitate cu metoda tradițională de obținere a vinurilor spumante, acestea sunt supuse unui proces dublu fermentativ, astfel încât după prima fermentație alcoolică și în urma adăugării amestecului de tiraj, vinurile să fie supuse celei de-a doua fermentații în butelii (Coehlo ș.a., 2009). Există mulți factori implicați în compoziția chimică a vinurilor spumante, cum ar fi soiul și varietatea, tehnologia de cultivare, calitatea vinului-bază, tipul levurilor inoculate pentru fermentația secundară etc. Cu toate acestea, cea de-a doua fermentație și etapa de maturare pe sedimentul de drojdie constituie factori cheie asupra calității finale a vinurilor spumante (Pozo-Bayón ș.a., 2009). Corelată cu dorința noii generații de a testa senzații organoleptice diferite, teza de doctorat cu titlul „*Studii privind influența diferitelor sușe de levuri asupra calității vinurilor spumante obținute prin metoda tradițională*” își propune să studieze influența levurilor (*Saccharomyces* spp.) utilizate la cea de-a doua fermentație asupra calității vinurilor spumante albe. Prezenta cercetare se axează pe evaluarea unor constituenți chimici (acizi organici, ioni metalici, compuși volatili), cât și pe evaluarea profilului senzorial al vinurilor spumante obținute. Pentru îndeplinirea scopului general, protocolul experimental a presupus stabilirea următoarelor obiective specifice: studierea literaturii de specialitate și selectarea unei baze de date relevante; stabilirea protocolului experimental și a activităților; realizarea variantelor experimentale; analiza proprietăților fizico-chimice generale ale probelor obținute; evaluarea nivelului de metale din vinurile spumante; analiza conținutului de acizi organici; determinarea principalilor compuși volatili din probele finale; studiul caracteristicilor senzoriale ale variantelor analizate; interpretarea statistică a datelor și compararea acestora cu rezultatele din literatura de specialitate.

Vinurile spumante au fost obținute din struguri Muscat Ottonel, cultivați în Podgoria Iași-Copou. Probele experimentale și analizele de laborator au fost realizate în cadrul cramei experimentale și a Laboratorului de Oenologie ale Facultății de Horticultură, Universitatea pentru Științele Vieții „Ion Ionescu de a Brad” din Iași. Au fost realizate astfel cinci variante experimentale. Strugurii au fost recoltați la maturitate deplină, manual în toamna anului 2015. În vederea desfășurării fermentației alcoolice, au fost inoculate diferite levuri aparținând speciei *Saccharomyces*. Procesul fermentativ s-a desfășurat în condiții controlate de temperatură (20 °C). După finalizarea fermentației primare, vinul (V0) a prezentat inițial o concentrație alcoolică de 12,5 % vol. alc. Pentru a reduce acest nivel și a obține o concentrație alcoolică predeterminată (10,5 % vol.) a fost aplicată osmoza inversă (rezultând V0'). Fermentația secundară a avut loc în butelii din sticlă, fiind inoculate diferite levuri comerciale, după cum urmează: IOC FIZZ™ - V1; IOC DIVINE™ - V2; LEVULIA CRISTAL™ - V3; IOC 18-2007™ - V4. Rezultatele analizelor fizico-chimice ale vinurilor spumante analizate se încadrează în limitele admise de normativele Organizației Internaționale a Viei și Vinului (OIV, 2020). Având în vedere că pentru obținerea acestora s-a folosit același vin-bază, posibilele diferențe sunt puse pe seama inoculării diferitelor tipuri de levuri în vederea desfășurării fermentației secundare. S-au observat modificări minore ale principalilor parametri fizico-chimici analizați la 11 luni de la producerea probelor, comparativ cu rezultatele înregistrate la 6 luni. În funcție de nivelul zaharurilor remanente, probele experimentale pot fi încadrate ca vinuri spumante brute. Concentrația alcoolică a vinurilor spumante analizate a variat de la 11,3 % vol. (V2 și V4) până la 11,6 % vol.

(V1 și V3). Parametri precum densitatea, aciditatea totală, zaharurile reziduale și extractul nereducător au valori dependente, cu diferențe importante între eșantioane. Analiza varianței a indicat diferențe semnificative între caracteristici fizico-chimice ale probei martor și a celor care au conținut levuri ($p < 0,001$ pentru majoritatea parametrilor). De asemenea, valorile au fost influențate și de tipul levurilor inoculate ($p < 0,001$ pentru majoritatea perechilor de medii, $p < 0,05$ pentru aciditatea volatilă în ambele perioade de analiză, diferențe nesemnificative pentru densitate). În urma aplicării testului post-hoc Tukey HSD, s-au evidențiat perechile de variante care s-au diferențiat semnificativ pentru fiecare indicator fizico-chimic în parte. Astfel, în cazul densității, diferențele au vizat proba martor (V0) comparativ cu variantele V1, V2, V3 și V4, care au conținut levuri. De asemenea, se observă o influență minoră asupra calității fizico-chimice la probele în care s-au inoculat levuri.

Profilul ionilor metalici al vinurilor spumante joacă un rol important în modularea atributelor senzoriale ale acestora. Compoziția metalelor din vin în timpul fermentației, maturării și depozitării nu este stabilă. Cantitatea de K și Ca este ascendentă pe parcursul păstrării (de la 6 la 11 luni), pe când nivelul ionilor de Mg și Na se diminuează considerabil pe perioada păstrării. În timpul fermentației, levurile consumă cantități importante de ioni metalici, cum ar fi Ca, Cu, Fe, K și Mg (Cotea, 2009). De asemenea, în urma proceselor de sedimentare și îndepărtare a drojdiei sunt eliminate cantități importante ale ionilor metalici analizați. Cu toate acestea, concentrații mai mari ale unor compuși (Zn, Fe, Cu, Ni, Mn) au fost identificate în probele în care s-au inoculat levuri pentru cea de-a doua fermentație. În plus, comparând concentrațiile de Fe, Cu, Ni și Mn din probele V1-V4 se observă o dinamică ascendentă în perioada de păstrare-maturare. Acest fenomen ar putea sugera susceptibilitatea probelor de vin la apariția tulburării sau a sedimentării, precum și deprecierea calității senzoriale, corelate cu acțiunea catalitică și oxidativă ale cationilor studiați (în special Fe și Cu). Potrivit lui Galani-Nikolakaki ș.a. (2002), principala sursă de contaminare cu Fe este solul, precum și ustensilele și mașinile folosite în timpul producției și procesării. Analiza varianței evidențiază o influență semnificativă a conținutului de metale în funcție de tipul levurilor inoculate. De asemenea, testul post-hoc indică perechile de medii între care există diferențe semnificative (în general, $p < 0,01$, cel puțin două medii fiind diferite semnificativ, la pragul de semnificație 99 %, indiferent de momentul analizării).

Acizii organici din vin provin în special de la materia primă, în urma tratamentelor administrate sau pot fi formați în urma desfășurării proceselor metabolice ale microorganismelor. Un nivel optim de acizi organici asigură caracterul echilibrat, proaspăt și răcoritor al vinurilor, pe când nivelurile ridicate vor imprima gust acru intens. Rezultatele evidențiază un conținut mai ridicat în acizii organici analizați în cazul vinului bază, comparativ cu vinurile spumante obținute ulterior. Acidul malic reprezintă, alături de acidul tartric, aproximativ 90 % din totalul acizilor organici din vin (Robles ș.a., 2019). Probele analizate au prezentat valori cuprinse între 6,33 g/L și 6,46 g/L acid malic la determinările realizate după 6 luni de păstrare și între 5,61 g/L (V3') și 6,63 g/L (V2') după 11 luni. S-a remarcat o tendință crescătoare a concentrației acidului malic între 6 și 11 luni de păstrare a majorității variantelor, cu excepția probei V3, unde conținutul acestui acid a înregistrat scăderi importante în timp. După acidul malic, cel mai abundent acid a fost acidul tartric, cu o concentrație medie cuprinsă între 0,99 g/L și 5,97 g/L. Valorile acidului tartric rămân aproape constante între cele două momente de analiză (6 luni și 11 luni), înregistrându-se o ușoară scădere în cazul variantei V3 și o creștere în cazul variantei V4. Alături de primii doi acizi prezentați, acidul citric contribuie semnificativ la definirea culorii și stabilității vinurilor spumante. Acidul citric a fost prezent în toate probele de vinuri spumante. Valorile au variat de la 0,58 g/L (V1 și V3) – 0,61 g/L (V4) la 6 luni și 0,51 g/L (V3 și V4) – 0,59 g/L (V1) la 11 luni. Concentrațiile de acid lactic au variat în funcție de activitatea drojdiei, fiind de obicei format din degradarea acidului malic. Cele mai mari valori ale acestui compus au fost determinate la probele V1 (0,42 g/L) și V4 (0,40 g/L) după 6 luni de păstrare, urmând să înregistreze acumulări importante până la 11 luni. Acidul succinic se formează la începutul

fermentației, în funcție de tulpina de levuri inoculate și variază în funcție de compoziția în azot (Waterhouse ș.a., 2016). În ceea ce privește probele analizate în prima etapă, cel mai mare conținut de acid succinic a fost identificat la probele V3 și V4 (0,31 g/L), urmate de V2 (0,20 g/L) și V1 (cu 0,18 g/L), în vinul bază găsindu-se valori de 8 - 10 ori mai mari. Conținutul de acid succinic a crescut pe perioada păstrării în toate variantele. Într-o primă etapă concentrația acizilor organici a prezentat variații minore în raport cu tipul de levuri inoculate pentru cea de-a doua fermentație ($p > 0,05$). Modificări semnificative au fost obținute între cele două momente de analiză (6 și 11 luni de păstrare). De exemplu, în cazul acidului malic, analiza post-hoc a evidențiat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între mediile probelor V1-V4, V1-V5 și V2 - V3 pentru determinările efectuate la 6 luni de la păstrare. În continuare, analizele realizate la 11 luni au arătat diferențe semnificative ($p < 0,01$) între grupurile V1-V2, V1-V3, V2-V3 și V3-V4.

Profilul de aromă constituie un factor major care determină caracterul și calitatea vinului spumant, dar și acceptabilitatea și competitivitatea acestuia pe piață. Complexitatea profilului de aromă pe parcursul fermentației crește semnificativ datorită sintezei de compuși volatili de către levurile *Saccharomyces cerevisiae* spp. Acestea manifestă un rol important în definirea caracteristicilor vinului spumant, inclusiv a concentrației alcoolice, a proporției de dioxid de carbon, a prezenței manoproteinelor și a precursorilor unor diferiți compuși de aromă. Compușii volatili cuantificați (reprezențați prin esteri, acizi, alcoolii și terpene) au fost separați în clasele lor chimice.

Esterii contribuie la caracteristicile senzoriale ale vinurilor, fiind principalii responsabili pentru notele florale și fructate. Din această categorie, compuși precum octanoatul de etil, decanoatul de etil, laureatul de etil, miristatul de izopropil, palmitatul de etil și oleatul de etil au fost identificați în urma analizei prin gaz-cromatografie. Nivelurile lor au variat în funcție de levurile inoculate. Potrivit lui Muñoz-Redondo ș.a (2020), unii esteri sunt considerați markeri ai celei de-a doua fermentații. Acetatul de izoamil este de obicei derivat din metabolismul levurilor în timpul fermentației alcoolice. Acest compus contribuie imprimarea unei arome fructate și conferă complexitate vinurilor albe (Vigentini ș.a., 2017). Concentrațiile sale au variat de la 11,71 $\mu\text{g/L}$ în proba V2 la 22,78 $\mu\text{g/L}$ în proba V4. Acetatul de 2-fenetil a fost identificat în probele V1 și V3, în timp ce concentrația cea mai mică a fost înregistrată în cazul variantei V2. Conform lui Genovese ș.a. (2013), decanoatul de etil (cu miros floral) și acetatul de 2-fenilet (aromă de trandafir) pot prezenta efect sinergic, chiar și la niveluri reduse. Valorile acetatului de 2-fenilet raportate de Torchio ș.a. (2012) au fost comparabile cu rezultatele obținute în cadrul prezentului experiment (22,33 $\mu\text{g/L}$ până la 47,72 $\mu\text{g/L}$). Succinatul de dietil se formează de obicei în timpul fermentației alcoolice. Eșantionul V2 a afișat cel mai înalt nivel al acestui compus (62,58 $\mu\text{g/L}$). Potrivit lui Torrens ș.a (2008) și Riu-Aumatell ș.a. (2006), succinatul de dietil reprezintă unul dintre esterii specifici perioadei de maturare. Proporțiile acestora pot indica creșteri semnificative în timpul celei de-a doua fermentații, ca urmare a contactului cu celulele de drojdie. Acizii pot proveni din strugurii materie primă dar pot rezulta și în urma reacțiilor chimice desfășurate în timpul fermentației alcoolice. Concentrațiile mari ale acidului decanoic, coroborată cu valorile ridicate ale acidului octanoic determină un efect inhibitor de durată asupra creșterii și dezvoltării levurilor (Riu-Aumatell ș.a., 2006; Delfini ș.a., 2001). În probele analizate, conținutul de acid octanoic a variat de la 580,64 $\mu\text{g/L}$ în varianta V1, la 258,79 $\mu\text{g/L}$ în proba V2. Acidul decanoic a atins o concentrație maximă în proba V1 (145,25 $\mu\text{g/L}$) și o valoare minimă în proba V2 (11,36 $\mu\text{g/L}$). Alcoolii reprezintă componente aromatice secundare derivate din transformarea zaharurilor și aminoacizilor în timpul procesului de fermentație, cu o influență semnificativă asupra profilului senzorial al vinului (Nascimento ș.a., 2018; Caliari ș.a., 2015). În ceea ce privește nivelul de alcoolii, alcoolul izoamilic, 4-octanolul, 1-heptanolul și 2-feniletul au fost reprezentativi în probele analizate. Alcoolul izoamilic reprezintă, în general, mai mult de 50 % din compușii responsabili de nota de fuzel (Ribéreau-Gayon ș.a., 2004). Probele experimentale au prezentat cantități de la 1019,50 $\mu\text{g/L}$ alcool izoamilic în proba V3, la 485,91 $\mu\text{g/L}$ în cazul variantei

V2. Compusul 1-heptanol a fost identificat în cantități mari în varianta V2, asigurând un miros vegetal plăcut și note fructate (mere și banane). În toate probele analizate a fost detectat alcool feniletic, un compus volatil cu miros plăcut dulce, floral și notă de miere. Cantități mai mari ale acestui compus au fost identificate în probele V1 (1150,12 μg/L) și V4 (683,46 μg/L).

Terpenele reprezintă metaboliți secundari care provin din struguri. Dintre acestea, linalolul oferă vinurilor o aromă florală proaspătă, condimentată, cu note de lămâie. Varianta V1 a prezentat cel mai mare nivel de L-linalool (138,86 μg/L), urmată de V3 (120,43 μg/L), V4 (44,31 μg/L) și V2 (16,65 μg/L). Acest compus este transformat prin acțiunea acizilor în geraniol, nerol și, respectiv, terpineol (Lengyel, 2012). Dintre aceștia, terpineolul contribuie la definirea mirosului fructat și floral. În urma analizei prin cromatografie de gaze, cea mai mare concentrație a fost identificată în V1 (42,79 μg/L), urmată de variantele V3 (41,40 μg/L), V2 (28,19 μg/L) și V4 (24,19 μg/L). Acest compus poate proveni din struguri (în concentrații scăzute) și manifestă o percepție olfactivă ridicată (Lengyel, 2012). Datele au evidențiat un impact semnificativ pozitiv asupra profilului volatil în urma suplimentării levurilor. Se remarcă faptul că levurile inoculate în probele V1 și V3 au manifestat cea mai mare influență asupra majorității compușilor volatili studiați ($p < 0,05$). Se respinge astfel ipoteza nulă conform căreia levurile nu ar afecta profilul volatil al vinurilor spumante. În ceea ce privește rezultatele testului Tukey HSD (diferențe semnificative sincere) privind diferențele dintre diversele perechi de probe, rezultate semnificative pot fi observate între V1 și V3 în cazul 1-heptanolului și terpineolului. În plus, diferențe semnificative statistic între probele V2 și V4 în ceea ce privește acidul butiric, linalolul și terpineolul. În cazul succinatului de dietil și acidului decanoic, diferența semnificativă a fost obținută între variantele V3 și V4 ($p < 0,05$). Analiza componentelor principale descrie variațiile compoziției compușilor volatili ai vinurilor spumante produse sub influența unor diferite tulpini de levuri comerciale. Primul factor a descris 59,82 % din variabilitatea datelor și a fost strâns corelat cu majoritatea compușilor volatili identificați (octanoatul și decanoatul de etil, acetatul de 2-fenetil, lauratul de etil, acidul hexanoic, octanoic, decanoic și 9-decenoic, alcoolul izoamilic, 4-octanolul, alcoolul feniletic, linalolul L și α -terpineolul). Prin urmare, aceste componente prezintă corelație înaltă cu majoritatea compușilor volatili identificați în probele analizate. Primele două componente principale au reprezentat aproximativ 85 % din variabilitatea totală a datelor. Prima componentă principală care a explicat cea mai mare parte a variabilității totale a datelor (59,82 %) a fost corelată cu acetatul de izoamil, etilul decanoatul, lauratul de etil, alcoolul izoamil și linalolul (au prezentat în toate cazurile încărcări factoriale mai mari de 0,90). Pentru a doua componentă principală, succinatul de dietil și miristatul de izopropil au prezentat valori ridicate și pozitive. Reprezentările grafice specifice analizei în componente principale arată o corelație pozitivă a compusului 1-heptanol cu acidul butiric (r aproape de +1), dar o corelație negativă cu miristatul de izopropil (r aproape de -1). În plus, linalolul și decanoatul de etil sunt corelate pozitiv, în timp ce linalolul și acidul butiric prezintă o corelație negativă. De asemenea, sunt corelate pozitiv octanoatul de etil, decanoatul de etil și alcoolul izoamil, cele mai răspândite substanțe volatile din probele analizate. Pe de altă parte, acestea sunt corelate negativ cu acidul butiric și 1-heptanolul. Variabilele raportate la factorul 1 permit diferențierea probelor după fracția volatilă. Întrucât unul dintre scopurile experimentului a fost evaluarea influenței drojdiilor inoculate asupra fracției volatile a vinurilor spumante experimentale, datele confirmă că diferite preparate pot genera diferite concentrații ale compușilor volatili.

Din punct de vedere senzorial, vinurile spumante analizate se definesc prin note intens fructate (banane, mere) și florale (flori de soc), asociate cu niveluri ridicate ale esterilor (de exemplu, octanoatul de etil și decanoatul de etil). Din punct de vedere a concentrației în care se găsesc, compușii precum acetatul de izoamil, palmitatul de etil, 4-octanolul sau 1-heptanolul nu au arătat o contribuție semnificativă asupra profilului senzorial evidențiat. Conform analizei senzoriale, toate vinurile spumante obținute au fost caracterizate ca fiind echilibrate din punct de vedere gustativ, cu

persistență crescută, aciditate ridicată (care a imprimat prospețime) și textură bună (în special proba V4). Varianta V1 a fost remarcată pentru notele florale (flori de soc), în timp ce caracterul fructat a fost predominant în V2 (în special banane verzi). Probele s-au diferențiat și din punct de vedere a efervescenței. Capacitatea vinurilor spumante de a produce spumă, cât și gradul de efervescență a acestora depinde de compoziția sa și de tehnologia de obținere aplicată. Proba V1 a primit cea mai mare notă pentru acest descriptor, pe când V4 a prezentat cea mai redusă efervescență. Intensitatea gustului dulce este mai mică cu cât gradul de efervescență a fost perceput mai ridicat. În ceea ce privește corelația dintre compușii volatili și percepția senzorială, notele fructate (mere, banane verzi, piersici) ale probelor experimentale pot fi explicate prin prezența în cantități mari a octanoatului de etil, decanoatului de etil sau a succinatului de dietil. Mirosul floral se datorează în principal concentrațiilor mari de alcool feniletic. Probele analizate au fost percepute ca fiind echilibrate din punct de vedere gustativ. S-a remarcat o influență semnificativă a levurilor asupra profilului senzorial final, proba martor prezentând cele mai mici note pentru majoritatea descriptorilor urmăriți. Varianta V4 s-a evidențiat prin aciditate și efervescență ridicată, o bună textură (cea mai mare notă) și persistență crescută. Proba notată cu V2 a fost apreciată pentru note intens fructate (mere, pepene galben), pe când varianta V3 s-a remarcat prin caracterul vegetal, de drojdie, dar și mere.

Rezultatele au arătat o influență minoră a levurilor asupra proprietăților fizico-chimice ale vinurilor spumante însă un impact esențial asupra conținutului în compuși volatili și a caracteristicilor senzoriale ale acestora. De asemenea, profilul acizilor organici și a metalelor a fost influențat în mare măsură de tipul levurilor inoculate. Datele prezentate contribuie la completarea, îmbunătățirea și îmbogățirea literaturii de specialitate în domeniul temei abordate, cât și la optimizarea tehnologiilor de vinificație existente.