



UNIUNEA EUROPEANĂ



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OPOSDRU



REZUMAT

Cuvinte cheie: Aligoté, Muscat Ottonel, SBSE-GC-MS, PCA, MVA.

Fermentația alcoolică a mustului reprezintă o verigă decisivă a procesului de vinificație, fiind etapa de „naștere” a vinului, cele mai multe componente ale acestuia luând naștere în această perioadă. În tehnologia de producere a vinurilor, levurile folosite în procesul de fermentare contribuie la formarea sau, dimpotrivă, la diminuarea însușirilor de calitate și de compoziție ale vinului.

Dacă o lungă perioadă de timp fermentația alcoolică era produsă de levurile existente în mediul de fermentație provenind de pe suprafața strugurilor sau de pe echipamentul utilizat, în ultimul timp s-a generalizat folosirea levurilor selecționate, fie din arealul viticol de unde au fost recoltați strugurii fie din alte areale viticole, comercializate sub diferite forme, cu ajutorul cărora se obțin produse de calitate superioară, se îmbunătățește randamentul și se reduce durata procesului tehnologic.

Aroma vinului este rezultatul contribuției câtorva sute de compuși volatili care sunt clasificați din punct de vedere oenologic, în funcție de originea lor, în arome varietale și prefermentative, arome secundare sau de fermentație și arome rezultate în urma procesului de maturare și/sau învechire. De asemenea, se știe că elaborarea vinurilor tinere de calitate superioară cu caracteristici varietale distincte și expresive reprezintă un trend actual impus de consumatori.

Dintre numeroșii compuși cunoscuți ai vinului, unii pot avea efecte mai puțin dorite în organismul consumatorului. Dintre aceștia menționăm aminele biogene care, în concentrații ridicate, sunt toxice fiind responsabile de unele afecțiuni ale sistemului nervos central (cum ar fi depresia și schizofrenia), cardiovasculare și afecțiuni ale sistemului digestiv. Deși inițial aminele biogene au fost considerate ca fiind substanțe „naturale” din alimente, se cunoaște în prezent că originea lor poate fi asociată cu o alterare provocată de microorganisme.

Studiul de față se focalizează în special pe fermentația alcoolică, analizând în paralel atât fermentația spontană, pentru comparație, cât și fermentația produsă de șapte sușe de levuri diferite provenite din comerț și utilizate pe scară largă de oenologii din România și alte țări ale Europei, precum și o sușă de levuri selecționată din podgoria Iași de către cercetătorii Stațiunii de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Iași. Atât vinurile obținute prin





fermentarea mustului de Aligoté și Muscat Ottonel din podgoria Iași cu sușele de levuri selecționate cât și cele obținute prin fermentație spontană sunt analizate din punct de vedere al parametrilor fizico-chimici, dar și din punctul de vedere al conținutului de compuși volatili și amine biogene, în funcție de sușa de levuri utilizată, urmând a se stabili gradul de influență a acesteia asupra parametrilor urmăriți.

Teza de doctorat este structurată în două părți, „**Stadiul cunoașterii**” și „**Contribuții proprii**”, fiind alcătuită din 7 capitole cu un total de 219 de pagini, în care sunt incluse 35 de tabele, 42 de figuri și fotografii color, 223 de titluri bibliografice și 26 de anexe. În prima parte a lucrării se face referire la stadiul actual al cercetărilor privind tematica abordată, cuprinzând introducerea și trei capitole, urmând ca în partea a doua să fie prezentate cercetările proprii structurate în trei capitole urmate de concluzii și bibliografie.

În capitolul I, denumit **Stadiul actual al cercetărilor privind compușii volatili din vinuri**, sunt prezentate date generale cu privire la principalii compuși volatili din vin, caracteristicile acestora, precum și modul în care aceștia sunt influențați de levuri.

Capitolul II, denumit **Stadiul actual al cercetărilor privind aminele biogene din vinuri**, este compus din trei subcapitole care fac referire la formarea aminelor biogene în alimente, catabolismul acestora precum și la prezența acestora în vin.

Capitolul III, denumit **Stadiul actual al cercetărilor privind metodele de analiză folosite la determinarea compușilor volatili și a aminelor biogene din vinuri**, prezintă date generale și specifice referitoare la analiza compușilor volatili și a aminelor biogene, metode de extracție a aromelor din vinuri, cât și aparatura utilizată.

Partea de cercetări proprii debutează cu capitolul IV în care se prezintă **cadrul organizatoric și instituțional în care s-au desfășurat activitățile de cercetare** specifice temei de doctorat.

Capitolul V, denumit **Obiectivele cercetării, materialul și metoda de cercetare**, reliefează principalele obiective de cercetare, metodele și mijloacele de investigare dintre cele mai moderne, admise de OIV și care dispun de un grad înalt de fidelitate. De asemenea, sunt descrise soiurile de struguri luate în studiu, cadrul natural al podgoriilor Iași și Montilla – Moriles precum și modul de realizare a variantelor experimentale.





UNIUNEA EUROPEANĂ



GOVERNUL ROMÂNIEI



MINISTERUL AGRICULTURII ȘI DEZVOLTĂRII RURALE



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OPIOSDRU



UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
ȘI LINGVISTICĂ IAȘI

În capitolul VI sunt prezentate **rezultatele** obținute în urma analizelor și **discuții** asupra acestora.

În finalul lucrării de doctorat sunt formulate **concluziile** generale (capitolul VII), ce sintetizează contribuțiile aduse și implicațiile rezultatelor obținute privind influența unor sușe de levuri asupra conținutului de compuși volatili și amine biogene din vinurile studiate.

Studiul de față a avut ca scop principal obținerea de date referitoare la influența unor sușe de levuri asupra compoziției vinurilor obținute din soiurile Aligoté și Muscat Ottonel cultivate în podgoria Iași.

Obiectivele urmărite în cadrul acestui studiu au fost:

- Analiza compușilor volatili din musturile luate în studiu.
- Stabilirea unei metode de diferențiere a profilului aromatic al musturilor prin chemometrie.
- Stabilirea influenței sușei de levuri asupra principalilor parametri fizico-chimici ai vinurilor de Aligoté și Muscat Ottonel.
- Stabilirea influenței sușei de levuri asupra conținutului de compuși volatili din vinurile de Aligoté și Muscat Ottonel.
- Stabilirea influenței sușei de levuri asupra conținutului de amine biogene din vinurile de Aligoté și Muscat Ottonel.
- Stabilirea influenței sușei de levuri asupra conținutului de compuși fenolici din vinurile de Aligoté și Muscat Ottonel.
- Analiza parametrilor cromatici ai vinurilor, simularea computerizată a culorii acestora și calcularea diferențelor de culoare (ΔE).
- Stabilirea legăturii dintre conținutul de compuși volatili responsabili pentru aromă și însușirile olfactive ale vinurilor studiate.
- Interpretarea statistică a rezultatelor obținute.

Pentru diferențierea musturilor în funcție de profilul aromatic s-au folosit două soiuri de struguri recoltați din podgoria Iași, România (Aligoté și Muscat Ottonel) și două soiuri de struguri recoltați din podgoria Montilla – Moriles, Spania (Muscat de Alexandria și Pedro Ximénez). Strugurii au fost recoltați la maturitatea tehnologică în condiții sanitare optime, și au fost congelați la $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ până în momentul presării. După dezghețare în frigider la $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, strugurii





au fost desciorchinați și presați cu o presă de laborator din oțel inoxidabil (Ferrari, Italia), fără a strivi semințele. Mustul astfel obținut a fost omogenizat, centrifugat timp de 5 minute la 5000 rotații pe minut (rpm) și supus imediat determinării pH-ului, acidității totale și zaharurilor. Pentru analiza compușilor volatili din must, mai multe fracții de 100 mL au fost congelate la $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ în recipiente sterile.

Compușii volatili liberi dar și cei eliberați după hidroliza acidă a mustului au fost analizați cu ajutorul unui cromatograf de gaze cuplat cu un spectrometru de masă, după ce au fost extrași pe o bară magnetică de adsorbție și desorbiți într-o unitate de desorbție termică (TDU).

Pentru studierea influenței unor sușe de levuri asupra conținutului de compuși volatili și amine biogene din vinurile albe s-au folosit două soiuri de struguri (Aligoté și Muscat Ottonel) proveniți din podgoria Iași, recolta 2013. În momentul în care au atins maturitatea tehnologică, strugurii au fost recoltați în lăzi de plastic, iar după recepția cantitativă și calitativă au fost zdrobiți, desciorchinați și imediat presați cu o presă hidraulică, mustul rezultat fiind omogenizat și împărțit în nouă părți egale. Opt din cele nouă loturi astfel obținute au fost însămânțate cu levuri selecționate după cum urmează: lotul 1 (A1 pentru Aligoté respectiv M1 pentru Muscat Ottonel) a fost însămânțat cu levuri selecționate comercializate sub denumirea de Fermol aromatic[®], lotul 2 (A2, M2) a fost însămânțat cu levuri comercializate sub denumirea de Cross Evolution[®], lotul 3 (A3, M3) cu Zymaflore X16[®], A4 și M4 cu Fermol Cryoarome[®], A5 și M5 cu Fermactive Thyol[®], A6 și M6 cu Fermactive AP[®], A7 și M7 cu Fermactive Muscat[®], A8 și M8 cu sușa de levuri A₂B aparținând speciei *Saccharomyces cerevisiae*, selecționată de cercetătorii de la Stațiunea de Cercetare Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Iași. Al nouălea lot a fost lăsat să fermenteze liber, servind drept martor. După desăvârșirea fermentației alcoolice, vinurile au fost filtrate steril cu ajutorul unui filtru cu plăci, sulfatate, îmbuteliate și depozitate în beci la temperatură constantă. După șase luni de la îmbuteliere, probele de vin au fost analizate pentru evaluarea parametrilor fizico-chimici de bază dar și a conținutului lor în compuși volatili și amine biogene. Analizele fizico-chimice de bază precum și ale conținutului de amine biogene din vin au fost efectuate în cadrul Laboratorului de Oenologie al Facultății de Horticultură din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară „Ion Ionescu de la Brad” Iași în timp ce analiza compușilor volatili și a parametrilor de culoare s-au efectuat în cadrul laboratorului Grupului Vitenol de la Universitatea din Cordoba, Spania.





UNIUNEA EUROPEANĂ



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OPOSDRU



La variantele de vin astfel obținute s-au efectuat următoarele analize fizico-chimice: concentrația alcoolică, aciditatea totală, aciditatea volatilă, substanțe reducătoare, extract sec total, extract nereducător, pH-ul, densitatea, SO₂ liber, SO₂ total.

Compușii volatili majoritari din vin au fost determinați prin injecție directă într-un gaz-cromatograf dotat cu detector FID; compușii volatili minoritari au fost determinați prin metoda SBSE-TD-GC-MS; compușii fenolici – prin metode spectrofotometrice, culoarea – prin metoda CIE Lab, în timp ce aminele biogene au fost determinate cu ajutorul metodelor lichid cromatografice.

În experimentările efectuate, pentru obținerea vinurilor albe s-a lucrat cu o materie primă omogenă, strugurii provenind din aceeași parcelă, iar mustul obținut din presarea lor fiind omogenizat și împărțit apoi în părți egale în vederea inoculării cu sușe de levuri selecționate.

Având în vedere că fluxul tehnologic aplicat a fost același pentru toate variantele experimentale, diferențele existente între componentele analizate se datorează în cea mai mare parte sușelor de levuri utilizate la vinificația primară a strugurilor.

La vinurile obținute din soiul Aligoté, conținutul în alcool etilic diferă între variantele studiate cu până la 1,15% vol., fiind cuprins între 11,11 și 12,26% vol., toate vinurile fiind seci cu excepția variantei martor, variantă care a înregistrat și valoarea cea mai mare a acidității volatile. Se pare că folosirea sușelor de levuri selecționate a condus la o scădere a acidității totale până la 5,48 g/L C₄H₆O₆ (A7) și creșterea valorii pH-ului până la 3,73 (A6) în comparație cu varianta martor care a înregistrat o aciditate de 6,21 g/L C₄H₆O₆ și pH 3,09. De asemenea, în condițiile anului 2013, din soiul Aligoté, la variantele la care s-au folosit levurile comercializate sub denumirea de Cross Evolution (A2), Fermactive AP (A6), Fermactive Muscat (A7) și A2B (A8) s-au obținut unele vinuri cu un conținut în extract nereducător mai mic de 17 g/L, care nu se pot încadra în categoria DOC.

Cu excepția variantei martor, din soiul Muscat Ottonel s-au obținut vinuri seci, cu un conținut alcoolic cuprins între 12,89–14,14% vol. în funcție de sușa de levuri folosită la fermentare. Diferența de 1,25% vol. se datorează în special sușei de levuri care, pentru 1% vol. alcool poate consuma o cantitate mai mare sau mai mică de zaharuri. De asemenea, o mică parte din diferență se poate datora și pierderilor care au loc în timpul fermentației tumultuoase când, odată cu dioxidul de carbon, se degajă și cantități mici de alcool. Cele mai extractive vinuri s-au





obținut prin fermentare cu Fermactive Muscat (M7) precum și cu Fermactive AP și Zymaflore X16 (M6 respectiv M3); la aceste variante, conținutul în extract nereducător a avut valori de 20–22 g/L.

În ce privește conținutul de compuși volatili, în mustul provenit din cele patru soiuri luate în studiu au fost identificați 51 de compuși din care 14 au fost clasificați ca terpeni și norizoprenoide, șapte ca aldehide și cetone, doi ca alcooli, șapte ca derivați benzenici, opt ca acizi organici și 13 ca esteri. Din cei 51 de compuși volatili identificați, trei au fost amintiți pentru prima dată în mustul de struguri.

Pe baza ariei relative a tuturor compușilor de aromă individuali incluși în cele șase grupuri stabilite anterior și folosind analize statistice avansate (analize statistice cu variabile multiple – MVA, și analiza componentelor principale – PCA) s-a realizat o ușoară diferențiere între mustul obținut din cele patru soiuri de struguri.

În cazul vinurilor Muscat Ottonel luate în studiu, în urma analizelor efectuate pe GC-FID și SBSE-GC-MS au fost identificați un număr de 65 de compuși de aromă dintre care 35 au fost cuantificați sub formă absolută iar 30 au fost cuantificați orientativ, în funcție de aria relativă a picurilor acestora, care este direct proporțională cu concentrația lor. Se pare că diferențele de compoziție în ceea ce privește compușii volatili ai vinurilor obținute prin fermentarea mustului de Muscat Ottonel cu diferite sușe de levuri sunt mai degrabă cantitative decât calitative.

Pentru a evalua influența compușilor de aromă cuantificați asupra aromei globale a vinului, s-a calculat valoarea activității odorante (OAV) a fiecărui compus în parte. De asemenea, fiecare compus a fost atribuit uneia sau mai multor serii odorante, în funcție de descriptorii de aromă, în conformitate cu literatura de specialitate. Pentru acest studiu au fost folosite seriile odorante: floral, fructe, vegetal, dulce, chimic și gras.

Pentru probele de Muscat Ottonel luate în studiu, butanoatul de etil, hexanoatul de etil, heptanoatul de etil, octanoatul de etil, decanoatul de etil, linaloolul, nerolul, acidul octanoic, succinatul de dietil, alcoolul izoamilic, E-2-hexenolul și L 2,3-butandiolul au fost compușii de aromă caracteristici având valori supraunitare ale activității odorante în majoritatea cazurilor.

Se pare că toate probele de Muscat Ottonel luate în studiu sunt caracterizate de arome de fructe, această serie odorantă înregistrând valorile cele mai mari (între 37,32 unități la M1 și 48,51 la M6) și fiind formată din patru terpeni, opt esteri și doi polioli.





În cazul vinurilor Aligoté, au fost identificați un număr de 64 de compuși împărțiți în șase clase chimice: acizi, alcooli, compuși carbonilici, derivați benzenici, esteri și terpeni și norizoprenoide. Compușii care au caracterizat cel mai bine probele de Aligoté luate în studiu, cu OAV supraunitar în majoritatea variantelor experimentale au fost: acetatul de izoamil, butanoatul de etil, hexanoatul de etil, heptanoatul de etil, decanoatul de etil, dietil succinatul, linaloolul, nerolul, geraniolul, 2,3 butandiolul levo, alcoolul izoamilic, E-2-hexenolul și acidul butanoic. La varianta martor OAV supraunitar au avut și izobutanolul și lactatul de etil.

Seria „fructe” a înregistrat cele mai mari valori la toate variantele experimentale luate în studiu cu excepția variantei A4 la care seria „vegetal” a fost predominantă.

Prezența aminelor biogene în vin a fost asociată cu numeroase efecte fiziologice nedorite (Leitao și colab., 2005). Formarea aminelor biogene în vin depinde de prezența anumitor microorganisme precum și de prezența aminoacizilor precursori, perioada de contact a mustului cu pielea strugurelui, durata fermentației alcoolice, concentrația dioxidului de sulf, pH-ul și durata de contact a vinului cu celulele levuriene. În cadrul grupurilor microbiene, capacitatea de a produce amine biogene este o caracteristică specifică tulpinii, fiind raportată o mare variație în tipul și cantitatea de amine biogene produse între diferitele tulpini ale aceleiași specii.

Au fost identificate unsprezece amine biogene (cadaverina, izopentilamina, histamina, triptamina, feniletilamina, etilamina, etanolamina, spermina, spermidina, putresceina și tiramina), conținutul total de amine biogene din vin fiind situat între 9,29 și 14,41 mg/L la vinurile Muscat Ottonel și între 4,42 și 20,4 mg/L la vinurile Aligoté, cu precizarea că la varianta martor s-au înregistrat valori semnificativ mai mici decât la variantele experimentale luate în studiu. Din cele 11 amine cuantificate, etanolamina a înregistrat concentrațiile cele mai mari indiferent de soiul de struguri sau de sușa de levuri folosită.

Indicele de polifenoli totali (IPT) sau Indicele D280 exprimă conținutul de compuși fenolici totali (acizi fenolici, substanțe tanante și colorante) din vinuri, având valori cuprinse între 3 și 15 la vinurile albe și între 20 și 100 la cele roșii. Toate variantele luate în studiu au avut valori mici ale acestui indice, lucru explicabil dacă ținem cont de faptul că vinurile au provenit din struguri albi care acumulează cantități mici de compuși fenolici comparabil cu strugurii negri, iar vinificarea s-a realizat fără o păstrare prelungită a mustului în contact cu părțile solide ale strugurilor (pielețe, semințe) încât să permită trecerea acestor compuși în must. De asemenea,





UNIUNEA EUROPEANĂ



Fondul Social European
POSDRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI ȘI
CERCETĂRII
ȘTIINȚIFICE

OPOSDRU



există diferențe mici între variante, diferențe ce se pot explica prin acțiunea levurilor – fie prin metabolizarea acizilor fenolici fie prin alte procese care ar trebui fundamentate prin studii ulterioare.

Determinarea caracteristicilor cromatice a arătat că cele mai intens colorate vinuri s-au obținut prin utilizarea levurilor comercializate sub denumirea de Fermactive Thyol[®] în cazul vinurilor Muscat Ottonel și Fermol Cryoaromae[®] în cazul vinurilor Aligoté. Varianta la care s-a utilizat sușa de levuri comercializată sub denumirea de Fermactive AP[®] a fost cel mai puțin intens colorată la ambele soiuri luate în studiu. De asemenea, există diferențe semnificative de culoare și de ton între variantele martor și variantele experimentale, indiferent de soiul de struguri utilizat. În cazul variantelor experimentale, vinurile obținute prin fermentarea mustului de Muscat Ottonel cu sușele de levuri comercializate sub denumirea de Cross Evolution[®] și Fermol Cryoaromae[®] cât și cele obținute prin fermentarea mustului de Aligoté cu levurile comercializate sub denumirea de Zymaflore X16[®] și Fermol Aromatic[®] respectiv Fermol Aromatic[®] și Fermactive AP[®] prezintă diferențe imperceptibile din punct de vedere al culorii, pe când toate celelalte vinuri pot fi diferențiate vizual.

Prin aprecierea organoleptică a vinurilor obținute s-a remarcat varianta obținută prin utilizarea levurilor comercializate sub denumirea de Cross Evolution[®] în cazul vinurilor Muscat Ottonel și prin utilizarea levurilor A₂B în cazul vinurilor Aligoté.

