

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI**

FACULTATEA DE HORTICULTURĂ

**ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL HORTICULTURĂ
SPECIALIZAREA VITICULTURĂ ȘI OENOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**Doctorand,
Ing. Mihai Cristian FOCEA**

**Conducător de doctorat
Prof. univ. dr. Valeriu V. COTEA m.c. AR**

2023

**IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF HORTICULTURE**

**DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL DOMAIN HORTICULTURE
SPECIALIZATION VITICULTURE AND OENOLOGY**

Ph.D THESIS

**PhD Student
Eng. Mihai Cristian FOCEA**

**Scientific coordinator,
Univ. prof. PhD Valeriu V. COTEA m.c. AR**

2023

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII
„ION IONESCU DE LA BRAD” DIN IAȘI**

FACULTATEA DE HORTICULTURĂ

**ȘCOALA DOCTORALĂ ȘTIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL HORTICULTURĂ
SPECIALIZAREA VITICULTURĂ ȘI OENOLOGIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**STUDII PRIVIND INFLUENȚA DIFERITELOR SUȘE DE
LEVURI ASUPRA CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE
OBTINUTE PRIN METODA TRADIȚIONALĂ**

**Doctorand,
Ing. Mihai Cristian FOCEA**

**Conducător de doctorat
Prof. univ. dr. Valeriu V. COTEA m.c. AR**

2023

**IAȘI UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES
FACULTY OF HORTICULTURE**

**DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
HORTICULTURE DOMAIN
VITICULTURE AND OENOLOGY**

Ph.D. THESIS

**STUDIES ON THE INFLUENCE OF DIFFERENT YEAST
STRAINS ON THE QUALITY OF SPARKLING WINES
PRODUCED BY TRADITIONAL METHOD**

**PhD Student
Eng. Mihai Cristian FOCEA**

**Scientific coordinator,
Univ. prof. PhD Valeriu V. COTEA m.c. AR**

2023

CUPRINS

INTRODUCERE	17
REZUMAT	24
PARTEA I: STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII PRIVIND INFLUENȚA DIFERITELOR SUȘE DE LEVURI ASUPRA CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE	36
1. NOȚIUNI DE BAZĂ ÎN PRODUCEREA VINURILOR SPUMANTE	37
1.1. Definirea și clasificarea vinurilor efervescente	37
1.2. Etapele obținerii vinurilor spumante	37
1.2.1. Soiuri utilizate la obținerea vinurilor spumante	37
1.2.2. Procesarea strugurilor	38
1.2.3. Fermentația primară – obținerea vinului bază	39
1.2.4. Fermentația malolactică	40
1.2.5. Limpezirea și stabilizarea vinului-bază	40
1.2.6. Asamblajul vinurilor	41
1.2.7. Fermentarea secundară și maturarea în butelii	41
1.2.8. Remuajul și degorjarea	45
1.3. Metode de obținere a vinurilor spumante	45
1.4. Stadiul actual al cercetării privind selecția levurilor în tehnologia de obținere a vinurilor spumante	49
2. ASPECTE GENERALE PRIVIND CALITATEA VINURILOR SPUMANTE	56
2.1. Compoziția chimică a vinurilor spumante	56
2.2. Stadiul actual al cercetării privind implicațiile tehnologice asupra calității vinurilor spumante	61
PARTEA A II-A: CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND INFLUENȚA DIFERITELOR SUȘE DE LEVURI ASUPRA CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE OBȚINUTE PRIN METODA TRADIȚIONALĂ	64
3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI, CADRUL NATURAL, INSTITUȚIONAL ȘI ORGANIZATORIC, MATERIALELE ȘI METODE UTILIZATE	65
3.1. Scopul și obiectivele studiului	65
3.2. Cadrul natural, instituțional și organizatoric	66
3.2.1. Descrierea cadrului natural	66
3.2.2. Prezentarea cadrului instituțional și organizatoric al studiului	67
3.2. Materiale și metode utilizate	67
3.2.1. Caracterizarea soiurilor de struguri analizate	67

3.2.2. Tehnologia de obținere a probelor.....	68
3.2.3. Metode de analiză aplicate.....	73
4. REZULTATELE CERCETĂRII PRIVIND INFLUENȚA LEVURILOR ASUPRA CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE OBȚINUTE.....	78
4.1. Contribuția levurilor asupra parametrilor fizico-chimici.....	78
4.2. Influența levurilor asupra conținutului de metale din vinurile spumante.....	84
4.3. Impactul levurilor asupra conținutului în acizi organici.....	90
4.4. Influența levurilor asupra profilului de aromă al vinurilor spumante.....	95
CONCLUZII.....	109
BIBLIOGRAFIE.....	117
ANEXE.....	130
LISTA PUBLICAȚIILOR.....	131
LISTA TABELELOR.....	132
LISTA FIGURILOR.....	134

CONTENTS

INTRODUCTION.....	20
ABSTRACT.....	30
PART I: THE CURRENT STATE OF RESEARCH ON THE INFLUENCE OF DIFFERENT YEASTS ON THE QUALITY OF SPARKLING WINES	36
1. BASIC NOTIONS IN THE PRODUCTION OF SPARKLING WINES	37
1.1. Definition and classification of sparkling wines.....	37
1.2. Stages of obtaining sparkling wines.....	37
1.2.1. Varieties used to obtain sparkling wines.....	37
1.2.2. Grape processing.....	38
1.2.3. Primary fermentation – obtaining the base wine.....	39
1.2.4. Malolactic fermentation.....	40
1.2.5. Clarification and stabilization of the base wine.....	40
1.2.6. The assembly of wines.....	41
1.2.7. Secondary fermentation and maturation in the bottle.....	41
1.2.8. Remuage and disgorging.....	45
1.3. Methods of obtaining sparkling wines.....	45
1.4. The current state of research on the selection of yeasts in the technology of obtaining sparkling wines.....	49
2. GENERAL ASPECTS REGARDING THE QUALITY OF SPARKLING WINES.....	56
2.1. Chemical composition of sparkling wines.....	56
2.2. Current state of research on technological implications on sparkling wine quality.....	61
PART II: OWN CONTRIBUTIONS REGARDING THE INFLUENCE OF DIFFERENT YEASTS ON THE QUALITY OF SPARKLING WINES OBTAINED THROUGH THE TRADITIONAL METHOD.....	64
3. THE PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE STUDY, THE NATURAL, INSTITUTIONAL AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK, MATERIALS AND METHODS.....	65
3.1. Main purpose and objectives.....	65
3.2. The natural, institutional and organizational framework of research	66
3.2.1. Description of the natural setting.....	66
3.2.2. Presentation of the institutional and organizational framework.....	67
3.2. Materials and methods.....	67

3.2.1. Characterization of the analyzed grape varieties	67
3.2.2. The technology of obtaining samples	68
3.2.3. Applied analysis methods	73
4. RESEARCH RESULTS REGARDING THE INFLUENCE OF YEASTS ON THE QUALITY OF SPARKLING WINES	78
4.1. The contribution of yeasts on the physico-chemical parameters	78
4.2. The influence of yeasts on the metal content of sparkling wines	84
4.3. The impact of yeasts on the content in organic acids	90
4.4. The influence of yeasts on the aroma profile of sparkling wines	95
CONCLUSIONS	113
REFERENCES	117
APPENDICES	128
LIST OF PUBLICATIONS	129
LIST OF TABELS	133
LIST OF FIGURES	134

INTRODUCERE

Deși la început vinurile obținute în Champagne erau combinate cu cele produse în jurul Parisului și cunoscute drept „vinuri ale Franței”, mai târziu, băutura „champagne” a făcut renumită întreaga regiune (Cotea, 2005).

Arealul viticol din regiunea Montagne de Reims era dedicat culturii strugurilor negri, pe când regiunea Aÿ – celor albi. Ca și Burgundia, cele mai bune zone au fost definite de călugări în secolele XII și XVIII, când au început să cumpere soiuri de calitate superioară.

Dom Perignon (1638 – 1715), călugăr benedictin de la Mănăstirea de Haut Villers din (Epeney), a obținut pentru prima dată, în jurul anului 1670, o băutură efervescentă, denumită Champagne după numele regiunii viticole de proveniență. Aceasta prezenta o concentrație alcoolică moderată (aproximativ 10 % vol. alc.) și o presiune de 1,5 – 2 atmosfere. Dacă la începutul secolului al XIX-lea vinul roșu constituia aproximativ 90 % din totalul producției, piața vinurilor ieftine s-a prăbușit odată cu începerea primului război mondial, vinul efervescent rămânând reprezentativ pentru arealul respectiv.

Vinul spumant a fost produs inițial din struguri negri, având o culoare rosé. Dom Pérignon a pus bazele presării blânde, care permitea un contact minim al sucului cu boștina. Nu se cunosc cu exactitate soiurile cultivate în acele timpuri în regiunea Champagne însă din cele 80 de tipuri, Pinot Noir și Pinot Gris erau preponderente. Odată cu invazia filoxerei, culturile de viță de vie au fost distruse, fiind apoi replantate soiurile existente și în prezent. Inițial, băutura era obținută din șapte soiuri nobile, însă în prezent, aceasta poate fi produsă numai din soiurile Pinot noir, Pinot meunier și Chardonnay (Cotea, 2005). De asemenea, denumirea de *champagne* poate fi folosită numai în regiunea menționată.

Cea mai mare parte a vinurilor spumante este obținută dintr-un amestec de soiuri, dar un ‘*Blanc de Blancs*’ provine exclusiv din Chardonnay, pe când un ‘*Blanc de Noirs*’ provine doar din soiuri negre (de obicei doar Pinot Noir).

Producerea vinurilor spumante pe teritoriul României a început atunci când Ion Ionescu de la Brad, agronom renumit al secolului XIX, a creat această băutură pentru domnitorul Mihail Sturdza (Cotea, 2005).

Există două procese principale de producție pentru vinurile spumante de calitate: metode tradiționale și charmat. În procedura tradițională, a doua fermentație alcoolică a vinului de bază se realizează în butelii din sticlă sigilate. Unele dintre cele mai populare vinuri spumante, precum băutura *champagne* și cava, sunt produse prin metoda tradițională. Caracteristicile senzoriale și organoleptice sunt unul dintre cei mai importanți indicatori ai calității vinului spumant pentru acceptarea unui produs de către consumatori.

Vinurile spumante implică fermentarea secundară a vinurilor liniștite (*strictu sensu*). Calitatea și caracteristicile vinului spumant, gradul de stabilitate, proprietățile senzoriale sunt dependente în mare parte de compoziția fizico-chimică a strugurilor și a vinului-bază, de tehnologia de obținere aplicată, de condițiile de mediu etc. (Cotea ș.a., 2021).

În prezent, concentrația alcoolică a vinurilor este mai ridicată din cauza a numeroase variabile, în special a schimbărilor climatice (Jones ș.a., 2014; Koufos ș.a., 2013). În același timp, mulți consumatori preferă produse slab alcoolice (9 % – 13 % vol. alc.), ca o consecință a aspectelor sociale (restricții în trafic), dar și a problemelor de sănătate asociate (Labanda ș.a., 2009; Saliba ș.a., 2013). În decursul timpului, au fost aplicate mai multe tehnici pentru a produce vinuri cu o concentrație alcoolică scăzută, fie prin utilizarea mustului cu concentrații scăzute de zaharuri, a unor levuri selecționate specifice, fie prin întreruperea precoce a fermentației alcoolice (Pickering ș.a., 1998). De asemenea, pentru a obține o concentrație alcoolică prestabilită în vinuri, se pot folosi diverse practici, cum ar fi procedeele termice sau pe bază de membrane. Cu toate acestea, la utilizarea tratamentelor termice, sunt distruși compuși volatili importanți (Takacs ș.a., 2007; López ș.a., 2002). Mai multe proceduri pe bază de membrană pot fi utilizate pentru a reduce conținutul de alcool din vin (Jordão ș.a., 2015), ajutând la păstrarea caracteristicii senzoriale a vinului inițial (Pickering ș.a., 1998). Aceste proceduri (nanofiltrare, osmoză inversă) manifestă un beneficiu important, și anume consumul redus de energie atunci când se lucrează la temperaturi scăzute spre moderate. Osmoza inversă reprezintă o procedură folosită cu succes în scopul diminuării concentrației alcoolice și generează un impact negativ nesemnificativ asupra structurii și compoziției vinului (asigură stabilitatea compușii aromatici și caracteristicile senzoriale), realizându-se la temperaturi scăzute (Saha ș.a., 2013).

Producția și consumul de vin spumant sunt în tendință ascendentă în ultimul deceniu, începând să fie consumat nu doar la ocazii speciale, cât și în momente mai puțin specifice (Muñoz-Redondo ș.a., 2020). În conformitate cu metoda tradițională de obținere a vinurilor spumante, acestea sunt supuse unui proces fermentativ dublu, astfel încât după prima fermentație alcoolică și în urma adăugării amestecului de tiraj, vinurile să fie supuse celei de a doua fermentații (Coehlo ș.a., 2009).

Printre cele mai cunoscute vinuri spumante se numără Cava (produs în Spania), Espumante (Portugalia), SEKT (Austria și Germania), Pezsgo (Ungaria) și Samponseskoye (Rusia). Soiurile de struguri utilizate frecvent la obținerea vinurilor spumante la nivel global sunt: Macabeo, Parellada și Xarello (Cava), Pinot Gris, Aligote, Pinot Blanc, Grolleau, Cabernet Sauvignon sau Chenin Blanc (Butnariu, 2020).

Ca urmare a tendinței consumatorilor de a se orienta spre băuturile cu o concentrație alcoolică mai scăzută, corelată cu dorința noii generații de 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 spumate albe.** În acest sens, a fost utilizat soiul Muscat Ottonel, strugurii fiind recoltați în toamna anului 2015 din 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. **Prezenta cercetare se focusează**

pe evaluarea unor constituenți chimici (acizi organici, ioni metalici, compuși volatili) dar și a caracteristicilor senzoriale ale vinurilor spumante rezultate.

Conform rezultatelor, drojdiile pot influența variat calitatea finală a vinurilor spumante. Având în vedere caracteristicile fizico-chimice, tipul drojdiilor inoculate a arătat un impact minor, dar important asupra parametrilor fizico-chimici. Compoziția metalelor din vin în timpul fermentației, maturării și depozitării nu este stabilă. Analiza varianței evidențiază o influență semnificativă a conținutului de metale în funcție de tipul levurilor inoculate.

Rezultatele evidențiază un conținut mai ridicat în acizii organici analizați în cazul vinului bază, comparativ cu vinurile spumante obținute ulterior. Rezultatele nu au indicat diferențe majore în ceea ce privește concentrația principalilor acizi organici și valorile pH-ului. 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).

Levurile administrate pentru cea de-a doua fermentație au contribuit la creșterea semnificativă a concentrației majorității compușilor volatili ($p < 0,05$). Rezultatele obținute confirmă că ipoteza că tipul preparatului levurian contribuie semnificativ la îmbogățirea profilului volatil al vinurilor spumante. Octanoatul de etil și decanoatul de etil au fost reprezentative pentru toate probele, imprimând în general note fructate (în special banană, măr) și florale (floare de soc).

Rezultatele prezentate contribuie la completarea, îmbunătățirea și deci, îmbogățirea literaturii de specialitate în domeniul temei abordate, cât și la optimizarea tehnologiilor de vinificație existente.

Teza de doctorat a fost realizată sub conducerea domnului prof. univ. dr. Valeriu V. Cotea și constituie rezultatul muncii și dedicației disciplinei de Oenologie și Vinificație din cadrul Universității pentru Științele Vieții „Ion Ionescu de a Brad” din Iași, față de care îmi exprim deosebita considerație și le adresez mulțumiri.

De asemenea, îmi transmit recunoștința față de prof. dr. Gică Grădinaru pentru încrederea acordată și sprijinirea în parcursul meu profesional.

INTRODUCTION

Due to the high concentration of carbon dioxide, sparkling wines have always been considered "special" wines, consumed occasionally and at special events (Cotea, 2005). The moment of the first appearance of effervescent wines is not fully known, these being even mentioned in the Old Testament (Cotea, 2005). The term "Champagne" has been used since the 14th century, describing the geographical region of the same name around the city of Reims, a poor area exploited for pastures and grain cultivation. In the beginning, the wines from the Champagne region were combined with those produced around Paris and known as "wines of France". Later, the beverage named "champagne" made the whole region famous (Cotea, 2005).

The wine-growing area from the Montagne de Reims region was dedicated to the cultivation of black grapes, while the Aÿ region was to the white ones. Like Burgundy, the best areas were exploited by monks in the 12th and 18th centuries, when they began to buy higher-quality varieties.

Dom Perignon (1638 – 1715), a Benedictine monk from the Monastery of Haut Villers in (Epernay), obtained for the first time (around 1670) an effervescent beverage called Champagne, after the name of the wine region of origin. It had a moderate alcoholic concentration (about 10% vol. alc.) and pressure between 1.5 and 2 atmospheres. If at the beginning of the 19th-century red wine constituted about 90 % of the total production, the production of cheap wines collapsed with the start of the First World War, sparkling wine remaining representative of the area in question. The sparkling wine was first produced from black grapes, having a rosé color. Dom Pérignon laid the foundations for gentle pressing, which allowed minimal contact of the juice with the wort.

The varieties cultivated in those times in the Champagne region are not exactly known, but of the 80 varieties, Pinot Noir and Pinot Gris were predominant. With the invasion of phylloxera, the vines were destroyed, and the existing varieties were then replanted. Initially, champagne was obtained from seven noble varieties, but nowadays, it can only be produced from Pinot noir, Pinot meunier and Chardonnay varieties (Cotea, 2005). Also, the name champagne can only be used in the mentioned region. Most champagne is made from a mixture of varieties, but a 'Blanc de Blancs' comes exclusively from Chardonnay, while a 'Blanc de Noirs' comes from only red varieties (usually only Pinot Noir).

The production of sparkling wines in Romania began when Ion Ionescu de la Brad, a renowned agronomist of the 19th century, created this drink for ruler Mihail Sturdza (Cotea, 2005).

There are two main production processes for high-quality sparkling wines, traditional and 'Charmat' methods. In the first-mentioned, the second alcoholic fermentation of the base wine is carried out in sealed bottles. Some of the most popular sparkling wines, such as champagne and cava, are produced using the traditional method. Sensory characteristics are some of the most important indicators of sparkling wines' quality for consumer acceptance of a product. Sparkling wines involve the secondary

fermentation of still wines (*strictu sensu*) (Țârdea et al., 2010). The quality characteristics of the sparkling wine, its stability, and the sensory properties are dependent on the physical-chemical composition of the grapes and the base wine, the applied production technology, environmental conditions, etc. (Cotea et al., 2021).

Currently, the alcoholic strength of wines is higher due to numerous variables, including climate change (Jones et al., 2014; Koufos et al., 2013). At the same time, many consumers want to consume low-alcohol products (9-13% volume alcohol), as a consequence of social aspects (such as traffic restrictions), but also of associated health problems (Labanda et al., 2009; Saliba et al., 2013). Over time, different techniques have been developed to produce low-alcoholic wines (by using grape juice with low sugar levels, by administrating specially selected yeasts, or by early stopping fermentation) (Pickering et al., 1998). The use of thermal or membrane-based processes can also be efficient to achieve a predetermined alcoholic concentration in wines. However, when using thermic treatments, numerous important volatile compounds are affected (Takacs et al., 2007; López et al., 2002; Jordao et al., 2015). The membrane-based procedures (nanofiltration, reverse osmosis) show important benefits, namely reduced energy consumption when working at low to moderate temperatures and assure to preserve the sensory characteristic of the wine (Pickering et al., 1998). Reverse osmosis is a procedure successfully used to reduce the alcohol concentration and generates an insignificant negative impact on the structure and composition of the wine (it ensures the stability of the volatile compounds and the organoleptic properties), being carried out at low temperatures (Saha et al., 2013).

Both the production and consumption of sparkling wine are on an ascendent trend in the last decade, beginning to be consumed not only on special occasions, but also in less specific moments (Muñoz-Redondo et al., 2020). According to the traditional method, they are subjected to a double fermentation process, so that after the first alcoholic fermentation and following the addition of the 'tirage' liqueur, the wines are subjected to the second fermentation (Coehlo et al., 2009).

Among the most famous sparkling wines are Cava (produced in Spain), Espumante (Portugal), Sekt (Austria and Germany), Pezsgo (Hungary) and Samponseskoye (Russia). The grape varieties frequently used to obtain sparkling wines globally are: Macabeo, Parellada and Xarello (Cava), Pinot Gris, Aligote, Pinot Blanc, Grolleau, Cabernet Sauvignon or Chenin Blanc (Butnariu, 2020).

As a consequence of consumers trend to consume lower alcohol beverages, correlated with the request of the new generation for different organoleptic sensations, the doctoral thesis intitulated "Studies on the influence of different yeast strains on the quality of sparkling wines produced by traditional method" aims to study the influence of different yeasts (*Saccharomyces* spp.) on the quality of white sparkling wines. For this experiment, Muscat Ottonel grapes from the Iași - Copou vineyard were used. The grapes were harvested at full ripeness in the autumn of 2015. The different yeast preparations were inoculated at the second fermentation of the base wine. The experimental samples

and laboratory analyzes were carried out in the experimental winery and the Oenology Laboratory of the Faculty of Horticulture, "Ion Ionescu de a Brad" University of Life Sciences in Iași. The present research focuses on the evaluation of general physicochemical parameters of the resulting samples and of some chemical constituents (organic acids, metal ions, volatile compounds). The results were completed with a sensory description of the samples and a statistical representation of the data.

According to the results, the type of inoculated yeasts significantly influences the final quality of the base wine. Thus, V3 and V4 variants presented the lowest values for the volatile acidity and total sulfur dioxide.

The yeasts inoculated for the second fermentation of the base wine contributed to a significant increase in the concentration of most volatile compounds ($p < 0.05$) in the final samples (sparkling wine). The results confirm the hypothesis that the type of yeast preparation contributes significantly to the enrichment of the volatile profile of the analyzed sparkling wines. V1 variant shows the highest concentrations of most volatile compounds, while V2 and V3 presented the smallest quantities. Following the organoleptic evaluation, important differences can be observed between the analyzed variants. Ethyl octanoate and ethyl decanoate were representatives for all samples, being responsible for their fruity (especially banana, and apples) and floral (elderflower) notes. The presented results contribute to the improvement, and enrichment of the specialized literature regarding the addressed subject, as well as to the optimization of the existing winemaking technologies.

According to the results, yeasts can influence the final quality of sparkling wines in various ways. Considering the physico-chemical characteristics, the type of inoculated yeasts has a minor but important impact on the physico-chemical parameters. The composition of metals in wine during fermentation, maturation and storage is not stable. The analysis of variance reveals a significant influence of the metal content according to the type of inoculated yeasts.

The results highlight a higher content in the analyzed organic acids in the case of the base wine, compared to the sparkling wines. The results did not indicate major differences in the concentration of the main organic acids and the pH values. In a first stage, the concentration of organic acids showed minor variations in relation to the type of inoculated yeasts for the second fermentation ($p > 0.05$). Significant changes were obtained between the two analysis phases (6 and 11 months of storage).

The yeasts administered for the second fermentation contributed to a significant increase in the concentration of most volatile compounds ($p < 0.05$). The assured results confirm the hypothesis that the type of yeast preparation contributes significantly to the enrichment of the volatile profile of sparkling wines. Ethyl octanoate and ethyl decanoate were representative of all samples, generally imprinting fruity (especially banana, apple) and floral (elder flower) notes.

The presented results contribute to the completion, development and thus, enrichment of the specialized literature in the field of the addressed theme, as well as to the optimization of the existing winemaking technologies.

The doctoral thesis was completed under the supervision of Prof. Univ. Dr. Valeriu V. Cotea, being the result of the work and dedication of the members of Oenology section from "Ion Ionescu de a Brad" Iași University of Life Sciences, to whom I express my special consideration and thank them.

I would also like to express my gratitude to Prof. Dr. Gică Grădinaru for his trust and support in my professional career.

REZUMAT

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 caracteristicile 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-V2 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, alcooli 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 esterii 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 la imprimarea unei arome fructate și conferă complexitate vinurilor albe (Vigentini ș.a., 2017). Concentrațiile sale au variat de la 11,71 μg/L în proba V2 la 22,78 μg /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-feniletil (aromă de trandafir) pot prezenta efect sinergic, chiar și la niveluri reduse. Valorile acetatului de 2-feniletil raportate de Torchio ș.a. (2012) au fost comparabile cu rezultatele obținute în cadrul prezentului experiment (22,33 μg/L până la 47,72 μg/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 μg/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 μg /L în varianta V1, la 258,79 μg /L în proba V2. Acidul decanoic a atins o concentrație maximă în proba V1 (145,25 μg/L) și o valoare minimă în proba V2 (11,36 μg/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; Caliri ș.a., 2015). În ceea ce privește nivelul de alcoolii, alcoolul izoamilic, 4-octanolul, 1-heptanolul și 2-feniletilul 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 μg/L alcool izoamilic în proba V3, la 485,91 μg/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 feniletilic, 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 diferențe 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 efervescentei. Capacitatea vinurilor spumante de a produce spumă, cât și gradul de efervență 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 efervență. Intensitatea gustului dulce este mai mică cu cât gradul de efervență 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 efervență 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.

ABSTRACT

Sparkling wines are characterized by high concentrations of carbon dioxide, being considered *special wines*. In accordance with the traditional method of obtaining sparkling wines, they are subjected to a double fermentation process, thus after the first alcoholic fermentation and following the addition of the *tiraje liqueur*, the wines are subjected to the second fermentation (Coehlo et al., 2009). There are many factors involved in the chemical composition of sparkling wines, such as variety, cultivation technology, quality of the base wine, type of inoculated yeasts for secondary fermentation, etc. However, the second fermentation and the aging stage on yeast sediment are key factors on the final quality of sparkling wines (Pozo-Bayón et al., 2009). Correlated with the new generation's desire for different organoleptic sensations, the doctoral thesis entitled „*Studies on the influence of different yeast strains on the quality of sparkling wines produced by traditional method*” aims to study the influence of yeasts (*Saccharomyces* spp.) (used in the second fermentation) on the quality of white sparkling wines. The present research focuses on the evaluation of some chemical constituents (organic acids, metals, volatile compounds), but also on the evaluation of the sensory profile of the obtained sparkling wines. To fulfil the general purpose, the experimental protocol assumed the establishment of the following specific objectives: studying the specialized literature and selecting a relevant database; establishing the experimental protocol and activities; realization of experimental variants; analysis of the general physicochemical properties of the obtained samples; evaluating the level of metals in sparkling wines; analysing the content of organic acids; determining of the main volatile compounds in the final samples; studying the sensory characteristics of the analysed variants; statistical interpretation of the data and their comparison with the results from the specialized literature.

For obtaining the experimental sparkling wines, Muscat Ottonel grapes, cultivated in the Iasi-Copou Vineyard were used. The experimental samples and laboratory analyses were carried out in the experimental winery and the Oenology Laboratory of the Faculty of Horticulture, "Ion Ionescu de a Brad" Iasi University of Life Sciences. Thus, five experimental variants were made. The grapes were manually harvested at full maturity in the autumn of 2015. In order to carry out the alcoholic fermentation, various yeasts belonging to the *Saccharomyces* species were inoculated. The fermentation process took place under temperature-controlled conditions (20 °C). The fermentation process took place under temperature-controlled conditions (20 °C). After the completion of the primary fermentation, the initially wine (V0) showed an alcoholic strength of 12.5% alc vol. To reduce this level and obtain a predetermined alcoholic concentration (10.5% vol.), reverse osmosis was applied (resulting in V0'). Secondary fermentation took place in bottles, being inoculated with different commercial yeasts, as follows: IOC FIZZ™ - V1; IOC DIVINE™ - V2; LEVULIA CRISTAL™ - V3; IOC 18-2007™ - V4. The results of the physicochemical analyses of the analysed sparkling wines fall within the limits allowed by the norms of the International Organization of Vine and Wine (OIV, 2020).

Given that the same base wine was used to obtain them, the possible differences are attributed to the inoculation of different types of yeasts in order to carry out the secondary fermentation. Minor changes were observed in the main physicochemical parameters analyzed at 11 months after the production of the samples, compared to the results recorded at 6 months. Depending on the level of residual sugars, the experimental samples can be classified as brut sparkling wines. The alcoholic concentration of the analysed sparkling wines varied from 11.3 % vol (V2 and V4) to 11.6 % volume (V1 and V3). Parameters such as density, total acidity, residual sugars and non-reducing extract have dependent values with important differences between samples. Analysis of variance indicated significant differences between the physicochemical characteristics of the control sample and those containing yeasts ($p < 0.001$ for most parameters). The values were also influenced by the type of inoculated yeasts ($p < 0.001$ for most pairs of media, $p < 0.05$ for volatile acidity in both periods of analysis, non-significant differences for density). The Tukey HSD post-hoc test highlights the pairs of variants that significantly differed for each individual physicochemical indicator. Thus, in the case of density, the differences concerned the control sample (V0) compared to the variants V1, V2, V3 and V4, which contained yeasts. Also, a minor influence on the physicochemical quality is observed in the samples in which yeasts were inoculated.

The metal ion profile of sparkling wines plays an important role in modulating their sensory attributes. The metal composition of wine during fermentation, maturation and storage is not stable. The amount of potassium and calcium increases during storage (from 6 to 11 months), while the level of magnesium and sodium ions decreases considerably during the storage period. During fermentation, yeasts consume significant amounts of metal ions such as calcium, copper, iron, potassium and magnesium (Cotea, 2009). Also, following the sedimentation and yeast removal processes, important amounts of the analysed metal ions are removed. However, higher concentrations of some compounds were identified in the samples in which yeasts were inoculated for the second fermentation. In addition, comparing the concentrations of iron, copper, nickel and manganese in samples V1-V4, an upward dynamic is observed during the storage-ripening period. This phenomenon could suggest the susceptibility of the wine samples to the occurrence of turbidity or sedimentation, as well as the deterioration of the sensory quality, correlated with the catalytic and oxidative action of the studied cations (especially iron and copper). According to Galani-Nikolakaki et al. (2002), the main source of iron contamination is soil, as well as utensils and machinery used during production and processing. The analysis of variance reveals a significant influence of the metal content according to the type of inoculated yeasts. Also, the post-hoc test indicates the pairs of means between which there are significant differences (generally, $p < 0.01$, at least two means being significantly different at the 99 % significance level, regardless of the analysing moment).

The organic acids in the wine come mainly from the raw material, from the administered treatments or they can result from the metabolic processes of the microorganisms. An optimal level of organic acids ensures the balanced, fresh and

refreshing character of the wines, while high levels will impress intensely sour taste. The results highlight a higher content in the analysed organic acids in the case of the base wine, compared to the sparkling wines. Both malic acid and tartaric acid represent approximately 90 % of the total organic acids in wine (Robles et al., 2019). The analysed samples showed values between 6.33 g/L (V1) and 6.46 g/L (V2) malic acid after 6 months of storage and between 5.61 g/L (V3') and 6, 63 g/L (V2') after 12 months. An increasing trend of malic acid concentration was noted between 6 and 12 months of storage of most varieties, except for sample V3, where the content of this acid registered important decreases over time. After malic acid, the most abundant acid was tartaric acid, with an average concentration ranging from 0.99 to 5.97 g/L. Tartaric acid values remain almost constant between the two moments of analysis (6 months and 11 months), registering a slight decrease in the case of the V3 variant and an increase in the case of the V4 variant. Along with the first two acids presented, citric acid contributes significantly to defining the colour and stability of sparkling wines. A higher amount of citric acid allows the detection of counterfeiting (Ivanova-Petropulos et al., 2020). Values ranged from 0.58 g/L (V1 and V3) – 0.61 g/L (V4) at 6 months and 0.51 g/L (V3 and V4) – 0.59 g/L (V1) at 11 months. Lactic acid concentrations varied with yeast activity, usually being formed from the breakdown of malic acid. The highest values of this compound were determined in samples V1 (0.42 g/L) and V4 (0.40 g/L) after 6 months of storage, going on to register important accumulations up to 12 months. Succinic acid is formed early in fermentation depending on the inoculated yeast strain and varies with nitrogen composition (Waterhouse et al., 2016). Regarding the samples analysed in the first stage, the highest succinic acid content was identified in V3 and V4 samples (0.31 g/L), followed by V2 (0.20 g/L) and V1 (with 0.18 g/L), in the base wine finding values 8 - 10 times higher. The succinic acid content increased during storage in all variants. In a first stage, the concentration of organic acids showed minor variations in relation to the type of yeasts inoculated for the second fermentation ($p > 0.05$). Significant changes were obtained between the two analysis points (6 and 11 months of storage). For example, in the case of malic acid, post-hoc analysis revealed significant differences ($p < 0.05$) between sample means V1-V2, V1-V4, and V2-V3 for determinations made 6 months after storage. Further, analyzes at 12 months showed significant differences ($p < 0.01$) between the V1-V2, V1-V3, V2-V3 and V3-V4 groups.

The aroma profile is a major factor that determines the character and quality of the sparkling wine, but also its acceptability and competitiveness in the market. Complexity of the aroma profile during fermentation increases significantly due to the synthesis of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Yeasts play an important role in defining the characteristics of sparkling wine, including alcohol concentration, carbon dioxide overpressure, the presence of mannoproteins and precursors to various aroma compounds. Quantified volatile compounds (represented by esters, acids, alcohols and terpenes) were separated into their chemical classes. Esters contribute to the sensory characteristics of wines, being mainly responsible for floral and fruity notes. Of these, compounds such as ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl laureate, isopropyl myristate,

ethyl palmitate and ethyl oleate were identified by gas chromatography analysis. According to Muñoz-Redondo et al. (2020), several esters are considered markers of the second fermentation. Isoamyl acetate is usually derived from yeast metabolism during alcoholic fermentation. This compound contributes to the fruity aroma and gives complexity to white wines (Vigentini et al., 2017). Its concentrations ranged from 11.71 µg/L in V2 sample to 22.78 µg/L in V4 sample. 2-Phenethyl acetate is generally produced by phenolic precursor yeasts during the ripening stage and is characterized by sweet notes of honey and flowers. The highest level of this compound was identified in samples V1 and V3, while the lowest concentration was recorded in the case of variant V2. According to Genovese et al. (2013), ethyl decanoate (floral odor) and 2-phenylethyl acetate (rose aroma) may exhibit synergistic effect, even at low levels. The values of 2-phenylethyl acetate reported by Torchio et al. (2012) were comparable to the results obtained in the present experiment (22.33 to 47.72 µg/L). Diethyl succinate is usually formed during alcoholic fermentation. Sample V2 displayed the highest level of this compound (62.58 µg/L). According to Torrens et al. (2008) and Riu-Aumatell et al. (2006), diethyl succinate represents one of the esters specific to the maturation period. Their proportions can indicate significant increases during the second fermentation, as a result of contact with yeast cells. Acids can come from the raw material grapes, but they can also result from chemical reactions carried out during alcoholic fermentation. The high concentrations of decanoic acid, in conjunction with the high values of octanoic acid, determine a lasting inhibitory effect on the growth and development of yeasts (Riu-Aumatell et al., 2006; Delfini et al., 2001). In the analysed samples, the content of octanoic acid varied from 580.64 µg/L in the V1 variant to 258.79 µg/L in the V2 sample. Decanoic acid reached a maximum concentration in V1 sample (145.25 µg/L) and a minimum value in sample V2 (11.36 µg/L). Alcohols represent secondary aromatic components derived from the transformation of sugars and amino acids during the fermentation process, with a significant influence on the sensory profile of the wine (Nascimento et al., 2018; Caliarì et al., 2015). Regarding the level of alcohols, isoamyl alcohol, 4-octanol, 1-heptanol and 2-phenylethyl were representative in the analysed samples. Isoamyl alcohol generally represents more than 50 % of the alcohols responsible for the fusel note (Ribéreau-Gayon et al., 2004). The experimental samples presented amounts from 1019.50 µg/L of isoamyl alcohol in the V3 sample, to 485.91 µg/L in the case of the V2 variant. 1-heptanol was identified in large quantities in the V2 variant, providing a pleasant vegetal odour and fruity notes (apples and bananas). Phenylethyl alcohol, a volatile compound with a pleasant sweet, floral and honey-like odour, was detected in all analysed samples. Higher amounts of this compound were identified in samples V1 (1150.12 µg/L) and V4 (683.46 µg/L).

Terpenes are secondary metabolites that come from grapes. Of these, L-linalool gives a fresh, spicy, floral aroma in wines, with hints of lemon. V1 presented the highest level of L-linalool (138.86 µg/L), followed by V3 (120.43 µg/L, V4 (44.31 µg/L) and V2 (16.65 µg/L). This compound is transformed by the action of acids into geraniol, nerol and terpineol, respectively (Lengyel, 2012). Of these, terpineol contributes to the definition of

the fruity (melon) and floral (lilac) odour. The compound consists of monoterpene-glycosides in an acidic environment (Strauss, 1986). Following analysis by gas chromatography, the highest concentration was identified in V1 (42.79 µg/L), followed by variants V3 (41.40 µg/L), V2 (28.19 µg/L) and V4 (24.19 µg/L). This compound may originate from grapes (in low concentrations) and exhibits high olfactory perception (Lengyel, 2012). The data revealed a significant positive impact on the volatile profile following yeast supplementation. It is noted that the yeasts inoculated in samples V1 and V3 showed the greatest influence on most of the studied volatile compounds ($p < 0.05$). The null hypothesis that yeasts would not affect the volatile profile of sparkling wines is thus rejected. Regarding the results of the Tukey HSD (honest significant differences) test for differences between the various pairs of samples, significant results can be observed between V1 and V3 in the case of 1-heptanol and terpineol. Significant differences between V2 and V4 samples were obtained, regarding butyric acid, linalool and terpineol. In the case of diethyl succinate and decanoic acid, significant difference was obtained between variants V3 and V4 ($p < 0.05$). The principal component analysis describes the variations in the composition of volatile compounds of sparkling wines produced under the influence of different strains of commercial yeasts. The first factor described 59.82 % of the data variability and was closely correlated with most of the volatile compounds identified (ethyl octanoate and decanoate, 2-phenethyl acetate, ethyl laurate, hexanoic, octanoic, decanoic and 9-decenoic acid, alcohol isoamyl, 4-octanol, phenylethyl alcohol, linalool L and α -terpineol). Therefore, these components show high correlation with most of the volatile compounds identified in the analyzed samples. The first two principal components accounted for approximately 85% of the total variability in the data. The first principal component that explained most of the total variability in the data (59.82 %) was highly correlated with isoamyl acetate, ethyl decanoate, ethyl laurate, isoamyl alcohol and linalool (in all cases showed higher factor loadings greater than 0.90). For the second main component, diethyl succinate and isopropyl myristate showed high and positive values. The principal component analysis plots show a positive correlation of 1-heptanol with butyric acid (r close to +1) but a negative correlation with isopropyl myristate (r close to -1). In addition, linalool and ethyl decanoate are positively correlated, while linalool and butyric acid show a negative correlation. Ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl alcohol, the most widespread volatile substances in the analyzed samples, are also positively correlated. On the other hand, they are negatively correlated with butyric acid and 1-heptanol (positioned in the opposite direction). The variables related to the factor 1 allow the differentiation of the samples according to the volatile fraction. Since one of the aims of the experiment was to evaluate the influence of the inoculated yeasts on the volatile fraction of the experimental sparkling wines, the data confirm that different preparations can generate different concentrations of volatile compounds.

From a sensory point of view, the analysed sparkling wines are defined by intensely fruity (bananas, apples) and floral (elder flowers) notes, associated with high levels of esters (e.g. ethyl octanoate and ethyl decanoate). From the point of view of the concentration in which they are found, compounds such as isoamyl acetate, ethyl

palmitate, 4-octanol or 1-heptanol did not show a significant contribution to the highlighted sensory profile. According to the sensory analysis, all the sparkling wines obtained were characterized as balanced from a taste point of view, with increased persistence, high acidity (which impressed freshness) and good texture (especially sample V4). The V1 variant was noted for its floral notes (elder flowers), while the fruity character was predominant in the V2 (especially green bananas). The samples also differed in terms of effervescence. The ability of sparkling wines to produce foam, as well as their degree of effervescence, depends on its composition and the applied production technology. Sample V1 received the highest score for this descriptor, while V4 presented the lowest effervescence. The intensity of the sweet taste is lower the higher the degree of effervescence was perceived. Regarding the correlation between volatile compounds and sensory perception, the fruity notes (apples, green bananas, peaches) of the experimental samples can be explained by the presence of large amounts of ethyl octanoate, ethyl decanoate or diethyl succinate. The floral smell is mainly due to high concentrations of phenylethyl alcohol. The samples were perceived to be balanced from a taste point of view. A significant influence of the yeasts on the final sensory profile was noted, with the control sample showing the lowest scores for most of the descriptors followed. V4 variant stood out with high acidity and effervescence, good texture (highest note) and increased persistence. The sample rated V2 was appreciated for intensely fruity notes (apples, melon), while the V3 variant stood out for its vegetal, yeasty, but also apple character.

The results showed a minor influence of yeasts on the physicochemical properties of sparkling wines, but an essential impact on the content of volatile compounds and their sensory characteristics. Also, the profile of organic acids and metals was greatly influenced by the type of inoculated yeasts. The data contribute to the completion, improvement and enrichment of the specialized literature in the field of the topic addressed, as well as to the optimization of existing winemaking technologies.

**PARTEA I: STADIUL ACTUAL AL CERCETĂRII PRIVIND
INFLUENȚA DIFERITELOR SUȘE DE LEVURI ASUPRA
CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE**

**PART I: THE CURRENT STATE OF RESEARCH ON THE
INFLUENCE OF DIFFERENT YEASTS ON THE QUALITY OF
SPARKLING WINES**

1. NOȚIUNI DE BAZĂ ÎN PRODUCEREA VINURILOR SPUMANTE

1. BASIC NOTIONS IN THE PRODUCTION OF SPARKLING WINES

1.1. Definirea și clasificarea vinurilor efervescente

Vinurile efervescente se caracterizează prin concentrații ridicate de dioxid de carbon, fiind considerate *vinuri speciale*. Clasificarea acestor băuturi se face în funcție de tipul și natura gazului carbonic, dar și de nivelul presiunii din butelie.

Astfel, în raport cu natura și proveniența gazului carbonic, se cunosc următoarele categorii:

- *de origine endogenă*: vinuri spumante și vinuri petiante;
- *de origine exogenă* (total sau partial exogenă): vinuri spumoase și perlante;

În funcție de presiunea din interiorul buteliei, cu întâlnesc:

- *vinuri cu presiune relativă ridicată* (minimum 3 bari): vinuri spumante și spumoase;
- *cu presiune relative joasă* (cu valori între 1 și 2,5 bari): vinuri petiante și perlante.

Dintre acestea, vinul spumant se obține prin fermentația secundară a unui vin-bază, dioxidul de carbon fiind numai de origine endogenă. În general, este comercializat cu o suprapresiune de peste 3 bari, la 20 °C.

În comparație cu vinurile spumante, cele petiante prezintă de regulă o suprapresiune de 1 – 2,5 bari la 20 °C și o concentrație alcoolică de minimum 6 % vol.

Vinurile spumoase prezintă o suprapresiune de peste 3 bari la 20 °C, însă dioxidul de carbon este de origine exogenă sau partial exogenă. Acestea se caracterizează printr-o concentrație alcoolică de minimum 9 % vol. (Cotea, 2005).

1.2. Etapele obținerii vinurilor spumante

1.2.1. Soiuri utilizate la obținerea vinurilor spumante

Soiurile de struguri folosite la fabricarea vinurilor albe spumante pot fi ori albe, ori roșii. Când se folosesc soiuri roșii, acestea sunt vinificate ca vin alb, generând vinuri cunoscute sub numele de *blanc de noir*. Evident, selecția soiului trebuie făcută ținând cont de condițiile pedo-climatice ale regiunii, de productivitatea viței de vie și de caracterul distinctiv dorit al unui vin.

Vinurile spumante existente folosesc în principal următoarele soiuri: Champagne - Chardonnay, Pinot noir și Pinot meunier; Cava - Macabeo, Xarel lo, Parellada și

Chardonnay; Talento - Chardonnay, Pinot nero și Pinot bianco; Asti - Muscato bianco; Lambrusco - Lambrusco bianco și Lambrusco nero; Pinotage - o încrucișare între Pinot noir și Cinsault; Sekt - Riesling, Silvaner, Pinot blanc, Pinot noir și Pinot gris. Diferitele clone pot influența și calitatea vinurilor spumante. De exemplu, clona Chardonnay, VCR10, este recomandată pentru producția de vin-bază pentru Cava. Oferă o aciditate ridicată, potrivită în special pentru producția de vinuri spumante. De la criza filoxerei (sfârșitul secolului al XIX-lea și începutul secolului al XX-lea), noi portaltoi au apărut dintr-o încrucișare de tulpini franceze și americane. Au fost selectați pentru adaptarea la condițiile de sol și soiurile europene. De exemplu, 41B este adaptat solurilor cretacice și continuă să fie cel mai frecvent utilizat în Champagne. SO4 este adaptat solurilor moderat calcaroase, iar 3309C este tulpina de alegere pentru solurile slab calcaroase (Gougeon ș.a., 2002; Gougeon ș.a., 2003a; Gougeon ș.a., 2003b).

1.2.2. Procesarea strugurilor

Pentru a obține musturi de înaltă calitate se impune necesitatea unor condiții adecvate de recoltare și prelucrare a strugurilor. Procesul de recoltare este extrem de important când vine vorba de calitate. Se impune astfel recoltarea manuală a strugurilor și colectarea în găleți sau lăzi de mici dimensiuni pentru a se evita zdrobirea boabelor. Fructele sunt transportate imediat în vederea procesării rapide a acestora, evitându-se astfel instalarea unor procese fermentative. De asemenea, se are în vedere sortarea ciorchinilor afectați de putregaiul cenușiu (*Botrytis cinerea* spp.) care pot afecta capacitatea de spumare.



Figura 1.1: Recoltarea manuală a strugurilor și condiționarea acestora

Figure 1.1: Manual grape harvesting and conditioning

(www.bellwine.com)

Astfel, strugurii sunt imediat presați ușor, fără a fi zdrobiți anterior, cu presiuni cuprinse între 1,5 și 2 bari (pentru a se evita oxidarea). În continuare, are loc macerarea (pentru extracția compușilor de aromă și culoare) iar procesul continuă cu extracția și sulfitearea mustului (pentru a evita declanșarea fermentațiilor spontane), în doze de la 3 g/hL până la 8 g/hL (în funcție de fracția de presare și de starea de sănătate a recoltei). Se

are în vedere limpezirea cu enzime pectolitice și inocularea culturilor starter de *Saccharomyces cerevisiae*. Musturile care prezintă valori ale turbidității de 200 NTU până la 400 NTU sunt limpezite prin centrifugare sau decantare statică, se elimină burbă (18 - 24 ore la temperaturi cuprinse între 6 °C și 15 °C) și se administrează agenți de finisare (bentonită sau cazeină). În timpul depunerii statice, unele proteine din must, pectina împreună cu cationii minerali și substanțele fenolice sunt îndepărtate (Gougeon ș.a., 2002; Gougeon ș.a., 2003a; Gougeon ș.a., 2003b).

Mustul este supus în continuare procesului de fermentare în vederea obținerii unui vin-bază, cu conținut redus de alcool (DiGianvito ș.a., 2019; Garofalo ș.a., 2016; Perpetuini ș.a., 2016; Capozzi ș.a., 2022).

1.2.3. Fermentația primară – obținerea vinului bază

Tehnologia de obținere a vinurilor spumante implică realizarea mai întâi a unui vin bază, după care se inițiază cea doua fermentație în butelie (*Prise de mousse*). Odată cu limpezirea musturilor, fermentația alcoolică are loc după inoculare (aproximativ 10-15 g/hL) cu tulpini selecționate de *Saccharomyces cerevisiae* cv *bayanus*.

Din punct de vedere biochimic, fermentația alcoolică constă în transformarea anaerobă a zaharurilor (în principal a glucozei și fructozei) sub acțiunea levurilor, în alcool etilic, dioxid de carbon și alți produși secundari. Cu toate acestea, mustul de struguri este un substrat nesteril care conține mai multe tipuri de drojdii și bacterii care pot crește și, în consecință, pot afecta compoziția și calitatea finală a vinului. Prezența diferitelor levuri în must depinde de mai mulți factori, cum ar fi soiul de struguri utilizat, gradul de maturare al fructelor, administrarea tratamentelor cu pesticide, gradul de dezvoltare a ciupercilor, condițiile climatice, dar și practicile viticole aplicate (González-Royo ș.a., 2014).

Fermentația alcoolică are loc de obicei în rezervoare din oțel inoxidabil, la temperaturi cuprinse între 15 °C și 20 °C (procesul fermentativ se desfășoară uneori la temperaturi mai scăzute de 13 °C). Pentru uniformizarea și deschiderea culorii vinurilor se poate folosi cărbune, însă acesta afectează capacitatea de spumare și proprietățile senzoriale ale produsului final (Palacios, Vasserot și Maujean, 1997; Vasserot, Steinmets și Jeandet, 2003).

Odată cu înaintarea fermentației alcoolice primare, se formează cantități ridicate de alcooli. Influența etanolului asupra drojdiei a fost studiat pe larg de diferiți autori (Aguilera ș.a., 2006; Bauer și Pretorius, 2000). În general, toleranța la etanol este asociată cu un grad mai mare de nesaturare a membranei, în prezența oxigenului fiind sintetizați acizi grași nesaturați și steroli (Arneborg ș.a., 1995; Borrull ș.a., 2015; Valero ș.a., 2001).

După alte tratamente chimico-fizice de limpezire, decantare și filtrare a vinului-bază, urmează îmbutelierea acestuia. Vinurile-bază pentru spumante vor avea în general o concentrație alcoolică cu 10 % – 11 % vol. alc., proporții reduse de zaharuri remanente și aciditate volatilă mică. De cealaltă parte, nivelul acizilor organici va fi ridicat, prezentând

astfel aciditate totală crescută (între 12 g/L și 18 g/L acid tartric) (Cebollero și Gonzalez, 2006). Nivelul acidității vinului-bază constituie un factor cheie asupra calității vinului spumant, înregistrându-se diminuări ale valorii acesteia în timpul procesului de producție (degradarea de către levuri și bacterii lactice, precipitarea bitartratului de potasiu) (Ribéreau-Gayon ș.a., 2004).

1.2.4. Fermentația malolactică

Fermentarea malolactică a vinurilor-bază este utilizată pe scară largă la producerea vinurilor spumante, conducând la o creștere a acidității volatile. Conversia acidul malic - dicarboxilic, în acid lactic - monocarboxilic, și dioxid de carbon de către bacteriile acidului lactic scade aciditatea vinului și crește pH-ul acestuia. Această fermentație este importantă în vinurile sunt produse din struguri cultivați în climate răcoroase, care au adesea un conținut ridicat de acizi organici (acid tartric și malic) și pH scăzut. În plus, fermentația malolactică asigură stabilitate din punct de vedere microbiologic. În timpul acestui proces fermentativ se formează diacetil și lactat de etil, care imprimă note de unt.

Fermentația malolactică ar trebui să aibă loc înainte de îmbuteliere pentru a preveni apariția ulterioară a bacteriilor responsabile de producerea unor depuneri nedorite. Fermentația malolactică se realizează prin inocularea bacteriilor lactice (*Oenococcus oeni*). Unii producători nu practică acest tip de fermentație și preferă să păstreze prospețimea și notele fructate ale vinului, motiv pentru care adminstrează cantități mai mari de SO₂ (8 g/hL până la 10 g/hL) (Marchal ș.a., 2002a; Marchal ș.a., 2002b). Dificultățile de a induce fermentația malolactică sunt de obicei atribuite efectelor inhibitoare cumulative ale pH-ului scăzut, conținutului ridicat de alcool și de SO₂ al vinurilor. Cu toate acestea, aceste dificultăți ar putea avea ca origine și deficiența sau dezechilibrul vinurilor spumante în unele substanțe nutritive (aminoacizi liberi) (Tracey și Britz, 1989; Jeandet ș.a., 2021).

1.2.5. Limpezirea și stabilizarea vinului-bază

După finalizarea fermentației malolactice, vinurile sunt supuse unor tratamente de limpezire (decantare statică și sedimentare sau centrifugare, limpezire prin administrarea de bentonită, gelatină, tanin sau silicagel, cărbune etc.) (Marchal ș.a., 2000; Jeandet ș.a., 2021).

Limpezirea spontană se face prin menținerea vinului în vasele de fermentare o perioadă îndelungată, decantarea și sedimentarea depozitului de drojdie, urmată de separarea vinului de acesta. Limpezirea prin sedimentare poate fi facilitată prin centrifugare. Utilizarea centrifugării poate înlocui operația de filtrare cu plăci de finisare sau cu diatomit.

Limpezirea vinului-bază prin administrarea tratamentelor de cleire se referă la administrarea unor produse precum cleiuri proteice (gelatină, cazeină) și tanin. De asemenea, administrarea bentonitei se face în vederea prevenirii casării proteice și cuproase, însă aceasta poate influența negativ capacitatea de formare a spumei.

Pe lângă cele menționate, limpezirea mai poate fi accelerată și prin administrarea de poliacrilamide, algi-nați, ferocianură de potasiu (pentru vinurile cu exces de fier și cupru), poliamide sintetice (polivinilpirolidona, polivinilpolipirrolidona – pentru eliminarea compușilor susceptibili la oxidare), cărbune (pentru îmbunătățirea culorii), acid silicic (înlocuitor de tanin) etc.

Limpezirea vinului prin filtrare este utilizată adesea ca un proces complementar cleirii, cât și pentru finisarea vinurilor (Cotea, 2005).

Administrarea de dioxid de sulf asigură protecție împotriva oxidărilor. Pentru obținerea vinurilor spumante, se are în vedere o sulfitare redusă, pentru a inhiba pornirea în fermentație.

Stabilizarea față de precipitărire tartrice se face frecvent prin refrigerare - menținerea buteliilor la o temperatură de -4 °C - sau prin administrarea de agenți inhibitori ai cristalizării tartratului acid de potasiu (acidul metatartric sau carboximetilceluloza). De asemenea, se poate utiliza tratamentul cu schimbători de ioni și electro-dializa. Aceste tratamente se vor realiza numai după realizarea asamblajului (Cotea, 2005).

1.2.6. Asamblajul vinurilor

Practica amestecării vinurilor din diferite soiuri de struguri, origini diferite și ani diferiți (vinuri de rezervă) este importantă pentru menținerea calității vinurilor spumante. Vinurile de rezervă se păstrează doi-trei ani, (uneori pe drojdie) în rezervoare la 12 °C - 13 °C și ferite de oxigen; vinurile de rezervă pot fi păstrate și pentru o perioadă mai lungă de timp (până la zece ani) (Jeandet ș.a., 2021). Scopul etapei de asamblare vizează obținerea unui vin-bază cu proprietăți fizico-chimice bine definite și caracteristici senzoriale echilibrate. Aprecierea calității amestecului realizat se face în principal prin evaluare senzorială (Cotea, 2005).

1.2.7. Fermentarea secundară și maturarea în butelii

Fermentarea secundară în butelie (*prize de mousse*) poate avea loc prin adăugarea de lichior de *tirage*, fiind reprezentat de un amestec de zaharoză (18-25 g/L în funcție de concentrația de CO₂ dorită) și levuri, fosfați de diamoniu și adjuvanți (bentonită, alginat). Levurile folosite trebuie să permită fermentarea la temperaturi mai scăzute și în prezenta alcoolului format în fermentația primară. Vinul de bază utilizat la refermentare trebuie să aibă caracteristici specifice, cum ar fi culoare deschisă, aromă fructată, zaharuri reziduale scăzute, conținut moderat de alcool (10–11 % vol. alc.), aciditate volatilă scăzută (acid

acetic) și conținut redus de SO₂. (OIV, 2023). Fermentația secundară se desfășoară lent, în butelii, timp de 6-8 săptămâni dacă există condiții constante de temperatură scăzută (11 - 12 °C). Intervalul de timp dintre adăugarea amestecului de tiraj și a celui de expediție trebuie să fie de aproximativ 9 luni. După ce fermentația secundară a fost finalizată, vinurile spumante vor fi maturate și învechite o perioadă pe depozitul de drojdie format (în funcție de sortiment și de prevederile legale ale fiecărei țări). În perioada de maturare pe drojdii, vinul spumant capătă caracteristici organoleptice specifice conferite de procesul autolitic al drojdiilor, mediat de enzime hidrolitice; acestea din urmă favorizează eliberarea de polizaharide, peptide, acizi grași, proteine și manoproteine în vinul spumant. Se are în vedere faptul că oxigenul este capabil să pătrundă în butelie prin dop, existând și posibilitatea apariției unor defecte senzoriale în timpul învechirii. Expunerea buteliilor la lumină conduce la degradarea metioninei, la formarea compușilor volatili cu sulf, imprimând astfel mirosuri neplăcute de conopidă, lână umedă (Charpentier și Feuillat, 1993; Feuillat și Charpentier, 1982; Maujean și Seguin, 1983; Jeandet ș.a., 2021).

Autoliza drojdiei este un proces care se desfășoară foarte lent. În general, în timpul învechirii pe depozitul de drojdie, au loc patru faze principale: (I) în timpul fermentației secundare, nivelul de aminoacizi și proteine este descendent, formându-se peptide; (II) celulele viabile și cele inactivate coexistă, peptidele sunt degradate și are loc o eliberare de aminoacizi și proteine; (III) când nu sunt prezente celule viabile, predomină eliberarea atât a proteinelor, cât și a peptidelor; (IV) la aproximativ 9 luni de la administrarea amestecului de tiraj, are loc o scădere a concentrației de aminoacizi.

Proteazele favorizează hidroliza membranelor lizozomale și citoplasmice, crescând porozitatea peretelui celular al levurilor, facilitând eliberarea constituenților degradați în vin. Rata lentă a activității enzimice întârzie procesul autolitic și, în consecință, vinurile spumante sunt lăsate în contact cu drojdia timp de câteva luni sau ani pentru a beneficia de efecte autolitice pozitive (Gnoinski ș.a., 2021). Mai multe studii s-au concentrat pe accelerarea autolizei drojdiei. Unii autori au sugerat selecția tulpinilor cu un potențial autolitic bun, combinarea tulpinilor pozitive și negative cu factor killer, administrarea amestecului de tiraj cu drojdie epuizată (Perpetuini ș.a., 2016; La Gatta ș.a., 2016). O altă opțiune ar putea fi combinarea de tulpini cu capacitate autolitică diferită (Raymond Eder și Rosa, 2021). În acest sens, se poate lua în considerare exploatarea drojdiilor non-*Saccharomyces* în combinație cu tulpini de *Saccharomyces* (Ivit și Kemp, 2018). Interesul pentru drojdiile non-*Saccharomyces* în producția de vin spumant a crescut în ultimii ani, vizându-se îmbunătățirea complexității aromei și diversificarea gamei sortimentale.

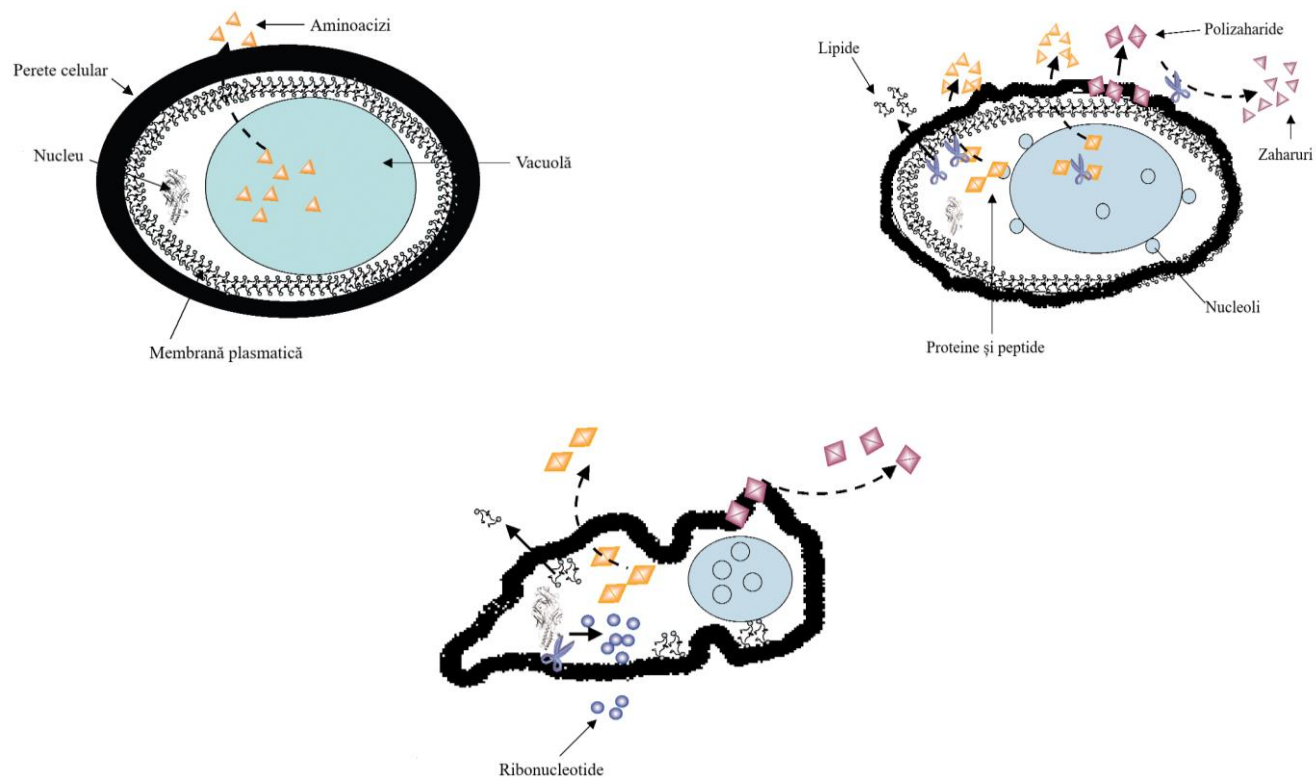


Figura 1.2. Reprezentarea schematică a elementelor morfologice și modificările biochimice ale levurii în timpul autolizei în vinul spumant.

Imediat după a doua fermentație alcoolică (a), între 3 și 6 luni (b) și între 9 și 12 luni (c)

Figure 1.2. Schematic representation of morphological elements and biochemical changes of yeast during autolysis in sparkling wine.

Immediately after the second alcoholic fermentation (a), between 3 and 6 months (b) and between 9 and 12 months (c)

(după Alexandre și Guilloux-Benatier, 2006)

Există foarte puține date referitoare la efectul non-*Saccharomyces* asupra calității vinuri spumante (Canonico ș.a., 2018; Ivit ș.a., 2018), majoritatea concentrându-se pe un număr limitat de specii non-*Saccharomyces*, inclusiv: *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe* și *Saccharomycodes ludwigii*. Studiile disponibile s-au concentrat pe analiza conținutului de aminoacizi, amoniac, compuși volatili, glicerol și proteine, care influențează aroma și vinul spumant (Ivit și Kemp, 2018).

Procesul de fermentare este monitorizat prin analizarea conținutului de zaharuri reducătoare și măsurarea presiunii cu ajutorul unui afrometru.

1.2.7.1. Selecția levurilor pentru fermentația secundară

Drojdiile care efectuează fermentația secundară trebuie să îndeplinească o serie de caracteristici suplimentare față de cele utilizate în prima fermentație a producției de vin de bază. Pe lângă faptul că acestea prezintă rezistență ridicată la etanol, levurile trebuie să aibă o capacitate mare de floculare, pentru a facilita eliminarea lor din butelie. Flocularea este o caracteristică distinctivă a levurilor care apare frecvent la *Saccharomyces cerevisiae*, nefiind întâlnit la *Saccharomyces uvarum*. În urma proceselor biochimice desfășurate sunt eliberați mai mulți compuși care influențează semnificativ caracteristicile vinului și îi afectează calitatea senzorială. Selecția tulpinilor de drojdie este importantă pentru îmbunătățirea calității vinurilor spumante. Având în vedere că manoproteinele se numără printre compușii majori eliberați de drojdii în timpul autolizei, căutarea unor tulpini care ar putea elibera cantități mari din acești compuși este de interes pentru îmbunătățirea calității vinului spumant (Alexandre și Guilloux-Benatier, 2006)

1.2.7.2. Factori de influență asupra autolizei levurilor

Procesul biochimic de autoliză este influențat de nivelul pH-ului, temperatură, prezența etanolului, dar și de natura tulpinii de drojdie. Temperaturile ridicate, de până la 60 °C, au fost raportate ca favorizând autoliza într-un sistem model de vin. Molnar ș.a. (1981) raportează că temperatura optimă pentru proteoliză în metoda *Champenoise* este între 10 °C și 12 °C. Nunez ș.a. (2005) au comparat capacitatea autolitică a diferitor tulpini și a sugerat că acest criteriu ar putea fi utilizat pentru selectarea drojdiilor. Capacitatea autolitică a fost evaluată prin măsurarea aminoacizilor eliberați de drojdie la diferite temperaturi la zece zile după fermentare. Au fost observate diferențe semnificative în capacitatea autolitică a trei tulpini. Prin urmare, tulpina de drojdie afectează cantitatea de azot eliberată în mediu, care ar putea fi potențial utilă pentru producția de vin spumant (Martinez-Rodriguez ș.a., 2001a). Martinez-Rodriguez ș.a. (2001b) au sugerat că o tulpină de drojdie cu capacitate autolitică bună ar produce vin spumant de calitate mai bună decât drojdia cu o capacitate autolitică scăzută. De asemenea, capacitatea autolitică împreună cu analiza spumei ar trebui să fie utilizată pentru selectarea drojdiei pentru producția de vin

spumant. Nunez ș.a. (2005) au confirmat recent că capacitatea autolitică a drojdiei este importantă pentru calitatea vinului spumant.

1.2.8. Remuajul și degorjarea

Următoarea fază de *remuaj* (agitarea buteliilor) îndepărtează drojdia prin transportarea lor în bidule și, prin urmare, evită efectele nocive ale oxigenului și degradarea biologică. În timpul *remuaj*-ului, buteliile sunt rotite zilnic în vederea direcționării drojdiilor înspre gâtul buteliei.

Procesul depinde de tipul levurilor existente, de suprafața variabilă, cât și de caracteristicile de floculare ale levurilor. Adăugarea de agenți de limpezire (bentonită) odată cu amestecul de tiraj urmărește normalizarea sedimentării. Depozitul de drojdie concentrat la gâtul buteliei va fi îndepărtat prin procesul de degorjare. Procesul implică introducerea buteliei într-o saramură la temperatură scăzută, congelarea gâtului buteliei și îndepărtarea depozitului de drojdie congelat. În timpul acestui proces, o parte din lichid se pierde, completându-se astfel cu amestec de expediție, format din zahăr alimentar (între 6 g/L și 50 g/L zaharoză) și substanțe cu rol antioxidant - SO₂, acid citric sau acid ascorbic. În timpul acestei operațiuni scade presiunea din butelie datorită pierderii de dioxid de carbon. Dozajul nu trebuie să crească tăria alcoolică a vinului spumant cu mai mult de 0,5 % vol. alc. (Valade, Panaiotis și Tribault-Sophier, 1993; Vasserot, Pitois și Jeandet, 2001; Garofalo ș.a., 2016; Torresi, Frangipane și Anelli, 2011; Capozzi, 2022).

1.2.9. Dopuirea buteliilor

După administrarea amestecului de expediție și a completării buteliilor cu vin spumant, acestea se închid cu dopuri de expediție (confeționate din plută, materiale sintetice – polietilenă, metalice cu filet). În cazul utilizării dopurilor din plută, este necesară fixarea cu coșulețe metalice, care să le asigure rezistența la suprapresiune (Cotea, 2005).

1.3. Metode de obținere a vinurilor spumante

Metoda de obținere aplicată constituie unul dintre cei mai importanți factori care determină stilul și calitatea vinurilor spumante albe și rosé. Piața vinului spumant s-a extins semnificativ în timp, piața fiind stimulată de cererea globală crescută a consumatorilor. Din cauza valorii sale adăugate ridicate, impactul economic al vinului spumant este foarte important, chiar dacă producția sa este mai mică în comparație cu cea a vinurilor liniștite (DiGianvito ș.a., 2019). Tendințele actuale evidențiază un interes ascendent al consumatorilor pentru vinurile spumante, sporind astfel cererea pe piața

globală. Tipul de levuri inoculate constituie un parametru fundamental pentru optimizarea tehnologiei de producere a acestora, cât și a îmbunătățirii calității produsului final. Conform normelor și reglementărilor prevăzute de Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV, 2020), vinurile spumante aparțin categoriei vinurilor speciale. Vinurile spumante se deosebesc în special în funcția de tehnologia de obținere, evidențiindu-se astfel: metoda *Champenoise*, *Cremant* (Franța și Luxemburg), metoda transvazării, metoda ancestrală (Limoux, Gaillac), *Dioise* și metoda *Charmat* (în rezervoare).

Metoda *Champenoise* presupune obținerea vinului de bază prin desăvârșirea procesului de fermentație alcoolică, urmată de o fermentație secundară și maturare în butelii (Figura 1.3). Această metodă presupune eliminarea sedimentelor formate prin procesele de remuaj și de degorjare (Hardy, 2003). Această metodă este utilizată în Franța, la obținerea băuturii Champagne, la care se utilizează soiuri precum: Chardonnay, Pinot noir și Pinot Meunier, Arbanne, Petit Meslier, Pinot blanc (DiGianvito ș.a., 2019).

Metoda transvazării (transferului izobarometric). În urma fermentării și maturării vinului de bază în butelii, se efectuează o răcire a acestuia, fiind apoi transferat într-o cisternă de presiune, cu ajutorul unor instalații automate sau semi-automate. În această etapă, dozarea amestecului de expediție poate fi făcută direct în rezervor, sau după filtrarea probei. După maturarea pe sedimentul de drojdie, vinul este filtrat și îmbuteliat sau doar îmbuteliat, dacă filtrarea s-a realizat anterior.

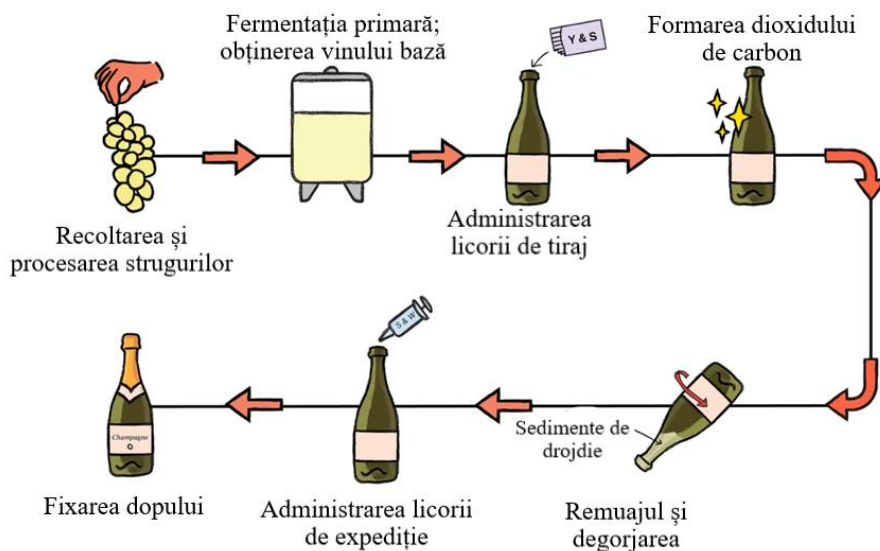


Figura 1.3: Etapele procesului de obținere a vinurilor spumante prin metoda Champenoise
 Figure 1.3: Stages of the process of obtaining sparkling wines by the Champenoise method
 (www.goodpairdays.com)

Toate operațiunile sunt efectuate în atmosferă de dioxid de carbon. Această metodă asigură o dozare mai uniformă a amestecului de expediție, cât și eliminarea operațiunii de

remuaj și degorjare. Cu toate acestea, metoda de transfer este costisitoare, presupunând un consum ridicat de energie și un risc crescut de oxidare a vinului (Bidan, 1998; Cotea, 2005; Hardy, 2003). Etapele producerii vinurilor spumante prin metoda transvazării sunt prezentate în Figura 1.4.

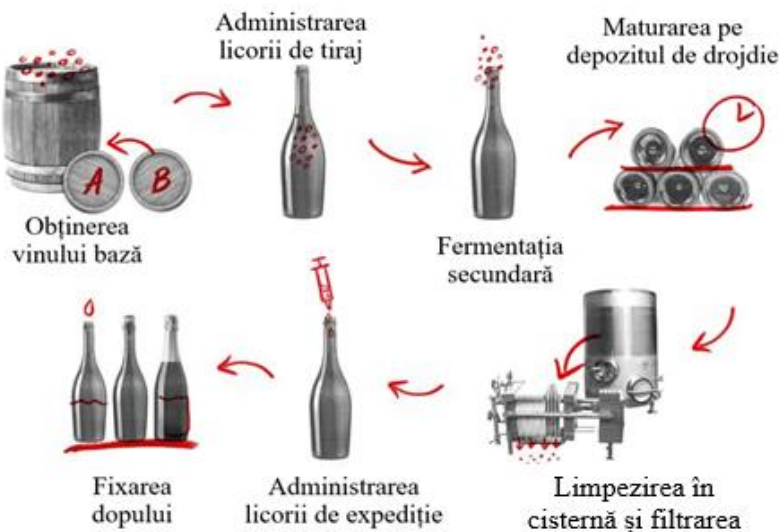


Figura 1.4: Obținerea vinurilor spumante prin metoda transvazării

Figure 1.4: Obtaining sparkling wines by the transfer method (www.spitbucket.net)

Metoda ancestrală a fost dezvoltată pentru prima dată în podgoriile din Limoux și Gaillac (Franța), însă este în general greu de controlat (Figura 1.5). Vinul-bază este obținut prin procesarea strugurilor întregi (în principal din soiul Mauzac) sau prin aplicarea tehnologiei clasice de vinificare a vinurilor albe a unui vin incomplet fermentat. La diferite etape ale procesului de elaborare, este esențială stoparea fermentației de fiecare dată când aceasta începe să se accelereze. În acest fel, refrigerarea (până la 0 °C), sulfitarea, epuizarea nutrienților din drojdie (prin decantare, limpezire, filtrare sau centrifugare) se repetă de câte ori este necesar pentru a regla sau opri activitatea levuriană. Vinul este apoi filtrat și păstrat la 0 °C pentru 2-3 luni. În aceasta etapă se desfășoară cea de-a doua fermentație (2-3 luni), în butelie (la temperaturi riguros controlate), folosind zaharurile rămase după prima fermentație. Apoi au loc remuajul și degorjarea (fără administrarea amestecului de expediție). Această metodă poate include eliminarea procesului de degorjare și păstrarea unei proporții reduse de sediment la baza buteliei (Dubois, Flanzy și Sablayrolles, 1998).

Metoda este utilizată în special în Franța, la obținerea băuturii Crémants, la care se folosesc soiuri precum Chenin blanc, Chardonnay, Cabernet Franc, Pineau D'Aunis, Grolleau, Gamay, Aligote, Melon, Sacy (DiGianvito ș.a., 2019).

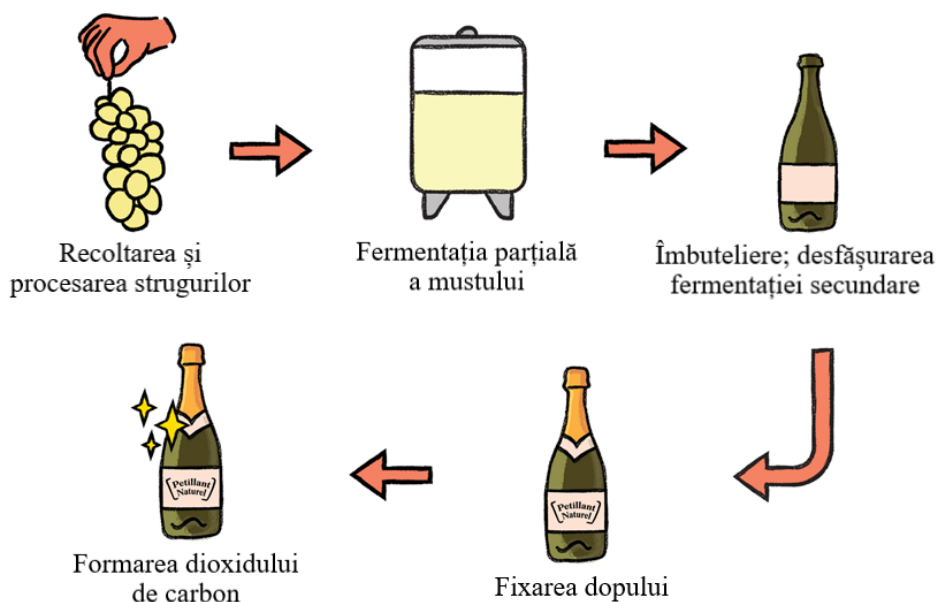


Figura 1.5: Metoda ancestrală de obținere a vinurilor spumante

Figure 1.5: The ancestral method of obtaining sparkling wines

(www.goodpairdays.com)

Pentru **metoda Dioise** se folosesc aceleași principii de vinificație ca și pentru cea ancestrală, constând în elaborarea unui vin semifermentat din soiul *Muscat à petits grains*, filtrare și refrigerare la 0 °C, a doua fermentație desfășurându-se în butelii din sticlă. Pentru a îmbunătăți extracția compușilor de aromă, enzimele pectinolice sunt administrate la procesarea strugurilor. În acest caz, mustul obținut se va caracteriza printr-o valoare mare a turbidității (între 1000 și 1500 NTU), fiind necesară limpezirea acestuia utilizând tehnica de flotație. Cea de-a doua fermentație este stopată prin aplicarea temperaturilor scăzute, urmând ca apoi buteliile să fie transvazate într-un rezervor din oțel inoxidabil unde este menținut la o presiune izobarometrică de CO₂ pentru a evita pierderea dioxidului de carbon (similar metodei de transfer). După filtrare, vinul este îmbuteliat prin aplicarea principiului izobarometric. Concentrația alcoolică finală a acestor băuturi este în general de aproximativ 7,5 % vol., cu 40 - 50 g/L de zaharuri reziduale (Marchal ș.a., 2003). În Figura 1.4 sunt prezentate etapele metodei ancestrale pentru obținerea vinurilor spumante.

Metoda Charmat (în cisterne de fermentare). Spre deosebire de metoda *Champenoise*, metoda *Charmat* presupune realizarea celei de-a doua fermentații în cisterne din oțel inoxidabil. Aceasta este o tehnică mai simplă, care implică costuri reduse comparativ cu celelalte metode propuse. Se adaugă levuri și zaharuri, iar vinul se menține la o temperatură de 20 °C până la 25 °C. A doua fermentație durează de regulă 10 zile și este oprită administrarea de dioxid de sulf și prin refrigerarea vinului la -2 °C. După ce a fost stabilizat la rece la -5 °C timp de câteva zile, vinul este filtrat la temperatură scăzută și

apoi îmbuteliat folosind principiul izobarometric. Un dezavantaj al acestei metode este că nu presupune maturarea vinului pe depozitul de drojdie (Jeandet ș.a., 2021).

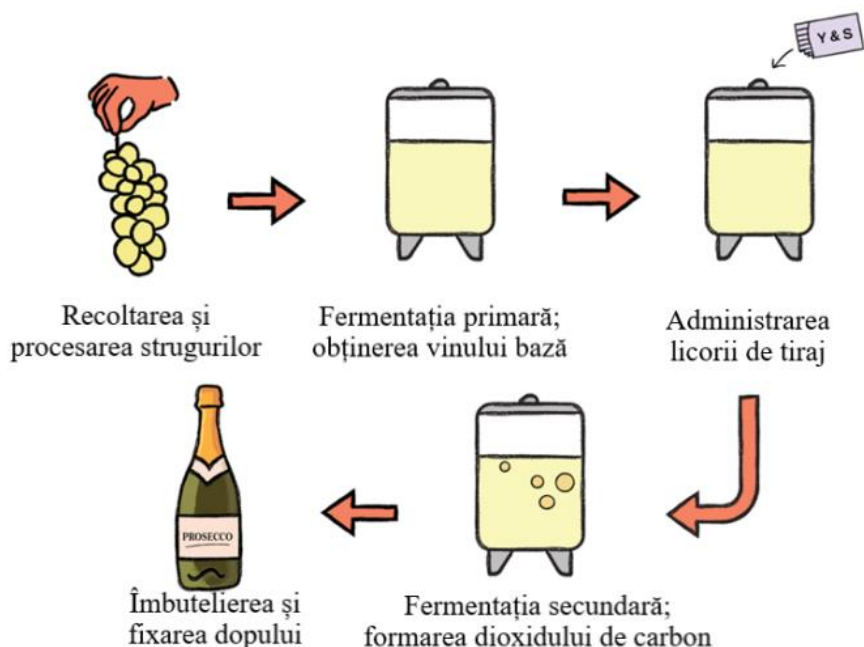


Figura 1.6: Obținerea vinurilor spumante prin fermentare în cisterne

Figure 1.6: Obtaining sparkling wines by fermentation in tanks (www.goodpairdays.com)

Metoda este utilizată frecvent la obținerea vinurilor spumante din Franța (din soiurile Cabernet Sauvignon, Chenin blanc, Cabernet Franc, Sauvignon blanc, Gamay, Chardonay, Grollo, Pinot D'Aunis, Pinot noir, Malbec), Germania (din soiurile Pinot blanc, Silvaner, Riesling, Pinot gris și Pinot noir) (DiGianvito ș.a., 2019).

1.4. Stadiul actual al cercetării privind selecția levurilor în tehnologia de obținere a vinurilor spumante

Selecția culturilor starter se bazează în general pe proprietățile oenologice ale acestora, care reflectă și adaptarea la caracteristicile de mediu specifice mustului și vinului spumant. Proprietățile levurilor pentru prima și a doua fermentație sunt diferite. În orice caz, este esențială identificarea culturilor starter care pot tolera caracteristicile specifice mustului și ale vinului-bază.

Genul *Saccharomyces* aparține diviziunii *Ascomycota* și include șapte specii, inclusiv *Saccharomyces cerevisiae*. Aceasta se adaptează bine la condițiile de pH scăzut, concentrație mare de zaharuri (stres osmotic), creșterea progresivă a etanolului și epuizarea nutrienților corespunzători. *Saccharomyces cerevisiae* este considerată cea mai importantă specie de levuri în procesul de vinificație și este folosită industrial pentru

realizarea proceselor fermentative de înaltă calitate. Tulpinile de *Saccharomyces cerevisiae* care urmează să fie utilizate în fermentația secundară a vinului-bază prezintă de obicei caracteristici fiziologice și tehnologice suplimentare în comparație cu cele sugerate pentru culturile starter „primare”. Obiectivul este transformarea totală a zaharurilor adăugate vinului-bază, prin intermediul amestecului de tiraj, în etanol și dioxid de carbon. Astfel, este necesar ca acestea să se poată dezvolta într-un mediu care conține cel puțin 10 % – 12 % v/v etanol, pH scăzut (2,9–3,2), să tolereze temperaturi scăzute (10 °C – 15 °C), concentrații de SO₂ total de 50 mg/L – 80 mg/L, aciditate totală ridicată (12 g/L – 18 g/L acid tartric), aciditate volatilă scăzută (0,2 g/L – 0,4 g/L), presiune mare (5–6 bari) și conținut de glicerol de 5 g/L – 20 g/L. În plus, unii autori au subliniat importanța capacităților de floculare și autolitice ale drojdiilor în timpul fermentației secundare. În general, flocularea este o caracteristică particulară a drojdiilor și permite limpezirea musturilor în fermentație. Acest caracter fiziologic poate fi descris ca o aptitudine naturală a tulpinilor de drojdie de a forma biomasă microbiană compactă, care sedimentează la baza vasului de fermentație și, în urma preluării spumei, facilitează degorjarea depozitului care se acumulează la nivelul gâtului buteliei. În plus, se pare că flocularea drojdiei este asociată cu o producție îmbunătățită de esteri.

Tulpinile hibride interspecifice sunt, de asemenea, potrivite pentru producerea vinului spumant, refermentat în butelii din sticlă; acestea se obțin în urma unei selecții adecvate a tulpinilor floculante de *Saccharomyces cerevisiae* și tulpinilor nefloculante de *Saccharomyces bayanus* var. *uvar*. Hibrizii interspecfici au capacitatea de a fermenta într-un interval extins de temperatură, între 6 °C - 36 °C. Capacitatea autolitică a drojdiei este inerentă unui alt caracter de selecție a drojdiei: fenotipul *killer*, care eliberează proteine toxice. În condiții oenologice, se încearcă accelerarea procesului autolitic prin selecția combinată adecvată a tulpinilor de levuri *killer* și sensibile la *killer* și utilizarea tulpinilor de drojdie mutante cu caracteristici autolitice. Mutageneza tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* induce eliberarea accelerată de proteine, aminoacizi și polizaharide. Vinuri spumante obținute din tulpinile selecționate mutante au prezentat proprietăți de spumare mai bune decât cele inoculate cu tulpini nemutante. Capacitatea autolitică a drojdiilor este strâns legată de eliberarea de compuși volatili în vinul spumant și de impactul pe care aceștia îl au asupra profilului senzorial.

Cercetările se concentrează pe analizarea unei manoproteine (PAU5) specifice sintetizate de unele tulpini de *Saccharomyces cerevisiae*. Această manoproteină, codificată de gena *seripauperinei* PAU5, reduce direct fenomenul nedorit în urma agitării vinurilor spumante și, prin urmare, posedă proprietăți de stabilizare a spumei. Spuma spontană excesivă după eliberarea presiunii la deschiderea buteliei provoacă importante pierderi economice. Acest lucru ar putea fi cauzat fie de o materie primă contaminată (de exemplu, din cauza prezenței bacteriilor *Botrytis cinerea* spp.), fie de nerespectarea procesului de producție. Frisch ș.a (2021) au studiat acest fenomen de suprapresiune indus de proteinele sintetizate din *Penicillium expansum* și *Pichia pastoris*. Aplicarea

tratamentelor termice (aproximativ 85 °C) ar putea preveni degradarea proteinelor indusă de contaminarea fungică, deoarece enzimele fungice nu sunt stabile la temperaturi ridicate. Vogt ș.a. (2017) au demonstrat rezultate semnificative cu privire la degortarea vinului spumant în urma contaminării strugurilor cu *Penicillium oxalicum*.

În urma fermentației secundare a vinului spumant, levurile *Saccharomyces cerevisiae* au capacitatea de a produce indol, chiar și când viabilitatea culturii este foarte scăzută.

Proporția de CO₂ eliberat de levuri și dizolvat în faza lichidă în timpul procesului fermentativ este un parametru suplimentar de selecție a culturilor levuriene, dar de importanță fundamentală asupra percepției organoleptice a produsului final (Liger-Belair, 2017; Capozzi, 2022).

Proprietățile senzoriale ale vinului spumant sunt influențate de diferiți factori, precum tehnologia de fabricație, soiurile de struguri, compoziția chimică și structura vinului-bază, tulpinile de levuri selecționate utilizate și timpul de maturare a produsului în contact cu drojdiile. Cu toate acestea, profilul senzorial al vinurilor spumante depinde mai mult de eliberarea autolitică a compușilor volatili în timpul fazei de maturare pe depozitul de drojdie, aroma fiind unul dintre cei mai importanți indicatori ai calității vinului spumant. Aromele primare (pre-fermentative) sunt caracteristice soiului de struguri utilizat, aromele secundare (fermentative) sunt eliberate în urma metabolismului levurilor în timpul fermentațiilor, iar aromele terțiare (post-fermentative) se formează prin în timpul învechirii. Astfel, Cotea ș.a (2021) au studiat influența unor levuri comerciale asupra profilului volatil al vinurilor spumante, indicând astfel că îmbogățirea compușilor aromatici este un caracter specific tulpinilor de levuri inoculate. Evaluarea senzorială și analiza chimică a compușilor volatili de către experți calificați sunt printre cele mai importante tehnici de testat în vederea evaluării profilului de aromă al vinurilor spumante. La sfârșitul celei de-a doua fermentații începe maturarea îndelungată în contact cu drojdia; o eliberare de compuși intracelulari ce determină și o creștere a aminoacizilor liberi, definiți ca precursori ai compuși aromatici din vinul spumant. În timpul învechirii vinului spumant are loc autoliza levurilor, care eliberează un număr considerabil de molecule volatile (esteri, alcooli superiori, aldehide, compuși cu sulf, acizi organici etc.). Eliberarea acestor este dependentă de tulpinile existente. Autoliza constituie o hidroliză enzimatică a biopolimerilor. Fiind un proces foarte lent, se asociază cu moartea celulelor de drojdie și eliberarea de constituenți volatili.

Unele studii s-au concentrat pe analiza diferiților compuși eliberați în timpul procesului autolitic și pe explorarea unor metode suplimentare de inducere a autolizei, facilitând dezvoltarea caracterului de învechit în vinul spumant. Unii autori au investigat diferitele modificări compoziționale care au loc în timpul producerii vinurilor spumante și factorii care influențează cel mai mult senzațiile variate la nivel olfactiv. Polizaharidele pot influența vâscozitatea, capacitatea de spumare și percepția senzorială a vinurilor spumante. Manoproteinele sunt eliberate în vinul spumant în timpul autolizei drojdiei și previn tulburările proteice sau cristalizarea bitartratului de potasiu. A fost evidențiat un

impact major al levurilor de maturare asupra compușilor volatili, influențând astfel profilul senzorial. De exemplu, alcoolii, compușii carbonilici și acizii organici au constituit principalii reponsabili de nota de ars, plastic sau de rânced. Aldehidele octanal, nonanal, decanal și unele terpene au îmbogățit vinurile spumante cu aromă de citrice. Miros chimic intense, de prăjit, arome florale, vegetale și note de gras au fost apreciate în vinuri spumante produse cu tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* bioimobilizate cu ciuperci filamentoase - *Penicillium chrysogenum*. Se evidențiază astfel că nu doar tulpina, ci și modul de imobilizare a levurilor influențează caracteristicile senzoriale finale ale vinurilor spumante. Prezența indolului și a altor compuși volatili afectează negativ percepția senzorială a acestor produse prin eliberarea de aromei neplăcute, de plastic. Acesta este de obicei produs în urma digestiei cu triptofan. Atât levurile *Saccharomyces*, cât și non-*Saccharomyces* pot produce concentrații mari de indol în timpul fermentației primare.

Există numeroase cercetări despre selecția levurilor indigene pentru a fi utilizate în fermentarea mustului de struguri, însă puțini autori au aprofundat studiul drojdiilor autohtone în vinurile spumante. În acest caz, selecția drojdiilor indigene este mult mai complexă deoarece vinul-bază, în care este inoculată tulpina specifică de *Saccharomyces cerevisiae*, este considerat un mediu nefavorabil pentru creșterea microorganismelor datorită conținutului ridicat de alcool și pH-ului scăzut.

Tulpinile indigene de *Saccharomyces cerevisiae* sunt selectate pe baza mai multor criterii tehnologice (putere și vigoare fermentativă, toleranță la SO₂ și etanol și capacitatea de floculare) și caracteristici calitative (conținutul de acid acetic, glicerol și producția de hidrogen sulfurat) (Garofalo ș.a., 2018; Vigentini ș.a., 2017). O proprietate interesantă evidențiată pentru tulpinile indigene de *Saccharomyces cerevisiae* utilizate în producția de vin spumant este capacitatea de a modula componentele fenolice ale produsului final. Selectarea adecvată a tulpinii de *Saccharomyces cerevisiae* și asigurarea capacității acesteia de a spori proprietățile varietale ale strugurilor; acesta este importantă pentru producerea unui vin spumant de calitate cu profil senzorial care reflectă tipicitatea soiului de struguri (Tufariello ș.a., 2021).

Tufariello ș.a. (2014) a studiat profilul senzorial al vinurilor spumante obținute cu tulpini indigene de *Saccharomyces cerevisiae* (izolate în Salento, Apulia, Italia), în comparație cu tulpini comerciale DV10[®] (Lallemand oenology, Grenaa, Danemarca). În cazul probelor obținute cu levurile DV10[®] s-au înregistrat concentrații mari de acid gluconic, care a influențat negativ proprietățile de spumare ale produsului final, acest lucru nefiind întâlnit în vinurile spumante obținute din tulpini autohtone de *S. cerevisiae*. În plus, utilizarea unor tulpini indigene selectate a condus și la proporții ridicate de compuși volatili (cu note de trandafir și arome fructate), valori scăzute de aciditate volatilă și conținut ridicat de glicerol (Tufariello ș.a., 2021).

Alte studii arătat o capacitate de floculare redusă și aciditate volatilă scăzută a tulpinilor indigene, izolate atât în Apulia, cât și în zona Lombardiei (Italia), comparativ cu cele comerciale. În special, tulpinile indigene de *Saccharomyces cerevisiae* izolate din

boabele de struguri din Apulia (Italia) au fost testate pentru toleranța la diferiți factori de stres, cum ar fi pH-ul, conținutul de etanol și nivelul de SO₂ total. Prin monitorizarea fermentației la 6 °C și respectiv, 12 °C, majoritatea tulpinilor autohtone au produs valori foarte scăzute de CO₂ și au manifestat proprietăți autolitice și floculante scăzute, activitate killer, rezistență la pH 3,5 și toleranță la concentrații de etanol între 6 % vol. alc. și 12 % vol. alc., cât și la diferite concentrații de SO₂ total (100 mg/L, 150 mg/L și 200 mg/L). De asemenea, aciditatea volatilă a acestor probe a fost scăzută și o presiune de aproximativ 5 bari. În studiul lui Vigentini ș.a. (2017), tulpinile native izolate din regiunea Oltrepò Pavese (Italia) au eliberat concentrații scăzute de glicerol și producții mari de hidrogen sulfurat. Acestea s-au caracterizat prin rezistența crescută la o concentrație de 12 vol. alc., capacitate redusă de a tolera concentrații mari (300 mg/L) de SO₂ și aciditate volatilă scăzută. Alfonso ș.a (2020) au selectat tulpini indigene de *Saccharomyces cerevisiae* pentru fermentarea secundară a vinului – bază obținut din soiul Grillo. Cele patru tulpini au arătat o bună rezistență la fermentare și la dioxidul de sulf, capacitate bună de refermentare a vinului la aciditate totală ridicată și pH foarte scăzut, nefiind produse arome nedorite. Studiile au evidențiat un nivel ridicat de diversitate genomică în cadrul speciilor *Saccharomyces cerevisiae*.

Tulpinile de levuri non-*Saccharomyces* (*Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces oviformis* Osterwalder) au fost utilizate de Bozdogan ș.a. (2011) în formă liberă și imobilizată, din urmă după imobilizarea în mărgel de alginat, pentru a favoriza fermentarea secundară a vinurilor-bază obținute din soiurile Emir și Drimit. Diferențe semnificative privind concentrațiile de aminoacizi au fost detectate ca o consecință a perioadei de maturare și a levurii inoculate.

Efectele benefice ale levurilor non-*Saccharomyces* (de exemplu, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Lachancea thermotolerans* și *Metschnikowia pulcherrima*) asupra vinurilor liniștite au fost amănunțit prezentate în literatura de specialitate însă există puține studii cu privire la impactul acestora asupra calității vinurilor spumante (Tabelul 1.1).

González-Royo ș.a (2014) au testat două tulpini de *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima* pentru a produce vin-bază din soiul Macabeo, în inoculări succesive cu *Saccharomyces cerevisiae*. Autorii au indicat că vinul spumant obținut prin folosirea *Metschnikowia pulcherrima* s-a caracterizat printr-o persistență mai mare a spumei și un profil aromatic interesant, cu note de fum și flori. S-a raportat faptul că *Torulaspora delbrueckii* scade aciditatea volatilă, dar crește proporția de glicerol, îmbunătățind proprietățile de spumare a vinului, datorită autolizei levurilor (Medina-Trujillo ș.a., 2017). Vinurile spumante produse cu *Saccharomycodes ludwigii* și *Schizosaccharomyces pombe* s-au evidențiat prin modificări importante ale caracteristicilor de culoare, acidității, profilului volatil și cel al aminelor biogene (Ivit ș.a., 2018). Inocularea secvențială *Torulaspora delbrueckii* și *Saccharomyces cerevisiae* a condus la obținerea unor vinuri spumante cu un conținut ridicat de proteine și cu proprietăți de spumare îmbunătățite (Velázquez ș.a., 2019), dar și cantități mari de

propanoat de etil, acid izobutiric și butanoic, alcooli și fenoli. Cu toate acestea, Velázquez ș.a., (2019) sugerează inocularea doar a levurilor *Torulaspora delbrueckii* în condiții stricte (presiune mare și conținut ridicat de alcool). Aceste drojdii nu completează fermentația secundară a vinului spumant, rămânând cantități mari de zaharuri reducătoare, producție scăzută de CO₂ și, prin urmare, presiune scăzută. Este important de subliniat faptul că unele levuri non-*Saccharomyces* pot avea un efect negativ asupra vinurilor spumante. De exemplu, speciile *Zygosaccharomyces* produc excesive acid acetic (Loureiro și Malfeto-Ferreira, 2003).

Tabelul 1.1: Cercetări privind importanța levurilor indigene în vinificație
Table 1.1: Research on the importance of indigenous yeasts in winemaking

Tulpini indigene	Regiunea viticolă	Caracteristici tehnologice	Caracteristici de calitate	Referințe bibliografice
16 tulpini (<i>S. cerevisiae</i>)	Salento (regiunea Apulia, Italia)	Fermentație viguroasă, bună toleranță la alcool și dioxid de sulf	Producerea de compuși volatili	Tufariello ș.a., 2018
16 tulpini (<i>S. cerevisiae</i>)	Daunia (regiunea Apulia, Italia)	Fermentație viguroasă, bună toleranță la alcool și dioxid de sulf, capacitate de floculare și de autoliză, activitate killer	Aciditate volatilă scăzută, crește concentrația glicerolului, hidrogenului sulfurat și a compușilor volatili	Garofalo ș.a., 2018
4 tulpini (<i>S. cerevisiae</i>)	Franciacorta (Oltrepò Pavese, Italia)	Fermentație viguroasă, capacitate de floculare, toleranță la alcool și dioxid de sulf	Aciditate volatilă ridicată, glicerol, crește nivelul de hidrogen sulfurat	Vigentini ș.a., 2017
4 tulpini (<i>S. cerevisiae</i>)	Marsala (Sicilia, Italia)	Fermentație viguroasă, aciditate totală ridicată	Aciditate volatilă ridicată, crește producția de compuși volatili	Alfonzo ș.a., 2020

2. ASPECTE GENERALE PRIVIND CALITATEA VINURILOR SPUMANTE

2. GENERAL ASPECTS REGARDING THE QUALITY OF SPARKLING WINES

2.1. Compoziția chimică a vinurilor spumante

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).

Apa se găsește în cele mai mari proporții în vinurile spumante (60 % - 85 % din totalul compușilor existenți, fiind implicată în desfășurarea reacțiilor chimice (Cotea, 2009).

Alcoolii reprezintă în medie 15 % din totalul constituenților, predominanți fiind alcoolul etilic, 1-propanolul, 2-feniletanolul, 2-metil-1-propanolul etc. (Figura 2.1). Aceștia pot servi ca solvenți pentru unii constituenți chimici, participă la formarea unor compuși precum esteri, acetati, dar manifestă un rol esențial și în definirea profilului senzorial (Jackson, 2008; Scutarașu, 2021).

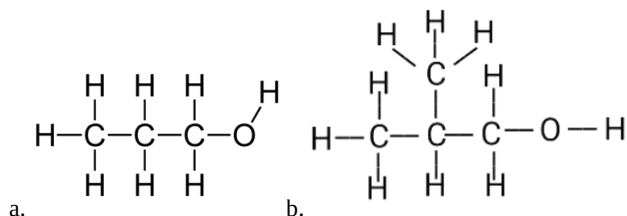


Figura 2.1: Exemple de alcooli: 1-propanol; 2-metil-1-propanol
Figure 2.1: Examples of alcohols: 1-propanol; 2-methyl-1-propanol

Acizii se găsesc în proporții mai mici comparativ cu primele două componente însă manifestă funcții cheie în definirea calității vinurilor spumante și cu un impact major asupra profilului organoleptic. Dintre aceștia, se evidențiază acizi minerali (acidul sulfuric, acidul fosforic) și organici (acidul tartric, acidul citric, acidul malic etc.) (Waterhouse ș.a., 2016).

Compușii fenolici pot fi identificați în cantități de până la 500 mg/L în vinurile spumante albe și prezintă un interes deosebit datorită capacității antioxidative a acestora. Din această categorie fac parte acizii fenolici (acidul galic, vanilic, gentisic, siringic etc.), substanțe tanante (catechine, procianidine, leucoantocianine), pigmenți (antociani, flavone), aceștia participând la numeroase reacții de oxidoreducere (Cotea ș.a., 2009; Scutarașu, 2021). În Figura 2.2 sunt reprezentați compuși fenolici frecvent identificați în vinurile spumante.

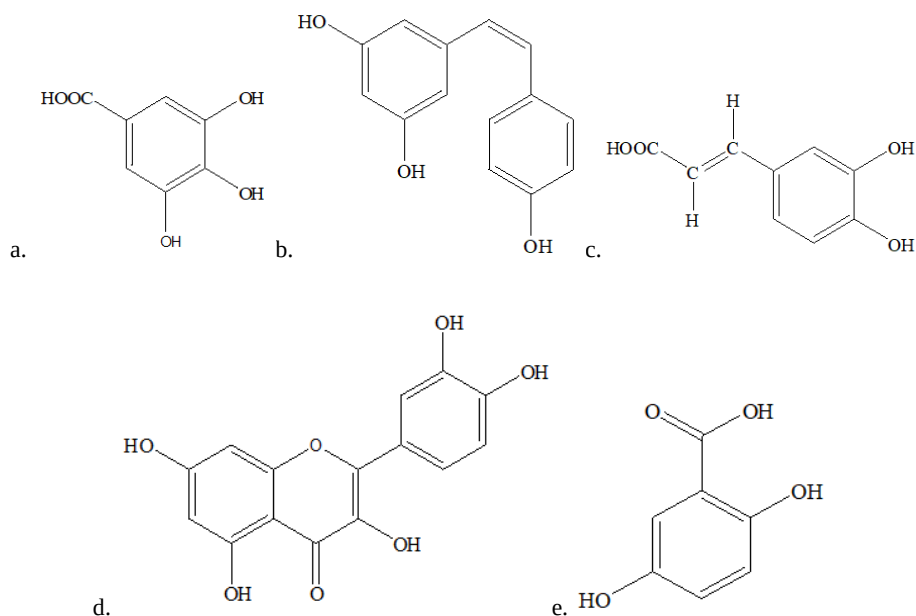


Figura 2.2: Acidul galic–a; cis-resveratrol–b; acidul trans-cafeic–c; quercitina–d; acidul gentisic–d.

Figura 2.2: Acidul galic–a; cis-resveratrol–b; acidul trans-cafeic–c; quercitina–d; acidul gentisic–d.

În ciuda implicațiilor evidente ale compușilor fenolici asupra calității senzoriale a vinurilor, nu există multe studii menite să stabilească modificările acestor compuși în timpul procesului tehnologic. Jeandet ș.a. (2006) au observat o intensificare a culorii cărămizii a vinurilor spumante după 15 luni de maturare-învechire. Acest proces se poate datora oxidării compușilor fenolici eliberați în timpul autolizei drojdiei, cât și acțiunii enzimelor citoplasmice (eliberate și în timpul autolizei) și a celor hidrolitice. În plus, s-a evidențiat o reducere a acestui fenomen la începutul perioadei de autoliză (între luna a 12-a și a 18-a) posibil din cauza eliberării de compuși fenolici adsorbiți de drojdie. De asemenea, a fost indicată o reducere a conținutului de resveratrol în timpul învechirii pe depozitul de drojdie, pusă pe seama capacității de adsorbție a drojdiei a compușilor fenolici.

Compușii de aromă pot proveni fie de la materia primă (arome primare), fie se pot forma în timpul proceselor fermentative (secundare) ori în perioada de maturare-învechire

(terțiare). Concentrația acestor compuși este dependentă de caracteristicile de calitate și compoziție ale materiei prime, dar și de tehnologia de obținere a vinurilor spumante. Compușii odoranți reprezentativi vinurilor liniștite și spumante fac parte din clasa terpenelor, fenolilor, esterilor (acetatul de etil, acetatul de izoamil, acetatul de benzil), tiolilor (4-mercapto-4-metil-2-pentanonă, 3-mercapto-1-hexanolul), izoprenoidelor (geraniolul, α -terpineolul, linaloolul) etc. (Berger, 2007). În Figura 2.3 pot fi observate structurile unor compuși de aromă din vinuri.

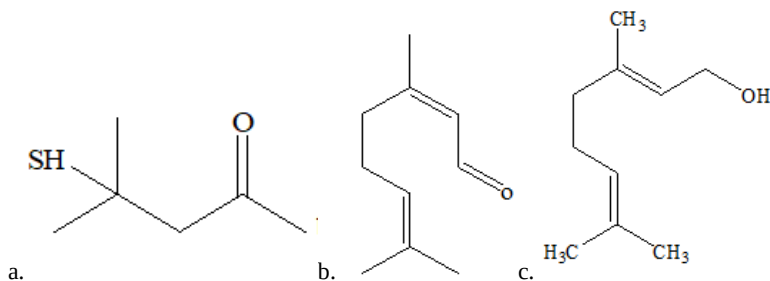


Figura 2.3: 4-mercapto-4-metil-2-pentanonă-a; citral-b; geraniol-c
Figure 2.3: 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone-a; citral-b; geraniol-c

Cele mai multe dintre studiile timpurii legate de modificările compușilor volatili în timpul învechirii vinurilor spumante sunt contradictorii. Unii autori au arătat o creștere a acestor compuși în timpul învechirii (Postel și Ziegler, 1991), în timp ce alții au constatat o scădere a concentrației esterilor etilici și a acetatilor (Pueyo ș.a., 1995). Acest fapt se poate datora diferențelor în condițiile experimentale, dar și din cauza degradării și sintezei simultane a compușilor volatili care are loc în timpul învechirii vinului cu drojdie, rezultând că la un moment dat, oricare dintre aceste procese poate predomina (Pozo-Bayón ș.a., 2003). Pozo-Bayón ș.a. (2003) au arătat un impact major al celei de-a doua fermentații și al timpului de maturare pe levuri asupra proporției de compuși volatili ai vinurilor spumante. Aceștia au raportat că proporția unor compuși volatili precum acetatul de hexil, acetatul de izopentil, butiratul de etil, octanoatul de etil și succinatul de dietil ar putea oferi informații asupra vârstei vinurilor spumante. De asemenea, s-a sugerat că creșterea nivelului norizoprenoidelor C13 din vinurile spumante maturate pentru perioade mai lungi de timp (mai mult de 21 de luni) se poate datora acțiunii enzimelor eliberate în timpul autolizei levurilor asupra pigmentilor (carotenoizi) prezenți în vin (Bosch-Fuste ș.a., 2007). Dintre aceștia, vitispiranul este considerat marker al procesului de maturare-învechire în vinurile spumante (Loyaux ș.a., 1981).

Substanțele azotate sunt prezente în vinuri fie sub formă minerală, fie organică. Acești compuși se găsesc în concentrații reduse în vin și provin de regulă de la materia primă. Substanțele azotate prezintă un rol important în desfășurarea proceselor fermentative și a capacității de spumare (Ferreira ș.a., 2000). Curioni ș.a (2008) au raportat un important rol antioxidant, tensioactiv, dar și antimicrobian al acestor compuși. Dintre substanțele azotate, aminoacizii (glicina, valina, prolina, fenilalanina, histidina,

arginina etc.) constituie până la 30 % din totalul acestora în cazul vinurilor spumante albe. Aminoacizii constituie hrană pentru levuri în timpul fermentației (Moreno-Arribas și Polo, 2009). În timpul fermentației crește de regulă proporția peptidelor, diminuându-se spre finalul acesteia. Această scădere a fost atribuită consumului de peptide de către drojdii și de prezența proteazelor acide active în vin (Lagace și Bisson, 1990). În Figura 2.4 seunt reprezentați exemple de aminoacizi ce pot fi identificați în vinurile spumante.

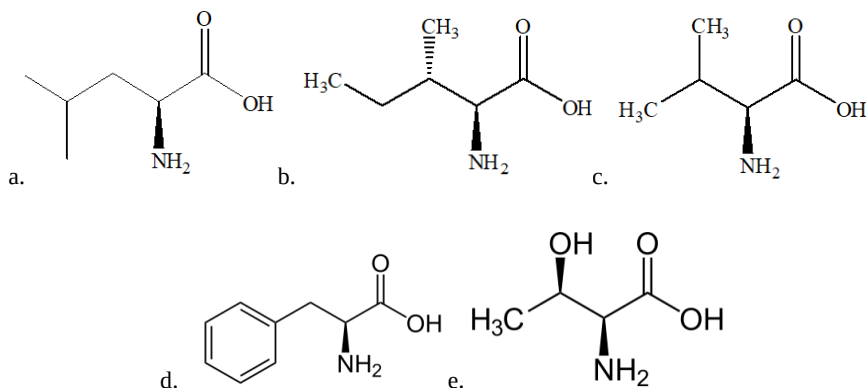


Figura 2.4: Leucina-a; izoleucina-b; valina-c; fenilalanina-d; treonina-e
 Figure 2.4: Leucine-a; isoleucine-b; valine-c; phenylalanine-d; threonine-e

Fracția de aminoacizi a vinului-bază este foarte importantă, aceștia fiind sursa principală de azot în timpul fermentației. Ele servesc, de asemenea, ca precursori ai compușilor aromatici care contribuie la caracteristicile vinurilor spumante. Aminoacizii în vinurile spumante provin din diverse surse, cum ar fi strugurii utilizați la obținerea vinului-bază și care nu sunt metabolizați de drojdii în timpul creșterii, iar alții sunt eliberați de levuri la sfârșitul fermentației sau în timpul autolizei. Acest lucru se poate datora faptului că mai multe peptide decât aminoacizii sunt eliberați în timpul autolizei sau pentru că aminoacizii eliberați (acidul glutamic, arginina și alanina) sunt convertiți prin decarboxilare și dezaminare, rezultând o reducere a fracției aminoacizilor (Charpentier și Feuillat, 1993).

Proteinele joacă un rol important în îmbunătățirea calității efervescentei și creșterea stabilității spumei. De asemenea, sa raportat că polizaharidele și manoproteinele joacă un rol pozitiv în îmbunătățirea percepției gustative și că unele proteine și peptide eliberate de levuri pot contribui la gustul dulce al vinului. În plus, unii aminoacizi, peptide și nucleotide pot contribui la gustul umami și au fost descriși ca potențiatori de aromă. S-a evidențiat faptul că aminoacizii și lipidele constituie precursori de aromă și, în consecință, eliberarea lor din celulele de levuri poate contribui, de asemenea, la complexitatea aromatică a vinurilor spumante (Pons-Mercade ș.a., 2020).

Compuși cu sulf se găsesc în proporții scăzute în vinurile spumante, atât sub formă anorganică (hidrogen sulfurat), cât și organică (sulfone, tioalcooli, tioesteri, tioeteri

etc). Acești compuși prezintă de obicei miros neplăcut (ou clocit, varză putredă sau cauciuc) (Jackson, 2009; Jackson, 2014).

Polizaharidele sunt macromolecule care provin de la materia primă, drojdii, bacterii și din contaminarea fungică a strugurilor (*Botrytis cinerea* spp.). Polizaharidele bogate în arabinoză și galactoză precum arabinogalactanii de tip II și arabinanii, ramnogalacturonanii de tip I și tip II și homogalacturonanii provin din boabe de struguri, în timp ce glucanii, mananii și manoproteinele sunt eliberați de drojdie fie în timpul fermentației, fie prin acțiune enzimatică în timpul învechirii pe drojdie, prin autoliză. Polizaharidele exogene, cum ar fi guma arabică și carboximetil celuloza, pot fi întâlnite în vinurile liniștite și spumante, fiind considerate aditivi. Acțiunea lor în vin este dependentă de tipul acestora, dar și de concentrația în care se găsesc. Arabinogalactanii influențează în mare măsură procesul de filtrare, pe când manoproteinele sunt mai eficiente în reducerea aspectului turbid al vinurilor albe. Ramnogalacturonanii, manoproteinele și arabinogalactanii au influențe diferite asupra agregării proantocianidinelor și, prin urmare, prezintă efecte variate asupra caracteristicilor vinului. Acești compuși ar putea constitui markeri de monitorizare a procesului de autoliză (Martinez-Lapuente ș.a., 2013).

Zaharurile reducătoare constituie principalul criteriu de clasificare a vinului spumant, evidențiindu-se astfel: brut natur (maximum 3 g/L); extrabrut (maximum 6 g/L); brut (maximum 12 g/L); extrasec (12,01 g/L - 17 g/L zaharuri); sec (17,01 g/L - 32 g/L); demisec (32,01 g/L - 50 g/L); dulce (minimum 50,1 g/L). Acestea constituie fie rezultatul unei fermentații incomplete sau oprite, ori a prezenței glucidelor nefermentabile (arabinoză, xiloză), fie sunt adăugate în timpul procesului tehnologic (prin administrarea de zaharoză, must concentrat etc.) (Waterhouse ș.a., 2016).

Gazele prezente în băuturi sunt reprezentate de cantități mari de dioxid de carbon, dioxid de sulf, dar și oxigen și azot (Cotea ș.a., 2009).

Vitaminele predominante în must și vin sunt cele din complexul B, vitamina C, F și P. Acestea constituie factori de creștere pentru microorganisme (levuri, bacterii) în timpul proceselor biochimice de fermentație. Conținutul în vitamine este diminuat în urma administrării bentonitei (Moreno și Peinado, 2012).

Prezența **substanțelor minerale** în vinurile spumante este dată de compoziția materiei prime, terroir, tehnologia aplicată. Se remarcă astfel prezența potasiului, fierului, sodiului, cuprului, calciului, magneziului, zincului etc. (Cotea ș.a., 2009).

2.2. Stadiul actual al cercetării privind implicațiile tehnologice asupra calității vinurilor spumante

Majoritatea studiilor care au vizat vinurile spumante s-au concentrat pe îmbunătățirea calității acestora. Având în vedere că vinul spumant constituie rezultatul mai multor factori, au fost luate în considerare diferite abordări ale calității. O tendință generală este diversificarea gamei sortimentale și, în acest scop unele studii s-au focusat pe potențialul diferitelor soiuri de struguri. S-a constatat astfel că soiurile specifice fiecărei regiuni geografice pot conferi o amprentă varietală care conferă unicitate produsului (García ș.a., 2009). De asemenea, unele cercetări au vizat studiul levurilor indigene (Hidalgo ș.a., 2004), aceste microorganisme reflectând biodiversitatea unei anumite zone, ceea ce susține ideea că tulpinile de drojdii indigene pot fi asociate cu *terroir*-ul (Mas ș.a., 2016). Cu toate acestea, fermentarea vinului spumant este o provocare dificilă pentru drojdiile indigene. Alți autori au pus accent pe studiul influenței condițiilor de fermentație secundară, a metodei de obținere aplicată, a condițiilor de maturare pe drojdie asupra calității vinurilor spumante (Pérez-Bernal et al., 2017; Alexandre și Guilloux-Benatier, 2006; DiGianvito ș.a, 2019).

Ruiz-Moreno ș.a. (2016) au studiat influența macerării pre-fermentative și a învechirii asupra profilului de aromă (cu accent pe conținutul în esteri) ale unor vinuri spumante obținute din soiul Pedro Ximenez. Procesul de macerare pre-fermentativă a constat în menținerea pielii în contact cu mustul la 10 °C, timp de 6 ore. La obținerea vinurilor spumante s-a aplicat metoda *Champenoise*, probele fiind monitorizate la 3, 6 și 9 luni de maturare pe levuri. Vinurile spumante obținute cu macerare pre-fermentativă au prezentat conținuturi mai mari de esteri etilici ai acizilor ramificați și cinamați. De cealaltă parte, probele obținute fără macerare au prezentat niveluri mai mari de esteri etilici ai acizilor grași și acetați ai alcoolilor mai mari. Rezultatele au evidențiat impactul macerării pre-fermentative și al învechirii asupra profilului de aromă al vinurilor spumante. Macerația pre-fermentativă a afectat semnificativ profilul de aromă al vinurilor spumante. Niveluri mai mari de esteri etilici ai acizilor ramificați, cinamați, esteri metilici ai acizilor grași, esteri etilici cu număr impar de atomi de carbon ai acizilor grași și compuși diverși s-au găsit în vinurile spumante obținute prin macerare pre-fermentativă. Heptanoatul de etil, fenilacetatul de etil, hexanoatul de metil și propanoatul de etil s-au remarcat ca potențiali markeri volatili ai macerării pre-fermentative, în timp ce izovaleratul de etil, izobutiratul de etil și 2-metilbutiratul de etil au fost identificați ca markeri de maturare-învechire.

Tofalo ș.a. (2022) au investigat efectul inoculării de *Saccharomyces cerevisiae* (F6789) și *Torulaspora delbrueckii* (TB1) sau *Starmerella bacillaris* (SB48) asupra caracteristicilor de calitate ale vinurilor spumante obținute prin metoda *Champenoise*. Au fost evaluate, de asemenea, rezultatul autolitic și profilul senzorial al vinurilor spumante obținute. Fermentația secundară a fost finalizată de toate culturile mixte și unice starter, cu

singura excepție a celor ghidate de *Starmerella bacillaris*. Vinurile spumante produse cu mix levurian de *Saccharomyces cerevisiae* (F6789) și *Starmerella bacillaris* (SB48) au prezentat cele mai mari cantități de glicerol (6,51 g/L), aceste variante prezentând și cel mai bun potențial autolitic (81,98 mg/L - leucină). Cea mai mică valoare pentru indicatorul autolitic a fost observată pentru probele obținute numai cu *Saccharomyces cerevisiae* - F6789 (53,96 mg/L - leucină). Vinurile spumante au prezentat diferite profiluri aromatice și senzoriale, evidențiindu-se concentrații mai mari ale esterilor în variantele produse numai cu *Saccharomyces cerevisiae* - F6789 (88,09 mg/L) urmați de cele obținute cu amestec de *Saccharomyces cerevisiae* + *Torulaspora delbrueckii* (87,20 mg/L), și în final, cele mai scăzute valori au fost înregistrate în cazul probelor în care s-a inoculat mix de *Saccharomyces cerevisiae* și *Starmerella bacillaris* (81,93 mg/L). Conținutul de esteri a scăzut în timpul păstrării, iar acest lucru ar putea fi legat de adsorbția pe drojdie și hidroliza chimică. Cele mai mari concentrații de alcooli superiori au fost găsite în vinurile spumante produse cu *Saccharomyces cerevisiae* + *Torulaspora delbrueckii* (27,50 mg/L). Vinurile spumante obținute cu *Saccharomyces cerevisiae* și *Starmerella bacillaris* s-au evidențiat prin note picante, aromă de pâine prăjită, prospețime și miros floral.

Pérez-Magariño ș.a. (2013) au studiat compoziția volatilă a unor vinuri-bază albe și rosé, elaborate din diferite soiuri de struguri autohtone din Spania (Verdejo, Viura, Malvasía, Albarín, Godello, Prieto Picudo și Garnacha), cât și calitatea vinurilor spumante obținute după metoda *Champenoise*. În acest sens, s-a analizat cantitatea aminoacizilor și a aminelor biogene. Rezultatele au evidențiat că atât vinurile-bază, cât și cele spumante obținute din soiurile Albarín, Verdejo, Godello și Prieto Picudo au prezentat cel mai bogat profil volatil, evidențiindu-se concentrații ridicate de esteri etilici și acetati ai alcoolilor, compuși care contribuie la definirea aromei fructate a vinurilor. În timpul învechirii pe drojdie în butelie s-a observat o creștere a esterilor etilici ramificați, a lactatului de etil și γ -butirolactonei, dar și o scădere a terpenelor (în principal citronellol și geraniol). Vinurile Albarín și Prieto Picudo au prezentat cel mai mare conținut de concentrație de aminoacizi. În general, nivelurile de amine biogene din toate vinurile spumante studiate au fost foarte scăzute, ceea ce confirmă calitatea și siguranța probelor.

González-Royo ș.a. (2014) s-au focusat pe evaluarea influenței inoculării secvențiale a unor levuri non-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*) și *Saccharomyces cerevisiae* asupra compoziției și calității vinului-bază. Rezultatele au indicat o creștere a concentrației de glicerol la probele obținute cu *Torulaspora delbrueckii* Biodiva™ (Lallemand Œnology, Franța) dar și o reducere a acidității volatile. Cu toate acestea, s-a remarcat un efect pozitiv asupra capacității de spumare și a persistenței spumei. Pe de altă parte, tulpina *Metschnikowia pulcherrima* Flavia® MP346 (Murphy & Son Limited, UK) a determinat atât o creștere a persistenței spumei, cât și o modificare semnificativă a profilului aromatic, intensificând notele de fum și aroma florală.

Martí-Raga ș.a. (2017) a urmărit efectul conținutului de azot asupra desfășurării celei de-a doua fermentații. Au fost analizate astfel trei tulpini diferite și la două temperaturi de fermentație diferite (12 °C și respectiv, 16 °C). Rezultatele arată că necesarul de azot în timpul celei de-a doua fermentații este foarte scăzut și pun sub semnul întrebării practica oenologică obișnuită de a adăuga azot la vinul de bază înainte de fermentare, ceea ce nu face decât să îmbunătățească cinetica de fermentație în vinurile foarte sărace în azot (sub 30 mg/L). Acest studiu s-a concentrat pe factorii care afectează desfășurarea celei de-a doua fermentații, deși efectele acestora asupra vinului spumant, impactul acelor factori asupra autolizei și caracteristicile organoleptice ale produsului final după perioada de maturare rămân de stabilit.

Benucci (2019) a evaluat efectul condițiilor de păstrare după îmbuteliere asupra caracteristicilor cromatice și a profilului senzorial ale unor vinuri spumante rosé. În acest sens, probele au fost îmbuteliate în vase Antique Green timp de 9 luni după etapa de degorjare. S-au aplicat diferite condiții de păstrare, eșantionat, la temperaturi diferite și grad de iluminare diferite (30 °C pe întuneric, la 5 °C pe întuneric și la 5 °C sub iradiere UV). Rezultatele au indicat o variație considerabilă a intensității culorii și a nuanței în comparație cu valorile inițiale. În cazul variantelor păstrate sub iradiere UV, s-a evidențiat o reducere importantă a intensității culorii (- 22 %), cât și o creștere considerabilă a nuanței (+ 46 %). Vinurile spumante păstrate la 30 °C, pe întuneric, au înregistrat o creștere cu atât 16 % a intensității culorii și cu 33 % a nuanței. Variantele menținute la 5 °C, în întuneric, s-au caracterizat printr-o creștere creștere cu doar 4 % a intensității culorii și cu 9 % a nuanței. Toate probele au prezentat diferențe semnificative în ceea ce privește profilul senzorial. Astfel, prima categorie de vinuri spumante (30 °C, în întuneric) s-a evidențiat prin notele intense de ars, pe când ultima categorie de probe (5 °C, iradiere UV) au prezentat arome neplăcute, precum mirosul de lână umedă.

Caliari ș.a. (2014) a comparat vinuri spumante obținute din soiul Moscato Giallo produs prin metode tradițională, Charmat și Asti. Lucrarea s-a focusat pe analiza profilului volatil a probelor finale. Vinurile spumante produse prin metoda tradițională au avut cea mai mare concentrație de compuși volatili (în special 2-feniletanol, octanoat de etil, linalol și α -terpineol), iar cele produse prin metoda Asti au prezentat cele mai mici concentrații. Analiza componentelor principale a confirmat efectul major al metodelor de producție asupra compoziției volatile a vinurilor spumante Moscato Giallo. Aceste rezultate indică faptul că metoda utilizată pentru producerea vinurilor spumante a influențat semnificativ compoziția volatilă a produsului final.

**PARTEA A II-A: CONTRIBUȚII PROPRII PRIVIND INFLUENȚA
DIFERITELOR SUȘE DE LEVURI ASUPRA CALITĂȚII
VINURILOR SPUMANTE OBȚINUTE PRIN METODA
TRADIȚIONALĂ**

**PART II: OWN CONTRIBUTIONS REGARDING THE INFLUENCE
OF DIFFERENT YEASTS ON THE QUALITY OF SPARKLING
WINES OBTAINED THROUGH THE TRADITIONAL METHOD**

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI, CADRUL NATURAL, INSTITUȚIONAL ȘI ORGANIZATORIC, MATERIALELE ȘI METODE UTILIZATE

3. THE PURPOSE AND OBJECTIVES OF THE STUDY, THE NATURAL, INSTITUTIONAL AND ORGANIZATIONAL FRAMEWORK, MATERIALS AND METHODS

3.1. Scopul și obiectivele studiului

Potrivit lui Pușcă (1985), prin calitatea unui vin se înțelege un ansamblu de proprietăți gustative plăcute, care variază în raport cu compoziția chimică a acestuia.

Tendința consumatorilor contemporani este de a se orienta spre produsele cu o concentrație alcoolică redusă. **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.** În plus, vinul de bază a fost obținut prin osmoză inversă, având o concentrație alcoolică prestabilită, menținându-l la un nivel mai scăzut.

În acest sens, au fost utilizați struguri Muscat Ottonel, recoltați în toamna anului 2015 din 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. **Prezenta cercetare se focusează pe evaluarea unor constituenți chimici (acizi organici, ioni metalici, compuși volatili), dar și pe evaluarea profilului senzorial al vinurilor spumante obținute.**

Rezultatele prezentate contribuie la completarea, îmbunătățirea și deci, îmbogățirea literaturii de specialitate în domeniul temei abordate, cât și la optimizarea tehnologiilor de vinificație existente.

Pentru îndeplinirea scopului general, protocolul experimental a presupus stabilirea următoarelor **obiective specifice:**

- 1) studierea literaturii de specialitate și selectarea unei baze de date relevante;
- 2) stabilirea protocolului experimental și a activităților specifice;
- 3) realizarea probelor de vin spumant propuse de protocolul experimental;
- 4) analiza proprietăților fizico-chimice generale ale probelor;
- 5) evaluarea nivelului de ioni metalici din vinurile spumante obținute;
- 6) analiza conținutului de acizi organici;
- 7) determinarea principalilor compuși volatili din probele finale;

- 8) studiul caracteristicilor senzoriale ale variantelor analizate, cu ajutorul degustătorilor autorizați;
- 9) interpretarea statistică a datelor și compararea acestora cu rezultatele altor autori.

3.2. Cadrul natural, instituțional și organizatoric

3.2.1. Descrierea cadrului natural

Regiunea viticolă Iași-Copou (Figura 3.1) este descrisă prin altitudini de peste 200 m (Breazu), cu dealuri separate de văi, platouri largi și ușor înclinate. Condițiile de sol (cernoziomuri cambice, soluri antropice, soluri cenușii), climă (climat temperat-continental) și factorii pedologici și litologici (marne, argile, cu regiuni nisipoase, gresii calcaroase, pietrișuri, conglomerate, calcare oolitice etc) specifici regiunii geografice sunt prielnici culturii de viță de vie.



Figura 3.1: Evidențierea arealului geografic al podgoriei Iași-Copou, România
Figure 3.1: The geographical area of the Iasi Copou vineyard, Romania
(www.statiunea-viticola-iasi.ro)

Datele meteorologice înregistrate la stația meteo din cadrul Stațiunii de Cercetare și Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Iași - Copou în perioada 2015 au indicat o temperatură minimă anuală de -3,5 °C, aferentă lunii ianuarie. De cealaltă parte, valoarea maximă a fost înregistrată în luna iulie (30,4 °C), insolația medie fiind de 2054 ore. Nivelul de precipitații al anului studiat a variat de la 1,6 mm în decembrie și 66,4 mm în luna martie (Mustea ș.a., 2004; Oșlobeanu ș.a., 2021; Rotaru, 2009).

3.2.2. Prezentarea cadrului instituțional și organizatoric al studiului

Probele experimentale au fost realizate în cadrul cramei experimentale a Laboratorului de Oenologie ale Facultății de Horticultură, Universitatea pentru Științele Vieții „Ion Ionescu de a Brad” din Iași, în anul 2015. Prezenta cercetare se axează pe evaluarea unor constituenți chimici (acizi organici, ioni metalici, compuși volatili), dar și pe evaluarea profilului senzorial al vinurilor spumante obținute. Astfel analizele de laborator impuse de protocolul experimental au fost realizate în două etape, în cadrul laboratorului menționat. Instituția este poziționată în cadrul Stațiunii didactice experimentale Vasile Adamachi, fiind puse la dispoziție tot necesarul de echipamente (sistem de osmoză inversă, pompă de circulare, cisterne de macerație, filtre tangențiale etc.), spații pentru desfășurarea experimentului în condiții moderne (cramă), dar și pentru păstrarea probelor (beciul Adamachi). De asemenea, în ceea ce privește determinările de laborator, în cadrul USV Iași sunt disponibile echipamente pentru analiza parametrilor fizico-chimici de bază ai vinurilor spumante dar și aparate cu un înalt grad de sensibilitate (spectrofotometru UV-VIS, spectrofotometru de absorție atomică, sistem de lichid cromatografie, sistem de lichid cromatografie etc.).

3.2. Materiale și metode utilizate

3.2.1. Caracterizarea soiurilor de struguri analizate

Protocolul experimental a presupus obținerea unor vinuri spumante din soiul Muscat Ottonel, cultivat în Podgoria Iași-Copou (47°10' latitudine nordică, 27°35' longitudine estică). Soiul **Muscat Ottonel** a fost obținut din soiurile Chasselas doré și Muscat de Saumur, fiind cunoscut și sub denumirea de Tămâioasă Ottonel. Soiul se caracterizează în general printr-un conținut ridicat de glucide (între 190 g/L și 210 g/L, chiar 250 g/L – 270 g/L la fructele supramaturate) (Figura 3.2).



Figura 3.2: Struguri Muscat Ottonel (original)

Figure 3.2: Muscat Ottonel grapes (original)

Vinurile Muscat Ottonel prezintă în general culoare galben verzui, în cazul celor tinere, până la nuanțe chihlimbarii, la cele învechite. Fiind un soi aromat, vinul rezultat se remarcă de cele mai multe ori printr-un profil senzorial complex, delicat, cu persistență lungă. Datorită acidității specifice mici, soiul Muscat Ottonel se pretează utilizării în combinației cu alte soiuri cu aciditate ridicată (Călin, 2022; Rotaru, 2009).

3.2.2. Tehnologia de obținere a probelor

Protocolul experimental a presupus obținerea a cinci variante de vin spumant. Strugurii au fost recoltați la maturitate deplină manual în toamna anului 2016 din podgoria Iași-Copou (47°10' latitudine nordică, 27°35' longitudine estică), România.

Vinul experimental (V0) a avut 12,5 % vol. alc. iar osmoza inversă a fost folosită pentru obținerea vinului de bază (V0'), cu o concentrație alcoolică predeterminată (10,5 % vol.). Principalele etape de obținere a vinului-bază sunt ilustrate în Figura 3.3.



Figura 3.3: Procesarea strugurilor în vederea obținerii vinului-bază (original)

Figure 3.3: Processing of grapes to obtain the base wine (original)

Procedeul de osmoză inversă include utilizarea unei membrane selective și aplicarea presiunii înalte. Membrana selectivă poate fi realizată din diferite materiale, dar dimensiunea porilor ei nu poate depăși 1 nm, sau 200 Da (rețin molecule cu o greutate moleculară mai mare de 200 g/mol). Intervalul de presiune variază în vinificație de la 2,0 la 6,0 MPa sau chiar mai mare, dacă este necesar. Când se aplică o presiune ridicată, membrana împarte proba în două fracțiuni, cea care este reținută pe membrană (retentat sau concentrat) și cea care trece prin aceasta (permeat).

Presiunea ridicată este necesară pentru a depăși presiunea osmotică care este creată pe suprafața membranei de moleculele care sunt reținute pe aceasta. Permeatul de vin conține, de obicei, molecule mici, mai ales apă și etanol, dar și câțiva compuși mici de aromă sau acizi organici. Unul dintre cele mai mari dezavantaje ale procedurii de osmoză inversă este limitarea procesului din cauza polarizării concentrației și a colmatării membranei. Cu toate acestea, tehnica prezintă mai multe avantaje comparativ cu metodele termice, cum ar fi selectivitatea ridicată, consumul redus de energie și costul scăzut (Ivit ș.a., 2022). În Figura 3.4 sunt prezentate etapele tehnologice aplicate pentru obținerea vinului spumant.

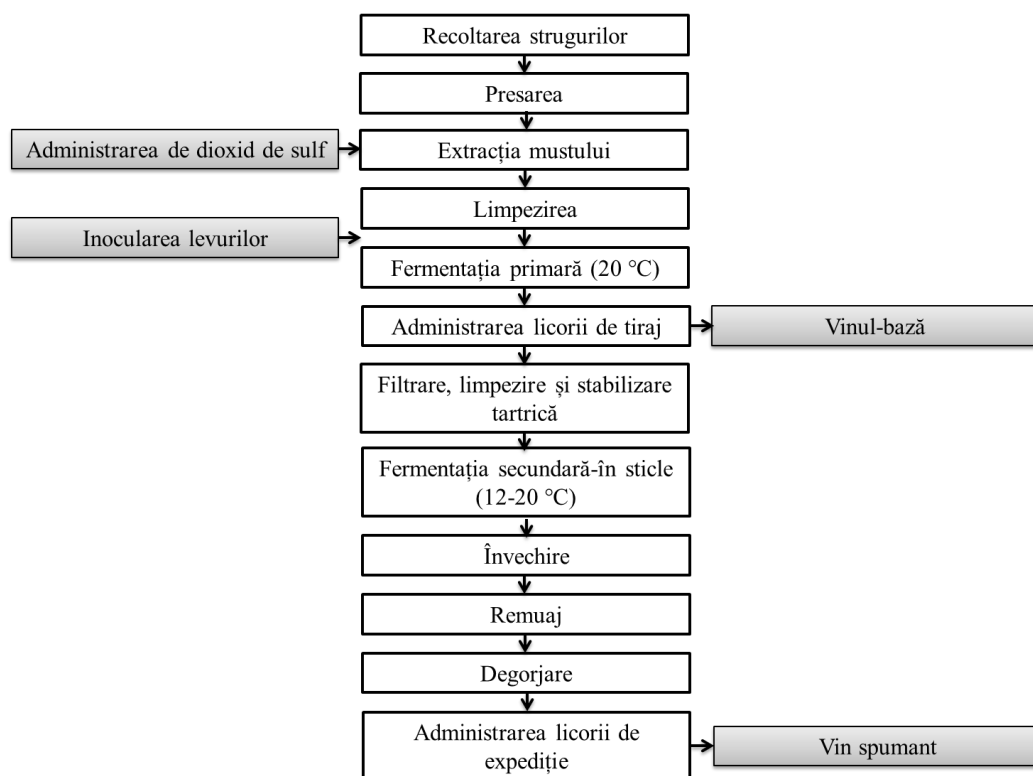


Figura 3.4: Etapele tehnologice ale obținerii procelor experimentale (original)

Figure 3.4: Technological stages of obtaining experimental trials (original)

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 fermentația alcoolică primară a fost adăugat amestecul de tiraj (amestec de levuri selectate, zahăr alimentară și vin), amestecul experimental fiind apoi îmbuteliat (Figura 3.5).

Conținutul de zaharuri reziduale determină atât intensitatea gustului dulce al vinului, cât și presiunea acestuia în butelii. Fermentația secundară a avut loc în butelii, fiind inoculate diferite levuri comerciale, după cum urmează:

- IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); - V1;
- IOC DIVINE™ (IOC, Mardeuil, Franța)- V2;
- LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia) - V3;
- IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța) - V4.



Figura 3.5: Dopuirea buteliilor în vederea defășurării fermentației secundare (original)

Figure 3.5: Filling the bottles for secondary fermentation (original)

IOC FIZZ™ conține peste 10^{12} celule/g *Saccharomyces cerevisiae*, conceput spre a fi utilizat la obținerea vinurilor spumante. Produsul se caracterizează prin toleranță ridicată la alcool (14 % vol.), factor *killer* K2, își desfășoară activitatea la temperaturi cuprinse între 15 °C și 30 °C.

IOC DIVINE™ este un produs specializat pentru obținerea vinurilor spumante prin metoda tradițională, cu peste 10^{12} celule/g. Levurile din genul *Saccharomyces cerevisiae* necesită proporții scăzute de compuși cu azot, manifestă toleranță moderată la alcool (14 % vol. alc.) și asigură o autoliză rapidă.

LEVULIA CRISTAL™ constituie un produs oenologic specific obținerii vinurilor spumante elegante, obținute prin metoda tradițională. Conține peste 10^{10} CFU/g, desfășurându-și optim activitatea la valori ale temperaturii cuprinse între 13 °C și 20 °C. Produsul asigură în general o bună floculare în cea de-a doua fermentație și o bună toleranță la alcool (14,8 % vol. alc.).

IOC 18-2007™ poate fi utilizat atât pentru vinurile liniștite, cât și spumante. Produsul conține levuri de *Saccharomyces cerevisiae* (*bayanus*) și manifestă rezistență ridicată la etanol (rezistă la concentrații alcoolice de peste 15 % vol. alc.), prezintă tulpini *killer* K2, induce o bună producere a glicerolului (6 g/L). De asemenea, produsul generează producerea în cantități mici a dioxidului de sulf și producerea în proporții reduse a spumei. IOC 18-2007™ prezintă peste 10^{12} celule viabile/g. Activitatea optimă se desfășoară la temperaturi cuprinse între 10 °C și 30 °C.

Produsele analizate sunt utilizate în mod obișnuit pentru producția de vin spumant și sunt recomandate de *Institut OEnologique de Champagne* (IOC). Acestea au fost inoculate conform specificațiilor producătorului și ținând cont de recomandările legislației în vigoare (20 g/hL).



Figura 3.6: Poziționarea înclinată a buteliilor în vederea realizării remuajului (original)

Figure 3.6: Inclined positioning of the bottles to carry out the remuage (original)

Etapă de fermentație secundară și respectiv, de maturare (la 12 °C) a durat 15 luni. În acest timp, depunerile de drojdie s-au poziționat la nivelul gâtului buteliei. În acest sens, procesul de remuaj (Figura 3.6) a fost realizat prin rotirea manuală a fiecărei butelii timp de 15 zile. Înclinarea buteliilor se modifică progresiv până când acestea ajung perpendiculare pe suport.

Degorjarea a fost efectuată prin congelare la -25 °C părții superioare a buteliei, facilitând eliminarea sedimentului prin presiunea încorporată în butelii (Figura 3.7).

În continuare, a fost adăugat amestecul de expediție (dozaj). La final, buteliile au fost îmbuteliate și etichetate conform Figurii 3.8.



Figura 3.7: Eliminarea sedimentului prin degorjare

Figure 3.7: Sediment removal by degorging
(www.champagne-mandois.fr)



Figura 3.8: Etichete utilizate pentru probele experimentale (original)

Figure 3.8: Labels used for experimental samples (original)

Probele au fost depozitate în condiții controlate (70 % umiditate, temperatură de 8 °C și fără expunere la lumină) și analizate după aproximativ 6 luni (Figura 3.9).



Figura 3.9: Depozitarea probelor (original)
Figure 3.9: Sample storage (original)

3.2.3. Metode de analiză aplicate

Parametrii fizici-chimici au fost efectuați conform metodelor propuse de Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV, 2020), după cum urmează:

- aciditatea totală (g/L acid tartric) și aciditatea volatilă (g/L acid acetic) prin metode titrimetrice;
- concentrația alcoolică (folosind un aparat Dujardin-Salleron D.E. Model 2000 pentru distilarea simplă; % vol. alc.);
- pH-ul și densitatea (folosind instrumente specifice);
- nivelul de zaharuri reducătoare (g/L) - prin metoda Luff – Schoorl;
- conținutul de dioxid de sulf liber și total (mg/L), prin metoda iodometrică;
- extractul sec nereducător (g/L), cu ajutorul formulei Tabarié.

Pentru **determinarea metalelor**, probele de analizat au fost diluate pentru a reduce salinitatea acestora sub 1 %. În cazul tehnicii utilizate, s-au adăugat tampoane de ionizare. Toate măsurătorile au fost efectuate folosind un spectrofotometru Agilent MP-AES 4200, cu emisie atomică și prevăzut cu plasmă cu microunde. Aparatul de lucru este echipat cu sistemul standard de introducere a eșantioanelor. Parametrii de lucru pentru determinarea metalelor din vinurile spumante obținute sunt prezentați în Tabelul 3.1.

Determinarea acizilor organici s-a realizat cu ajutorul unui sistem de lichid cromatografie Shimadzu, seria 20 și în conformitate cu metoda prevăzută de Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV, 2020 - OIV-MA-AS313-04). Astfel, acizii organici

au fost analizați prin lichid cromatografie, utilizând o coloană de silice grefată cu octil (pentru acizii tartric și malic) și una cu rășini schimbătoare de ioni (pentru acizii citric și lactic) drept faze staționare. Parametri de lucru pentru evaluarea acizilor organici prin lichid cromatografie sunt prezentați în Tabelul 3.2.

Analiza compușilor volatili. Cuantificarea compușilor volatili a fost realizată prin gaz-cromatografie, cu ajutorul unui sistem Agilent 7890A (Agilent Technologies, Delaware, USA) - Figura 3.10, cuplat cu un spectrofotometru de masă Agilent, model MSD 5975 (Agilent Technologies, Delaware, SUA) și detector de ionizare în flacără. Datele au fost prelucrate cu ajutorul software-ului Chemstation (Agilent Technologies, Delaware, SUA) și Maestro (Gerstel, Mülheim an der Ruhr, Germania). Evaluarea compușilor de aromă a fost realizată după metoda prezentată de Vararu ș.a. (2016).



Figura 3.10: Sistem de gaz-cromatografie Agilent 7890A
Figure 3.10: Agilent 7890A Gas-Chromatography system
(www.agilent.com)

Pentru analiză, s-au măsurat 10 mL din fiecare probă de analizat și s-au amestecat cu 0,2 g CaCO_3 – carbonat de calciu și standard intern (0,5 mL). Amestecul obținut a fost omogenizat prin centrifugare (5000 rot./min.) la temperatură scăzută (4 °C), rezultând astfel separarea fracțiilor. Cu ajutorul unei micropipete s-au măsurat 0,5 μL din fracția superioară (supernatant) și s-au introdus în injectorul aparatului de analiză. Repetabilitatea volumului injectat a fost asigurată de un *liner* tubular, de 4 mm diametru. Rata de splitare a fost prestabilită la 1:30, iar temperatura de lucru a injectorului a fost de 275 °C. Sistemul gaz cromatografic a fost prevăzut cu o coloană de tip CPWAX-57CB (Agilent Technologies, Delaware, SUA). Temperatura cuptorului a fost presetată în primele 15 minute la 50 °C, fiind mărită cu câte 4 °C la fiecare minut, până la 195 °C, unde s-a menținut pentru 35 de minute. Faza mobilă – heliu – a prezentat un debit de 0,5 mL pe minut în primele 16 minute, urmând ca mai apoi, să fie mărit gradual, până la 1,1 mL pe minut.

Tabelul 3.1: Parametri de lucru pentru evaluarea metalelor prin lichid cromatografie

Table 3.1: Working parameters for the evaluation of metals by liquid chromatography

Elementul studiat	Lungimea de undă λ (nm)	Fluxul nebulizator (L/min)	Debitul de injecție a aerului	Factorul de diluție	Domediul linear $r^2 \geq 0,995$
Zinc	213.857	0,45	mediu	1/10	10-200 ppb
Fier	371.993	0,65	ridicat	1/10	3-500 ppb
Cupru	324.754	0,7	ridicat	1/10	3-2000 ppb
Nichel	352.454	0,7	ridicat	1/10	5-2000 ppb
Plumb	405.781	0,75	ridicat	1/10	25-2000 ppb
Mangan	403.076	0,9	ridicat	1/10	3-500 ppb
Magneziu	285.213	0,9	mediu	1/100	5-2000 ppb
Calciu	396.847	0,6	ridicat	1/100	25-300 ppb
Sodiu	589.592	0,95	ridicat	1/100	0,25-5 ppm
Potasiu	769.897	0,75	ridicat	1/100	0,1-5 ppm

Tabelul 3.2: Parametri de lucru pentru evaluarea acizilor organici prin lichid cromatografie

Table 3.2: Working parameters for the evaluation of organic acids by liquid chromatography

Acizii organici analizați	Acidul citric, lactic, acetic	Acidul fumaric, succinic, shikimic, malic, lactic, tartric
Coloana	Coloană cu rășină schimbătoare de ioni H^+ : - 300 mm - lungime; - 7,8 mm - diametru intern; - 9 μm - diametrul particulelor.	Două coloane poziționate în serie, cu compoziție de silice grefată cu grupări octil: - 250 mm - lungime; - 4 mm - diametru intern; - 5 μm - dimensiunea particulelor sferice.
Faza mobilă	Soluție de acid sulfuric 0,0125 mol/L	- KH_2PO_4 , 70 g/L - $(NH_4)_2SO_4$, 14 g/L, pH 2,1
Debitul de eluție	0,6 mL/min	0,8 mL/min
Temperatura	60-65 °C	20 °C

Identificarea propriu-zisă a compușilor s-a realizat prin compararea spectrului de masă cu spectrul obținut în cazul standardului, și pe baza bibliotecilor de date Wiley7N și Nist08. În Figura 3.11 se poate observa un exemplu de cromatogramă obținută la testarea prin gaz-cromatografie a probelor.

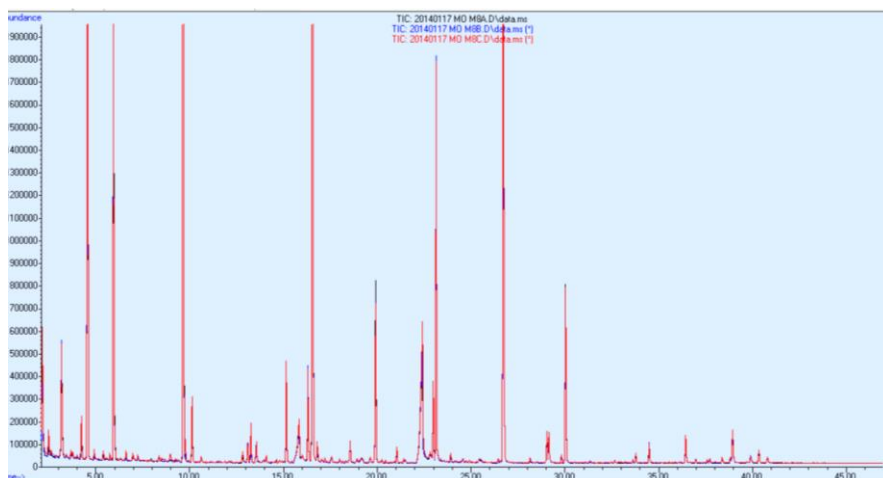


Figura 3.11: Exemplu de cromatogramă obținută la testarea vinurilor spumante (original)
Figure 3.11: Example of a chromatogram obtained when testing sparkling wines (original)

Evaluarea caracteristicilor senzoriale. Proprietățile senzoriale ale probelor obținute au fost evaluate de un panel de 20 de subiecți (reprezentat de degustători autorizați, vinificatori, personal de laborator și cercetători), conform condițiilor de degustare prevăzute de standardele în vigoare (OIV, 2015; ISO 8589:2010; ISO 3591:1997). În Figura 3.12 se prezintă organizarea sesiunii de evaluare senzorială a vinurilor spumante obținute.

Astfel, sesiunea de degustare a fost organizată începând cu ora 10⁰⁰, pentru a asigura o evaluare cât mai obiectivă. Probele au fost codificate corespunzător, prin acordarea de cifre, fără a se cunoaște tipul levurilor inoculate. Intensitatea unor descriptori senzoriali predeterminați a fost evaluată prin acordarea de note de la 0 – absent până la 5 – maxim. Au fost urmăriți descriptori precum: efervescența, caracterul vegetal, fructat (mere, piersici, banane verzi, pepene galben), floral (flori de soc), nota de drojdie, note de drojdie, toast, persistența, textura, gustul amar, dulce și gustul acid.

Analiza statistică a datelor s-a făcut cu ajutorul software-ului XL-Stat. Analiza varianței a evidențiat existența unor diferențe semnificative în probele studiate, în funcție de tipul levurii inoculate pentru cea de-a doua fermentație. Analiza post-hoc Tukey HSD izolează variabilele diferite din cadrul unui eșantion iar Analiza Componentelor Principale evidențiază corelațiile existente între diferitele perechi de variabile, în funcție de factorii de influență – levurile inoculate.



Figura 3.12: Organizarea sesiunii de evaluare senzorială a probelor experimentale (original)
 Figure 3.12: Organization of the sensory evaluation session of the experimental samples (original)

4. REZULTATELE CERCETĂRII PRIVIND INFLUENȚA LEVURILOR ASUPRA CALITĂȚII VINURILOR SPUMANTE OBTINUTE

4. RESEARCH RESULTS REGARDING THE INFLUENCE OF YEASTS ON THE QUALITY OF SPARKLING WINES

4.1. Contribuția levurilor asupra parametrilor fizico-chimici

Rezultatele analizelor fizico-chimice ale vinurilor spumante analizate sunt prezentate în Tabelele 4.1 și 4.2. Valorile acestora 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 în la 11 luni de la producerea probelor, comparativ cu rezultatele înregistrate la 6 luni.

În ceea ce privește densitatea și aciditatea titrabilă, se pot observa diferențe semnificative între variantele de vin spumant și vinul-bază utilizat pentru producerea acestuia. Probele experimentale finale (vinurile spumante) au prezentat cea mai mare aciditate totală în V2 - IOC DIVINE™ și V3 - LEVULIA CRISTAL™ (6,9 g/L acid tartric), iar cea mai mică valoare a fost înregistrată în varianta V4 - IOC 18-2007™ (6,6 g/L acid tartric). Nivelul pH-ului nu a fost influențat de tipul de levuri inoculate pentru fermentația secundară. La 11 luni de păstrare, s-au înregistrat scăderi minore ale valorii densității, a zaharurilor reducătoare, dar și a acidității vinurilor spumante, comparativ cu rezultatele obținute inițial (la 6 luni).

Cea mai scăzută producție de SO₂ a fost înregistrată în variantele V2 - IOC DIVINE™ (49 mg/L) și V3 - LEVULIA CRISTAL™ (51 mg/L) pentru prima etapă de analize (6 luni) Cantitatea de SO₂ se diminuează în timp, valorile fiind ușor mai scăzute la 11 luni de păstrare. În ceea ce privește aciditatea volatilă, proba V2 - IOC DIVINE™ a afișat cea mai mare valoare (0,35 g/L acid acetic), înregistrând diminuări majore pe perioada păstrării (de la 6 la 11 luni).

În general, toate levurile au reușit să finalizeze fermentația (conținut de zaharuri reziduale sub 2 g/L). Cantitatea de zaharuri totale (0,7–3,4 g/L) în variantele V2 - IOC DIVINE™ și V3 - LEVULIA CRISTAL™ este aproximativ două ori mai mare comparativ cu probele V1 - IOC FIZZ™ și V4 - IOC 18-2007™. 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 nereductor au valori dependente, cu diferențe importante între eșantioane. Rezultate comparabile au fost prezentate de Benucci și Esti (2020).

Analiza varianței a indicat diferențe semnificative între caracteristicile 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 ne semnificative 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.

Datele indică o influență minoră asupra calității fizico-chimice la probele în care s-au inoculat levuri. Cele mai mari diferențe s-au remarcat în funcție de momentul determinării (6 luni și 11 luni), dar și între proba martor și variantele cu levuri. În Tabelele 4.3 și 4.4 sunt prezentate comparativ rezultatele testului post-hoc.

Tabelul 4.1: Parametri fizico-chimici generali ai probelor după 6 luni de păstrare
Table 4.1: General physico-chemical parameters of the samples after 6 months of storage

Variante	Densitate	Aciditate titrabilă (g/L acid tartric)	Aciditate volatilă (g/L acid acetic)	Concentrație alcoolică (% vol.)	SO ₂ liber (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Zaharuri reziduale (g/L)	Extract sec nereducător (g/L)	pH
V0	0,9932±0,0001	6,3±0,00	0,30±0,00	12,5±0,01	18±0,10	72±0,47	3,4±0,13	17,0±0,14	2,9±0,00
V0'	0,9921±0,0001	6,2±0,01	0,30±0,01	10,5±0,00	17±0,00	71±0,00	3,2±0,07	15,2±0,13	2,8±0,00
V1	0,9905±0,0000	6,7±0,01	0,30±0,01	11,6±0,02	5±0,00	56±0,40	0,7±0,02	14,5±0,02	3,1±0,00
V2	0,9908±0,0001	6,9±0,00	0,35±0,01	11,3±0,00	5±0,00	49±0,20	1,9±0,01	13,3±0,05	3,2±0,00
V3	0,9906±0,0001	6,9±0,00	0,30±0,00	11,6±0,00	5±0,14	51±0,47	1,9±0,01	13,5±0,01	3,0±0,00
V4	0,9907±0,0000	6,6±0,01	0,30±0,00	11,3±0,01	8±0,14	64±0,00	0,7±0,02	14,3±0,00	3,0±0,00
Valoarea Pearson (V1-V4)	0,1376 ^{ns}	0,0901 ^{ns}	0,0168*	0,0181*	0,0000***	0,0211*	0,0000***	0,0000***	0,0000***
Valoarea Pearson (V0-V4)	0,0001***	0,0000***	0,0195*	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***	0,0000***

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.2: Parametri fizico-chimici generali ai probelor analizate la 11 luni
Table 4.2: General physico-chemical parameters of the samples analyzed at 11 months

Variante	Densitate	Aciditate titrabilă (g/L acid tartric)	Aciditate volatilă (g/L acid acetic)	Concentrație alcoolică (% vol.)	SO ₂ liber (mg/L)	SO ₂ total (mg/L)	Zaharuri reziduale (g/L)	Extract sec nereducător (g/L)	pH
V0'	0,9920±0,0001	6,24±0,01	0,25±0,01	10,6±0,00	17±0,10	70±0,07	2,1±0,05	13,2±0,10	2,8±0,00
V1'	0,9904±0,0000	6,50±0,00	0,26±0,01	11,8±0,00	4±0,00	51±0,05	0,6±0,01	11,5±0,04	3,1±0,00
V2'	0,9907±0,0001	6,50±0,01	0,23±0,02	11,5±0,01	4±0,00	41±0,10	1,1±0,19	12,3±0,07	3,2±0,00
V3'	0,9905±0,0001	6,50±0,00	0,24±0,00	11,1±0,00	6±0,28	42±0,20	1,5±0,19	10,5±0,02	3,0±0,00
V4'	0,9906±0,0000	6,40±0,01	0,33±0,00	11,8±0,01	6±0,28	61±0,00	0,7±0,02	12,3±0,01	3,0±0,00
Valoarea Pearson (V1'-V4')	0,1376 ^{ns}	0,0013 ^{**}	0,0105 [*]	0,0060 ^{***}	0,0007 ^{***}	0,0007 ^{***}	0,0008 ^{***}	0,0000 ^{***}	0,0000 ^{***}
Valoarea Pearson (V0'-V4')	0,0001 ^{***}	0,0000 ^{***}	0,0074 ^{**}	0,0000 ^{***}	0,0000 ^{***}	0,0000 ^{***}	0,0004 ^{***}	0,0000 ^{***}	0,0000 ^{***}

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedeului de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.3: Rezultatele testului post-hoc Tukey HSD asupra parametrilor fizico-chimici determinați la 6 luni de păstrare

Table 4.3: Tukey HSD post hoc test results on the determined physicochemical parameters on 6 months of storage

Perechi analizate		Densitate	Aciditatea titrabilă	Aciditatea volatilă	Concentrația alcoolică	SO ₂ liber	SO ₂ total	Zaharuri reducătoare	Extract sec nereducător	pH
6 luni	V0' - V1	0,0010**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V0' - V2	0,0010**	0,0010**	0,0303*	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V0' - V3	0,0010**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V0' - V4	0,0010**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V2	0,1776 ^{ns}	0,0010**	0,0303*	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V3	0,8742 ^{ns}	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V4	0,4515 ^{ns}	0,0014**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0199*	0,0010**
	V2 - V3	0,4515 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0303*	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0233*	0,8999 ^{ns}	0,0199*	0,0010**
	V2 - V4	0,8742 ^{ns}	0,0010**	0,0303*	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V3 - V4	0,8742 ^{ns}	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,5566 ^{ns}

Analiza post hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.4: Rezultatele testului post-hoc Tukey HSD asupra parametrilor fizico-chimici determinați la 11 luni de păstrare

Table 4.4: Tukey HSD post hoc test results on physicochemical parameters determined at 11 months of storage

	Perechi analizate	Densitate	Aciditatea titrabilă	Aciditatea volatilă	Concentrația alcoolică	SO ₂ liber	SO ₂ total	Zaharuri reducătoare	Extract sec nereducător	pH
11 luni	V0' - V1	0,0002**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V0' - V2	0,0007**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0030**	0,0010**	0,0010**
	V0' - V3	0,0003**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0277*	0,0010**	0,0010**
	V0' - V4	0,0005**	0,0010**	0,0183*	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V2	0,2529 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,4058	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0561 ^{ns}	0,0010**	0,0010**
	V1 - V3	0,9231 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,6974 ^{ns}	0,0010**	0,0030**	0,0010**	0,0048**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V4	0,5577 ^{ns}	0,0014**	0,0316*	0,8999 ^{ns}	0,0030**	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0010**
	V2 - V3	0,5577 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0030**	0,1698 ^{ns}	0,1208 ^{ns}	0,0010**	0,0010**
	V2 - V4	0,9231 ^{ns}	0,0014**	0,0070**	0,0010**	0,0030**	0,0010**	0,1208 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**
	V3 - V4	0,9231 ^{ns}	0,0014**	0,0111*	0,0010**	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,0082**	0,0010**	0,5566 ^{ns}

Analiza post hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4).

V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

4.2. Influența levurilor asupra conținutului de metale din vinurile spumante

Profilul ionilor metalici al vinurilor spumante joacă un rol important în modularea atributelor senzoriale ale acestora. Aceasta se datorează în principal reacțiilor de oxidoreducere, care influențează caracteristicile organoleptice precum culoarea vinului, aroma și astringența. Conținutul în compuși volatili asociați cu arome „reductive” - nefavorabile este influențat în mare măsură de concentrațiile reziduale ale ionilor metalici. Unii autori au confirmat importanța ionilor aluminiu - Al, cupru - Cu, fier - Fe și zinc - Zn în formarea unor astfel de compuși (de exemplu, hidrogen sulfurat și metantiole) (Viviers ș.a., 2013; Tariba, 2011). Ionii metalici Al, Cu, Fe, Zn, cobalt - Co, mangan - Mn și nichel - Ni au capacitatea de a cataliza reacții redox legate de oxidarea vinului (Kreitman ș.a., 2016), precum și turbiditatea și formarea turburelii. Mai mult, conținutul în ioni metalici a vinurilor poate fi utilizată pentru a determina autenticitatea acestora, ceea ce face esențială înțelegerea modului în care practicile de vinificație pot influența profilurile ionilor metalici reziduali în vinurile spumante (Pohl, 2007).

Factorii care afectează concentrațiile reziduale de ioni metalici din vinurile finite includ absorbția din sol (de exemplu, Al, bariu - Ba, litiu - Li, magneziu - Mg, molibden - Mo) (Volpe ș.a., 2009). Aceste elemente pot fi introduse în vin și ca urmare a administrării unor tratamente agrochimice asupra culturii de viță de vie (calciu - Ca, potasiu - K, sodiu - Na, Zn), a poluării mediului (cadmiu - Cd, Co, crom - Cr, mercur - Hg), a absorbției din echipamentele de vinificație (de exemplu, Al, Cd, crom - Cr, Cu, Fe, Zn), precum și prin administrarea agenților de limpezire – bentonită, sulfat de cupru (de exemplu, Al, Ca, Zn, Cr, Cu, Cd, Fe) (Pohl, 2007; Hopfer ș.a., 2015; Bekker, Day și Smith, 2019).

Concentrațiile metalelor în probele analizate sunt ilustrate în Tabelele 4.5 și 4.6. Compoziția metalelor din vin în timpul fermentației, maturării și depozitării nu este stabilă (Cotea ș.a., 2009). Astfel, nivelul acestor compuși prezintă o importanță majoră asupra caracteristicilor de calitate și a stabilității vinurilor liniștite, dar și spumante. De exemplu, ionii de Ca, Mg, K și Na sunt implicați în metabolismul celular al levurilor prin menținerea nivelului corect de pH și al echilibrului ionic. Rezultatele arată o variabilitate evidentă a conținutului ionilor metalici menționați. 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, Mg și Zn (Cotea ș.a., 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. Acest fenomen ar putea sugera susceptibilitatea probelor de vin la apariția turburelii sau a sedimentării, precum și deprecierea calității senzoriale, corelate cu acțiunea catalitică și oxidativă ale cationilor studiați (în special Fe și Cu).

În ceea ce privește nivelul de plumb – Pb, cea mai mare valoare fost înregistrată în V3'. Galani-Nikolakaki ș.a (2002) au presupus că contaminarea cu acest compus în vinurile analizate se datorează probabil poluării mediului în urma noxelor emise de mașini, dar și din cauza contaminării în timpul procesului de vinificație. Același lucru a fost sugerat de Mena ș.a. (1997) care au găsit, de asemenea, o diferență semnificativă între concentrația de plumb a vinurilor roșii și albe.

În ceea ce privește conținutul de fier - Fe din vinuri, principala problemă care apare este instabilitatea vinurilor când concentrația acestui ion metalic este mai mare de 10 mg/L. 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 (Tabelele 4.5 și 4.6) evidențiază o influență semnificativă a conținutului de metale în funcție de tipul levurilor inoculate. De asemenea, testul post-hoc (Tabelele 4.7 și 4.8) 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).

Tabelul 4.5: Conținutul de ioni metalici din probele experimentale analizate (μg/L)

Table 4.5: The content of metal ions in the analyzed experimental samples (μg/L)

Variante		K	Valoarea <i>Pearson</i>	Ca	Valoarea <i>Pearson</i>	Mg	Valoarea <i>Pearson</i>	Na	Valoarea <i>Pearson</i>
V0'		139,92±0,01		28,24±0,02		249,02±0,01		296,00±0,03	
6 luni	V1	553,07±0,01	0,0000***	124,77±0,02	0,0000***	28,77±0,01	0,0007***	37,58±0,02	0,0000***
	V2	547,27±0,01		126,00±0,02		28,82±0,02		43,38±0,01	
	V3	545,52±0,01		126,82±0,00		28,60±0,02		40,23±0,02	
	V4	556,61±0,02		127,27±0,02		28,57±0,00		38,02±0,05	
11 luni	V1'	530,54±0,01	0,0000***	126,29±0,02	0,0000***	28,87±0,00	0,0000***	24,20±0,04	0,0000***
	V2'	552,17±0,01		124,71±0,00		28,64±0,02		21,76±0,01	
	V3'	551,09±0,01		124,62±0,01		28,36±0,01		24,78±0,02	
	V4'	527,52±0,01		124,65±0,00		28,17±0,03		24,26±0,00	

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.6: Conținutul de metale grele din probele experimentale analizate (μg/L)
Table 4.6: Heavy metal content of the analyzed experimental samples (μg/L)

Variante		Mn	Valoarea Pearson	Zn	Valoarea Pearson	Fe	Valoarea Pearson	Cu	Valoarea Pearson	Ni	Valoarea Pearson	Pb	Valoarea Pearson
V0*		668,84±0,02		326,03±0,01		1214,65±0,03		188,12±0,01		128,11±0,02		206,23±0,02	
6 luni	V1	708,76±0,02	0,0000***	380,09±0,01	0,0000***	1619,9±0,14	0,0000***	118,02±0,00	0,0000***	144,75±0,07	0,0000***	449,9±0,04	0,0000***
	V2	689,83±0,04		377,53±0,00		1457,47±0,00		124,59±0,00		140,74±0,01		nd	
	V3	696,18±0,01		387,35±0,03		1476,17±0,01		111,3±0,04		138,88±0,00		nd	
	V4	698,66±0,04		351,56±0,00		1433,72±0,02		113,2±0,02		145,96±0,01		558,74±0,01	
11 luni	V1'	706,65±0,02	0,0000***	216,30±0,01	0,0000***	1704,21±0,01	0,0000***	154,27±0,01	0,0000***	143,00±0,01	0,0000***	260,77±0,02	0,0000***
	V2'	712,17±0,00		361,69±0,03		1536,80±0,04		152,95±0,01		146,86±0,05		135,83±0,03	
	V3'	691,24±0,05		315,80±0,00		1487,92±0,02		118,25±0,02		144,69±0,01		631,85±0,01	
	V4'	701,20±0,02		212,54±0,05		1505,59±0,01		118,66±0,02		169,14±0,04		2,46±0,02	

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.7: Rezultatele testul Tukey HSD pentru principalii ioni metalici analizați
Table 4.7: Tukey HSD test results for the analyzed metal ions

Momentul analizei	Perechi comparate	K	Ca	Mg	Na
6 luni	V1 - V2	0,0010**	0,0010**	0,2281 ^{ns}	0,0010**
	V1 - V3	0,0010**	0,6578 ^{ns}	0,0045**	0,0010**
	V1 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0024**	0,0010**
	V2 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0017**	0,0010**
	V2 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V3 - V4	0,0010**	0,0010**	0,5538 ^{ns}	0,0010**
11 luni	V1 - V2	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,2486 ^{ns}
	V2 - V3	0,0010**	0,0160*	0,0010**	0,0010**
	V2 - V4	0,0010**	0,0380*	0,0010**	0,0010**
	V3 - V4	0,0010**	0,6236 ^{ns}	0,0029**	0,0010**

Analiza post-hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.8: Rezultatele testul Tukey HSD pentru metalele grele
Table 4.8: Tukey HSD test results for heavy metals

Momentul analizării	Perechi comparate	Mn	Zn	Fe	Cu	Ni	Pb
6 luni	V1 - V2	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V2 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	-
	V2 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V3 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
11 luni	V1 - V2	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V1 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V2 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V2 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**
	V3 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**

Analiza post-hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

4.3. Impactul levurilor asupra conținutului în acizi organici

Prezența principalilor acizi organici și concentrațiile acestora în probele de vinuri spumante analizate sunt prezentate în Tabelul 4.9.

Acizii organici din vin provin în special de la materia primă, în urma tratamentelor administrate sau pot fi formați în timpul desfășurării proceselor metabolice ale microorganismelor. Dintre acizii organici prezenți în struguri, cei mai abundenți în must și vin sunt acizii tartric și malic, în timp ce acidul citric se găsește de obicei în proporții mai mici. Acizii succinic, lactic și acetic constituie de regulă produși ai reacțiilor chimice (Robles ș.a., 2019). Acești compuși manifestă un rol esențial asupra procesului de vinificație și a calității produsului finit, manifestând o influență directă asupra caracteristicilor de culoare, dar și a percepției senzoriale. Cuantificarea acizilor organici din vinurile spumante permite monitorizarea proceselor chimice și microbiologice importante în diferitele etape ale vinificației (fermentații alcoolice și malolactice, procesul de maturare pe levuri etc.). Acești compuși au importanță în detectarea modificării și alterării vinurilor (Ivanova-Petropulos ș.a., 2020). În plus, acizii prezenți în vinuri asigură dezvoltarea și vitalitatea drojdiei în timpul fermentației și prezintă rol protector împotriva bacteriilor dăunătoare. Vinul poate asigura un aport important de acizi organici, care manifestă acțiuni benefice asupra sănătății consumatorilor (de exemplu, asigură absorbția fierului) (Teliban, 2021).

Un nivel optim de acizi organici asigură caracterul echilibrat, proaspăt și răcoritor al vinurilor, pe când proporțiile 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 cel tartric, aproximativ 90 % din totalul acizilor organici din vin (Robles ș.a., 2019). Probele analizate au prezentat valori cuprinse între 6,33 g/L (V1) și 6,46 g/L (V2) 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. În Tabelul 4.9 se poate observa o tendință crescătoare a concentrației acidului malic între 6 și 11 luni de păstrare a majorității variantelor, cu excepția probei V3, unde conținutul acestuia a înregistrat scăderi importante în timp. Acest fenomen se poate datora capacității diferite a fiecăreii levuri de a metaboliza acidul malic. Rezultatele evidențiază că probele care conțin cele mai mici cantități de acid malic, se caracterizează în general printr-un conținut mai ridicat de acid succinic, ca urmare a convertirii primului compus în cel ce-al doilea, sub acțiunea levurilor (Teliban, 2021). Variații similare ale concentrației acidului malic în vinurile liniștite au fost raportate de Teliban (2021).

După acidul malic, cel mai abundent compus a fost acidul tartric, cu o concentrație medie cuprinsă între 0,99 g/L și 5,97 g/L, valori similare celor publicate și de Jaganatik Korenica (2020), Caliari ș.a. (2014), Gallardo-Chacón ș.a. (2010) și Sartor ș.a. (2019).

Conform Tabelului 4.9, concentrațiile acestui compus rămân aproape constante între cele două momente de analiză (6 luni și 11 luni), înregistrându-se o ușoară scădere în cazul variantei V3 și creștere în proba V4. În general, acidul tartric nu este metabolizat în timpul proceselor biochimice desfășurate, dar diminuări cantitative pot fi înregistrate în cazul unor mecanisme fizico-chimice, cum ar fi precipitățile tartrice.

Alături de primii doi acizi prezentați, acidul citric contribuie semnificativ la definirea culorii și stabilității vinurilor spumante. Acest compus este important în procesele metabolice (ciclul Krebs), fiind folosit ca agent de acidificare în alimente și băuturi. La vinuri, o cantitate mai mare de acid citric permite decelarea falsificării (Ivanova-Petropulos ș.a., 2020). Acidul citric poate fi metabolizat parțial sau total de către bacteriile acidului lactic, fiind în continuare transformat în acid acetic. De asemenea, metabolismul acidului citric este responsabil pentru formarea diacetilului, acetoiniei și 2,3-butandiolului. Aroma de unt găsită în unele vinuri este produsă pe calea diacetilului (Waterhouse ș.a., 2016; Lima ș.a., 2015, 2020, 2022). Acidul citric a fost prezent în toate probele de vinuri spumante, în concordanță cu rezultatele publicate de Gallardo-Chacón ș.a. (2010) și în contradicție cu datele obținute de Caliaro ș.a (2015) și Sartor ș.a (2019) unde nu a fost detectat. 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. Rezultatele obținute indică valori mai mari ale acidului citric la vinurile spumante în comparație cu rezultatele obținute de Teliban (2021) în vinuri liniștite obținute din soiul Aligote.

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, fiind dependent de tulpina de levuri inoculate și variază în funcție de compoziția în azot a mediului (Waterhouse ș.a., 2016). Acidul succinic se formează în cazul levurilor *Saccharomyces cerevisiae* prin patru căi:

- (a) calea reductivă a ciclului acidului tricarboxilic;
- (b) calea oxidativă a ciclului tricarboxilic;
- (c) ciclul glioxilatului;
- (d) catabolismul aminoacizilor prin aspartat și glutamat (Ferreira și Mendes-Faia, 2019).

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.

Acidul shikimic poate fi identificat într-o gamă largă de fructe și poate oferi informații asupra trasabilității și autenticității vinurilor. Concentrațiile acestui compus au variat de la 4,14 mg/L (V1) la 4,61 (V4) mg/L în primul set de determinări (6 luni). Aceste valori au scăzut după 6 luni de păstrare la majoritatea probelor.

În vinurile spumante analizate, nivelul acidului fumaric a înregistrat o ușoară scădere odată cu creșterea timpului de păstrare. Astfel, se observă o reducere importantă la 11 luni de depozitare, comparativ cu rezultatele obținute la 6 luni.

Rezultatele nu au indicat diferențe majore în ceea ce privește concentrația principalilor acizi organici și valorile pH-ului. Într-o primă etapă (Tabelul 4.9), 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 (Tabelul 4.10) a evidențiat diferențe semnificative ($p < 0,05$) între mediile probelor V1-V2, V1-V4 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.

Tabelul 4.9: Acizii organici identificați în materia primă a vinului și în vinurile spumante analizate
Table 4.9: Organic acids identified in the raw material of the wine and in the analyzed sparkling wines

Variante		Acid malic (g/L)	Acid tartric (g/L)	Acid shikimic (mg/L)	Acid lactic (g/L)	Acid acetic (g/L)	Acid citric (g/L)	Acid succinic (g/L)	Acid fumaric (μg/L)
V0'		2,84±0,03	5,97±0,01	15,97±0,04	0,36±0,00	0,85±0,02	0,40±0,02	1,07±0,02	9,74±0,02
6 luni	V1	6,33±0,02	1,39±0,00	4,14±0,04	0,42±0,02	0,38±0,01	0,58±0,00	0,18±0,04	34,54±0,04
	V2	6,46±0,02	1,42±0,05	4,36±0,02	0,38±0,00	0,39±0,00	0,59±0,01	0,20±0,01	40,43±0,03
	V3	6,35±0,01	1,40±0,01	4,27±0,00	0,38±0,01	0,38±0,01	0,58±0,01	0,31±0,00	32,31±0,00
	V4	6,42±0,00	1,41±0,01	4,61±0,00	0,40±0,00	0,39±0,05	0,61±0,00	0,31±0,02	33,34±0,01
Valoarea Pearson (V1-V4)		0,0105*	0,7797 ^{ns}	0,0002***	0,1627 ^{ns}	0,9708 ^{ns}	0,1069 ^{ns}	0,0139*	0,0000***
11 luni	V1'	6,42±0,02	1,39±0,02	4,02±0,00	0,63±0,04	0,39±0,00	0,59±0,00	0,29±0,01	32,05±0,01
	V2'	6,63±0,00	1,42±0,00	4,29±0,01	0,60±0,00	0,38±0,02	0,57±0,01	0,30±0,05	36,84±0,00
	V3'	5,61±0,05	0,99±0,04	4,68±0,02	1,12±0,02	0,21±0,04	0,51±0,05	0,22±0,00	15,65±0,01
	V4'	6,51±0,00	1,45±0,00	4,31±0,07	0,58±0,02	0,37±0,02	0,51±0,02	0,17±0,01	31,77±0,01
Valoarea Pearson (V1-V4)		0,0000***	0,0002***	0,0003***	0,0001***	0,0095*	0,1430 ^{ns}	0,0337*	0,0000***

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.10: Rezultatele analizei post-hoc Tukey HSD pentru acizii organici analizați
Table 4.10: Tukey HSD post hoc analysis results for the analyzed organic acids

Perechi analizate		Ac. malic	Ac. tartaric	Ac. shikimic	Ac. lactic	Ac. acetic	Ac. citric	Ac. succinic	Ac. fumaric
6 luni	V1 - V2	0,0122*	0,7475 ^{ns}	0,0034**	0,1932 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,7475 ^{ns}	0,8616 ^{ns}	0,0010**
	V1 - V3	0,7742 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0235*	0,1932 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0267*	0,0010**
	V1 - V4	0,0437*	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,6236 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,1245 ^{ns}	0,0267*	0,0010**
	V2 - V3	0,0222*	0,8999 ^{ns}	0,0779 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,7475 ^{ns}	0,0467*	0,0010**
	V2 - V4	0,3597 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0021**	0,6236 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,3220 ^{ns}	0,0467*	0,0010**
	V3 - V4	0,0951 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**	0,6236 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,1245 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**
11 luni	V1 - V2	0,0091**	0,6649 ^{ns}	0,0076**	0,7339 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,0010**
	V1 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0010**	0,0119*	0,2049 ^{ns}	0,2334 ^{ns}	0,0010**
	V1 - V4	0,1434 ^{ns}	0,2289 ^{ns}	0,0058**	0,4231 ^{ns}	0,8943 ^{ns}	0,2049 ^{ns}	0,0529 ^{ns}	0,0010**
	V2 - V3	0,0010**	0,0010**	0,0019**	0,0010**	0,0146 ^{ns}	0,3717 ^{ns}	0,1697 ^{ns}	0,0010**
	V2 - V4	0,0624 ^{ns}	0,6649 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,8943 ^{ns}	0,8999 ^{ns}	0,3717 ^{ns}	0,0408*	0,0010**
	V3 - V4	0,0010**	0,0010**	0,0023**	0,0010**	0,0182*	0,8999 ^{ns}	0,4424 ^{ns}	0,0010**

Analiza post-hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4), dar și incluzând varianta martor, fără levuri (V0'-V4). V0 – Vinul-bază, înainte de aplicarea procedurii de osmoză inversă; V0' – Vinul-bază, după aplicarea procedurii de osmoză inversă; V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™ (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

4.4. Influența levurilor asupra profilului de aromă al vinurilor spumante

Profilul de aromă constituie un factor major care determină caracterul și calitatea vinului spumant, dar și acceptabilitatea și competitivitatea acestuia pe piață. Metoda tradițională generează de obicei un profil senzorial bogat (Martinez-Rodriguez ș.a., 2001c) cu peste 800 de compuși diferiți care reprezintă fracțiunea volatilă a vinului, însă doar câțiva dintre aceștia imprimă miros (Torrens ș.a., 2008; Carpentieri ș.a., 2019). Fracția volatilă cuprinde mai multe clase de compuși organici din vinurile spumante, cum ar fi esterii, alcoolii, acizii organici, cetone, aldehide și terpene (Howard ș.a., 2005). Concentrarea lor depinde de varietatea strugurilor, de aspectele meteorologice sau biologice și de practicile de vinificație (Sánchez-Palomo ș.a., 2005; Nascimento, 2018). Activitatea tulpinilor de levuri în timpul fermentației alcoolice este considerată un agent semnificativ care contribuie la fracția volatilă și caracteristicilor organoleptice a vinurilor spumante (Escudero ș.a., 2000). Complexitatea profilului de aromă pe parcursul fermentației crește semnificativ datorită sintezei de compuși volatili de către levurile *Saccharomyces cerevisiae*. Tipul și cantitatea substanțelor volatile sintetizate depind de mai mulți factori, de exemplu concentrația de azot a mustului, condițiile de temperatură de fermentație și tulpina de drojdie inoculată (Molina ș.a., 2007).

Compușii volatili pot fi obținuți dintr-o varietate de surse (materie primă, fermentații sau stadiu de maturare-ânvechire) și au proprietăți fizico-chimice distincte, cum ar fi polaritatea, volatilitatea și impactul mirosului ca rezultat al grupărilor funcționale existente în moleculă (Bosch-Fuste ș.a., 2007; DiGianvito ș.a., 2018). Alcoolul etilic este predominant în vinurile spumante și poate modifica percepția senzorială a compușilor de aromă.

Levurile manifestă un rol important în definirea caracteristicilor vinului spumant, inclusiv a concentrației alcoolice, a proporției dioxidului de carbon, a prezenței manoproteinelor și a precursorilor unor diferiți compuși de aromă, cât și a capacității de spumare. Potrivit lui DiGianvito ș.a. (2018), tulpinile de *Saccharomyces cerevisiae* cu grade diverse de floclurare pot genera o diversificare substanțială a moleculelor de aromă din punct de vedere cantitativ și calitativ. Întrucât fermentarea în butelii a vinurilor spumante este de obicei realizată de puține produse oenologice pe bază de tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* (Vigentini ș.a., 2017), s-ar putea sugera exploatarea înmulțirii naturale a populației de levuri care urmărește producerea variabilității vinurilor spumante în etapa de refermentare. Toate tipurile de levuri pot contribui la formarea compușilor volatili prin căi metabolice specifice. Rezultatele obținute la sfârșitul perioadei de maturare pe drojzii demonstrează că se obțin variații importante între probe pentru nivelul de alcool, presiunea de dioxid de carbon atinsă și trăsăturile senzoriale ale probelor finale.

Numeroase studii s-au concentrat asupra compușilor volatili ai vinurilor spumante și a implicației senzoriale a acestora (Muñoz-Redondo ș.a., 2020; Coelho ș.a., 2009; Nascimento ș.a., 2018; Penacho ș.a., 2012). Englezos ș.a. (2019) a urmărit impactul unor

preparatelor levuriene mixte de *Starmerella bacillaris* cu diferite tulpini de *Saccharomyces cerevisiae* asupra configurației volatile și fizico-chimice a unor vinuri obținute din soiurile Barbera. Vinurile obținute prin inocularea unor mixuri de culturi levuriene au prezentat niveluri mai scăzute de alcool etilic, acetat de etil și acid acetic, cât și cantități mai mari ale unor alcooli superiori și esteri cu miros plăcut comparativ cu cele fermentate numai cu levuri *Saccharomyces cerevisiae*. Lencioni ș.a. (2016) au studiat evoluția compușilor volatili în timpul fermentației alcoolice cu amestecuri de tulpini selectate de *Zygorhizula florentina* spp. și *Saccharomyces cerevisiae* spp. comparativ cu fermentarea efectuată numai cu *Saccharomyces cerevisiae* spp. Datele au arătat o creștere semnificativă a 2-feniletanolului și o reducere a substanțelor volatile aciditatea în cazul variantelor obținute cu amestecuri de drojdii.

Compușii volatili cuantificați (reprezențați prin esteri, acizi, alcooli și terpene) au fost separați în clasele lor chimice. Substanțele identificate și descriptorii lor de miros corelați sunt prezentați în Tabelul 4.11.

Esterii contribuie la caracteristicile senzoriale ale vinurilor, fiind principalii responsabili pentru notele florale și fructate. Concentrațiile acestora depind de diverși factori, inclusiv speciile de levuri inoculate, temperatura, prezența oxigenului în timpul fermentației alcoolice și conținutul de zaharuri (Martínez-Rodríguez, 2001; Vigentini ș.a., 2017). Majoritatea esterilor reprezintă produși secundari ale acțiunii metabolice levuriene, rezultați sintetizate din esterificarea acizilor corespunzători cu alcooli, care au fost activați de acil-coenzima A sintetază (Englezos ș.a., 2019). Esteri 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), mai mulți 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, similară bananei și conferă complexitate vinurilor albe (Vigentini ș.a., 2017). Concentrațiile sale au variat de la 11,71 μg/L în proba V2 la 22,78 μg/L în proba V4. Acetatul de 2-fenetil este produs în general de levurile în timpul etapei de maturare și se caracterizează prin note dulci de miere și flori. Cel mai ridicat nivel al acestui compus 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-feniletil (aromă de trandafir) pot prezenta efect sinergic, chiar și la niveluri reduse. Valorile acetatului de 2-feniletil raportate de Torchio ș.a. (2012) au fost comparabile cu rezultatele obținute în cadrul prezentului experiment (22,33 până la 47,72 μg/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 μg/L). Potrivit lui Nascimento ș.a (2018), succinatul de dietil a fost unul dintre cei mai relevanți esteri în profilul volatil al vinurilor spumante Chenin Blanc. 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 μg/L în varianta V1 la 258,79 μg/L în proba V2. Acidul decanoic a atins o concentrație maximă în proba V1 (145,25 μg/L) și o valoare minimă în proba V2 (11,36 μg/L).

Alcoolii reprezintă componente aromatice secundare derivate din transformarea zaharurilor și a aminoacizilor în timpul procesului de fermentație și cu o influență semnificativă asupra profilului senzorial al vinurilor spumante (Nascimento ș.a., 2018; Caliarı ș.a., 2015). În ceea ce privește nivelul acestor compuși, alcoolul izoamilic, 4-octanolul, 1-heptanolul și 2-feniletilul au fost reprezentativi în probele analizate. Alcoolul izoamilic reprezintă, în general, mai mult de 50 % din alcoolii responsabili de nota de *fuzel* (Ribéreau-Gayon ș.a., 2004). Probele experimentale au prezentat cantități de la 1019,50 μg/L alcool izoamilic în proba V3, la 485,91 μg/L în cazul variantei V2. Acești compuși au fost identificați în proporții ridicate și în studiile realizate de Călugăr ș.a. (2020), în cazul unor probe obținute din soiul Muscat Ottonel.

O mică parte din alcoolii *fuzel* pot proveni din aldehidele derivate din struguri (Bidan ș.a., 1975; Nykänen, 1986). Formarea alcoolilor superiori în etapa de fermentație este de obicei influențată de tehnicile de vinificație aplicate, de tipul levurilor inoculate, de nivelul redus al aminoacizilor, temperatura scăzută, cât și de valoarea scăzută a pH - ului (Nykänen, 1986; Etievant, 1991). Cantitatea de alcoolii superiori produsă în timpul fermentației variază semnificativ în funcție de drojdia inoculată. 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 feniletilic, 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). Prezența sa în vin se poate datora degradării aminoacizilor, așa cum se arată în reacțiile Ehrlich. Producția de alcool feniletilic depinde de temperatura mediului și a tulpinilor de levuri inoculate (Satyanarayana ș.a., 2009). Datele publicate de Torrens ș.a. (2008) și Jagatić Korenika ș.a (2020) au prezentat, de asemenea, proporții mari de alcool feniletilic.

Terpenele reprezintă metaboliți secundari care provin din struguri. Biosinteza monoterpenelor de către *Saccharomyces cerevisiae* în absența precursorilor derivați din struguri a fost indicată a fi o posibilă sursă de compuși volatili în vin (Carrau ș.a., 2008). Potrivit lui Lengyel (2012), aceștia au un rol important în definirea mirosului floral, similar celui de trandafir, fiind de obicei corelat cu soiul Muscat de Alexandria și

Frontignac blanc. Linaloolul oferă vinurilor o aromă florală proaspătă, condimentată, cu note de lămâie. Proporții mari de L-linalool sunt de obicei specifice soiurilor aromate și semi-aromate, precum Muscat Ottonel, Tamâioasă Românească, Sauvignon blanc și Fetească albă (Heroiu ș.a., 1998). Varianta V1 a prezentat cel mai mare nivel de L-linalool (138,86 $\mu\text{g/L}$), urmată de V3 (120,43 $\mu\text{g/L}$, V4 (44,31 $\mu\text{g/L}$) și V2 (16,65 $\mu\text{g/L}$). Acest compus este transformat prin acțiunea acizilor în geraniol, nerol și, respectiv, terpineol (Lengyel, 2012). Dintre aceștia, terpineolul contribuie la definirea mirosului fructat (pepene galben) și floral (liliac). Compusul este format din monoterpeneglicozide în mediu acid (Strauss, 1986). În urma analizei prin cromatografie de gaze, cea mai mare concentrație a fost identificată în V1 (42,79 $\mu\text{g/L}$), urmată de variantele V3 (41,40 $\mu\text{g/L}$), V2 (28,19 $\mu\text{g/L}$) și V4 (24,19 $\mu\text{g/L}$). Acest compus poate proveni din struguri (în concentrații scăzute) și manifestă o percepție olfactivă ridicată (Lengyel, 2012). Niveluri ridicate de linalool și terpineol au fost identificate și în vinurile Moscato Giallo studiate de către Marcon ș.a. (2019). De asemenea, concentrații comparabile de linalool au fost identificate în vinurile Muscat de Alexandria de către Lanaridis ș.a (2002).

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 (Tabelul 4.12), 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. Tabelul 4.13 prezintă încărcările factorilor pentru fiecare variabilă, precum și valoarea proprie (eigenvalue), cât și și varianța cumulativă. Variabilele marcate cu aldin manifestă o contribuție majoră la sensul explicativ al celor trei factori. 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.

Figura 4.1 cuprinde primele două componente principale, reprezentând aproximativ 85 % din variabilitatea totală a rezultatelor. Prima componentă principală care a explicat cea mai mare parte a variabilității totale a datelor (59,82 %) a fost strâns 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 (Figura 4.1) arată o proiecție a variabilelor inițiale în spațiul factorilor. Se evidențiază astfel 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, linaloolul și decanoatul de etil sunt corelate pozitiv, în timp ce linaloolul 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 (poziționată în sens opus). Diagrama din Figura 4.1 permite efectuarea de observații și variabile pe o hartă bidimensională și identificarea tendințelor. După cum se poate observa în figura menționată, 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.

Harta termică (Heatmap) din Figura 4.2 a fost obținută folosind concentrația identificată pentru fiecare compus volatil studiat, exprimând o evaluare vizuală a corespondențelor (asemănări și diferențe) privind fracția volatilă a probelor. Culoarea casetelor obținute și intensitatea acesteia sunt folosite pentru a reprezenta modificările asupra concentrației fiecărui compus. Culoarea roșie indică cele mai mari concentrații ale fiecărui compus volatil, iar albastrul evidențiază cea mai mică cantitate. Prima variantă se remarcă pentru concentrații mai mari pentru majoritatea compușilor volatili, urmați de V3. Aceasta înseamnă că levurile inoculate s-au dovedit a fi mult mai eficiente în îmbogățirea acesteia cu compuși de aromă.

Mai multe studii care analizează produse similare (Nascimento ș.a., 2018; DiGianvito ș.a., 2018; Antonelli ș.a., 1999; Escribano ș.a., 2018) au raportat o influență semnificativă asupra compușilor volatili din vinul spumant și doar o acțiune minoră asupra parametrilor fizico-chimici. Studiile existente referitoare la evoluția compușilor volatili pe parcursul învechirii vinurilor spumante au prezentat rezultate opuse datorită diferitelor circumstanțe experimentale și a degradării și sintezei simultane a fracției volatile care are loc prin stadiul de maturare a vinului cu drojdie. Rezultă că oricare dintre aceste procese poate predomina în orice moment dat. Potrivit lui Torrens ș.a. (2010) inocularea diferitelor tulpini de levuri prezintă un impact semnificativ asupra compoziției chimice și a profilului volatil al vinurilor spumante, cu influențe majore asupra profilului lor senzorial.

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.

Tabelul 4.11: Influența levurilor asupra concentrației compușilor volatili
Table 4.11: Influence of yeasts on the concentration of volatile compounds

Nr	Compuși volatili (μg/L)	V1	V2	V3	V4	Descriptori de aromă	Referințe
Esteri							
1	acetat de izoamil	17,83±0,06*	11,71±0,15*	17,89±0,23*	22,78±0,11*	fructat, banane	Bosch-Fuste ș.a., 2007
2	octanoat de etil	7998,72±0,15*	5285,90±0,08*	7162,47±0,21*	6789,59±0,31*	fructat, banane, mere, ananas, pere, floral, dulce, săpun	López ș.a., 2002
3	decanoat de etil	2177,35±0,35*	985,37±0,20*	2126,20±0,11*	1593,61±0,30*	fructat, mere, ceară, oleios	Swiegers ș.a., 2005
4	succinat de dietil	53,58±0,90*	62,58±0,01*	49,52±0,11*	54,40±0,57*	fructat, floral, ceară, prăfuit	López ș.a., 2002
5	acetat de 2-feniletil	34,87±1,57*	22,33±0,81*	47,72±0,44*	28,18±0,16*	floral, dulce, fructat, miere	Torrens ș.a., 2008
6	laurat de etil	162,34±0,51*	56,71±0,01*	136,25±0,45*	110,49±0,82*	floral, fructat, vegetal, lemnos	Vararu ș.a., 2016
7	miristat de izopropil	14,87±0,17*	16,17±0,50*	15,99±0,11*	13,98±0,76*	uleios, gras	Vararu ș.a., 2016
8	palmitat de etil	15,64±0,98*	7,89±0,15*	15,98±0,15*	8,51±0,22*	ceros, fructat, cremos și lăptos cu o nuanță balsamică de vanilie	Torrens ș.a., 2008
9	oleat de etil	159,21±0,08*	132,12±0,16*	198,97±0,19*	108,42±0,23*	gras, uleios, lactate, lăptos, ceros, seu	Torrens ș.a., 2008

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.11: Influența levurilor asupra concentrației compușilor volatili - continuare
Table 4.11: Influence of yeasts on the concentration of volatile compounds - continued

Nr	Compuși volatili (μg/L)	V1	V2	V3	V4	Descriptori de aromă	Referințe
Acizi							
10	acid butiric	nd	9,81±0,57*	nd	6,32±0,11*	brânză, ranced, dulce, animală	Swiegers ș.a., 2005
11	acid hexanoic	326,09±0,25*	189,98±0,11*	227,50±0,70*	230,34±0,45*	gras, uleios	Torrens ș.a., 2008
12	acid octanoic	580,64±3,22*	258,79±2,23*	367,50±0,40*	nd	brânză	Bidan ș.a., 1975
13	acid decanoic	145,25±0,59*	11,36±0,06	13,01±0,06*	16,91±0,14*	ranced, acru, uleios, neplăcut, lemnos	Hui ș.a., 2010
14	acid 9-decenoic	6,90±2,25	6,75±0,98*	4,37±1,30	4,00±2,20	portocală ceară, kiwi, fructat, lactat, castravete, pepene galben	Vararu ș.a., 2016
Alcooli							
15	alcool izoamilic	1001,47±0,23*	485,91±0,16*	1019,50±0,02*	693,63±0,50*	alcool, lac de unghii, banane	Sánchez-Palomo ș.a., 2005
16	4-octanol	5,62±0,59	5,53±0,75	6,13±0,40	5,14±0,56	-	-
17	1-heptanol	5,89±0,54*	28,70±0,04*	10,06±0,40*	18,76±0,45*	verde, mucegai, cu frunze, violet, pe bază de plante, verde, dulce, lemnos, bujor	Swiegers ș.a., 2005
18	alcool feniletlic	1150,12±0,23*	884,56±0,14*	973,18±0,03*	683,46±0,01*	floral, trandafir, trandafir uscat, apa de trandafiri	Swiegers ș.a., 2005
Compuși terpenici							
19	linalol	138,86±0,06*	16,65±0,55*	120,43±0,01*	44,31±2,22*	citrice, floral, dulce, bois de rose, lemnos, afin verde	Swiegers ș.a., 2005
20	α-terpineol	42,79±0,40*	28,19±0,14*	41,40±0,02*	24,19±0,85*	lemnos, pin, liliac, citrice, floral	Vararu ș.a., 2016

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. Analiza varianței a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.12: Diferențe semnificative evidențiate prin testul Tukey HSD

Table 4.12: Significant differences revealed by the Tukey HSD test

Variabile	Grupuri	Diferență	Valoarea Pearson	95 % din intervalul de încredere	
				Limita inferioară	Limita superioară
succinat de dietil	V3-V4	4,8800	0,0000 ^{***}	3,7558	6,0042
acid butiric	V2 -V4	-3,4900	0,0000 ^{***}	-4,0993	-2,8807
acid decanoic	V2-V3	1,6500	0,0000 ^{***}	1,0073	2,2927
	V3-V4	3,9000	0,0021 ^{**}	3,2573	4,5427
1-heptanol	V1-V3	4,1700	0,0000 ^{***}	3,3200	5,0200
l-linalool	V2-V3	-4,220	0,0011 ^{**}	-6,6216	-1,8184
α -terpineol	V1-V3	-1,3900	0,0065 ^{**}	-2,3872	-0,3928
	V2-V4	-4,0000	0,0000 ^{***}	-4,9972	-3,0028

Analiza post-hoc a fost efectuată prin compararea celor patru variante de vin spumant care au conținut levuri (V1-V4). V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța); ns – diferență nesemnificativă statistic; * $p < 0,05$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 95 %; ** $p < 0,01$, cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99 %; *** $p < 0,001$ – cel puțin două medii diferă semnificativ, la pragul de semnificație 99,9 %.

Tabelul 4.13: Încărcările factoriale ale probelor experimentale
Table 4.13: Factor loadings of the experimental samples

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
valori proprii	11,964	5,081	2,955
variabilitate (%)	59,820	25,404	14,775
cumulat %	59,820	85,225	100,000
acetat de izoamil	0,264	-0,915	-0,305
octanoat de etil	0,924	-0,317	-0,211
decanoat de etil	0,944	-0,319	0,089
succinat de dietil	-0,219	0,941	0,257
acetat de 2-feniletil	0,727	-0,308	0,613
laurat de etil	0,951	-0,287	-0,118
miristat de izopropil	0,234	0,844	0,483
palmitat de etil	-0,261	-0,413	0,873
oleat de etil	0,664	0,231	0,711
acid butiric	-0,964	0,186	-0,192
acid hexanoic	0,857	0,057	-0,512
acid octanoic	0,788	0,611	0,075
acid decanoic	0,753	0,326	-0,571
acid 9-decenoic	0,687	0,651	-0,321
alcool izoamilic	0,952	-0,232	0,202
4-octanol	0,832	-0,516	0,203
1-heptanol	-0,973	0,228	0,012
alcool feniletilic	0,796	0,603	0,060
l-linalool	0,992	-0,044	0,117
α -terpineol	0,786	0,602	-0,139

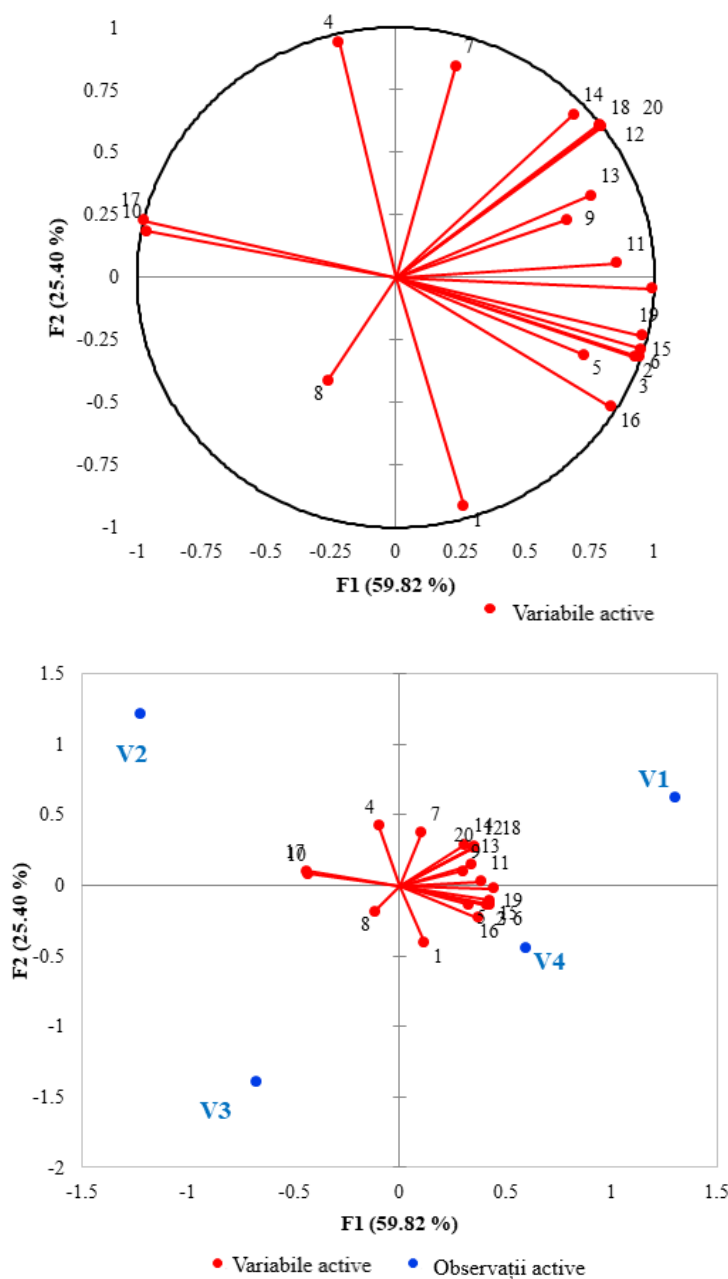


Figura 4.1: Analiza componentelor principale asupra rezultatelor privind compuşii volatili
 1 – acetat de izoamil; 2 – octanoat de etil; 3 – decanoat de etil; 4 – succinat de dietil; 5 – acetat de 2-feniletil; 6 – laurat de etil; 7 – miristat de izopropil; 8 – palmitat de etil; 9 – oleat de etil; 10 – acid butiric; 11 – acid hexanoic; 12 – acid octanoic; 13 – acid decanoic; 14 – acid 9-decanoic; 15 – alcool izoamilic; 16 – 4-octanol; 17 – 1-heptanol; 18 – alcool feniletilic; 19 – L-linalool; 20 – α -terpineol. V1 – IOC FIZZTM (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINETM, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTALTM (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007TM (IOC, Mardeuil, Franța).

Figure 4.1: Principal component analysis of volatile compound results
 1 – isoamyl acetate; 2 – ethyl octanoate; 3 – ethyl decanoate; 4 – diethyl succinate; 5 – 2-phenylethyl acetate; 6 – ethyl laurate; 7 – isopropyl myristate; 8 – ethyl palmitate; 9 – ethyl oleate; 10 – butyric acid; 11 – hexanoic acid; 12 – octanoic acid; 13 – decanoic acid; 14 – 9-decanoic acid; 15 – isoamyl alcohol; 16 – 4-octanol; 17 – 1-heptanol; 18 – phenylethyl alcohol; 19 – L-linalool; 20 – α -terpineol. V1 – IOC FIZZTM (IOC, Mardeuil, France); V2 – IOC DIVINETM, (IOC, Mardeuil, France); V3 – LEVULIA CRISTALTM (AEB, San Polo, Italy); V4 – IOC 18-2007TM (IOC, Mardeuil, France).

Conform analizei senzoriale (Figura 4.2), se pot observa diferențe majore între probele studiate datorită tipului de drojdii inoculate. 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).

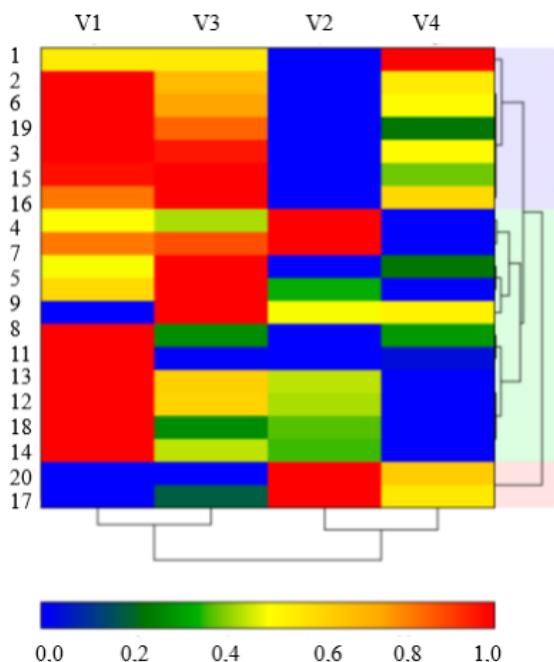


Figura 4.2: Evidențierea cantității de compuși volatili cu ajutorul hărții termice
1 – acetat de izoamil; 2 – octanoat de etil; 3 – decanoat de etil; 4 – succinat de dietil; 5 – acetat de 2-feniletil; 6 – laurat de etil; 7 – miristat de izopropil; 8 – palmitat de etil; 9 – oleat de etil; 10 – acid butiric; 11 – acid hexanoic; 12 – acid octanoic; 13 – acid decanoic; 14 – acid 9-decenoic; 15 – alcool izoamilic; 16 – 4-octanol; 17 – 1-heptanol; 18 – alcool feniletilic; 19 – L-linalool; 20 – α-terpineol. V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța).

Figure 4.2: Highlighting the amount of volatile compounds using the thermal map
1 – isoamyl acetate; 2 – ethyl octanoate; 3 – ethyl decanoate; 4 – diethyl succinate; 5 – 2-phenylethyl acetate; 6 – ethyl laurate; 7 – isopropyl myristate; 8 – ethyl palmitate; 9 – ethyl oleate; 10 – butyric acid; 11 – hexanoic acid; 12 – octanoic acid; 13 – decanoic acid; 14 – 9-decenoic acid; 15 – isoamyl alcohol; 16 – 4-octanol; 17 – 1-heptanol; 18 – phenylethyl alcohol; 19 – L-linalool; 20 – α-terpineol. V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, France); V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, France); V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italy); V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, France).

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. În Figura 4.3 se observă că proba V1 a primit cea mai mare notă pentru acest descriptor, pe când V4 (Figura 4.4) a prezentat cea mai redusă efervescență. Efervescența ridicată datorată nivelului mare de dioxid de carbon influențează semnificativ percepția senzorială și calitatea analizei. Astfel, există problema oboselii senzoriale și a aplatizării simțurilor. În studiul raportat de McMahon ș.a. (2017a, 2017b) nu au fost identificate diferențe asupra gradului de efervescență și a percepției de

„pișcător” la valori de peste 1,2 g CO₂/L, sugerând o sensibilitate scăzută a consumatorilor peste această limită.

Se poate observa că intensitatea gustului dulce este mai mică cu cât gradul de efervescentă a fost perceput mai ridicat. Passe, Horn și Murray (1997) au analizat influența carbonatării (concentrații de la 0 g CO₂/L până la 5,9 g CO₂/L la 20 °C) privind percepția de dulce în diverse băuturi și a raportat că un nivel mai mare de dioxid de carbon a suprimat semnificativ percepția de dulce. De altfel, într-un studiu realizat pe diverse soluții de apă care conțin zaharoză, nu a fost raportat niciun efect al coninutului ridicat de dioxid de carbon asupra percepției gustului dulce (Cometto-Muñiz, García-Medina, Calviño și Noriega, 1987). Kappes, Schmidt și Lee (2007) au evidențiat o corelație negativă între percepția aromei de caramel și vanilie și gradul de carbonatare.

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 (IOC 18-2007™) s-a evidențiat prin aciditate și efervescentă ridicată, o bună textură (cea mai mare notă) și persistență crescută. Proba notată cu V2 (IOC DIVINE™) a fost apreciată pentru note intens fructate (mere, pepene galben), pe când varianta V3 (LEVULIA CRISTAL™) s-a remarcat prin caracterul vegetal, de drojdie, dar și mere.

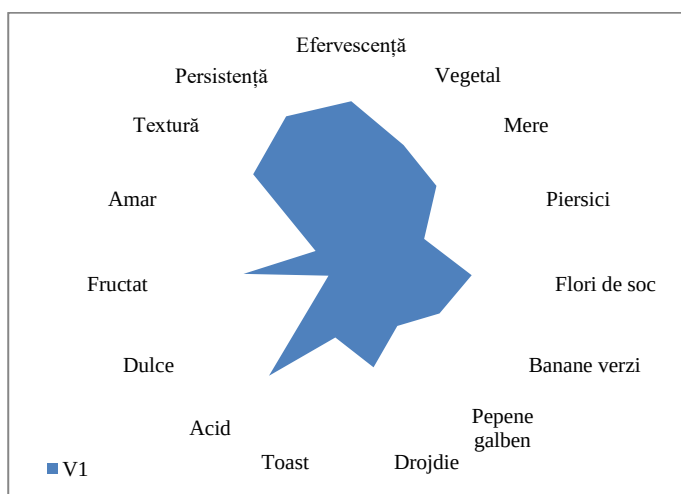


Figura 4.3: Profilul senzorial al probei V1

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, Franța).

Figure 4.3: Sensory profile of V1 sample

The data are expressed as the arithmetic mean plus/minus the standard deviation of the results obtained after triplicate analysis of all experimental variants. V1 – IOC FIZZ™ (IOC, Mardeuil, France).

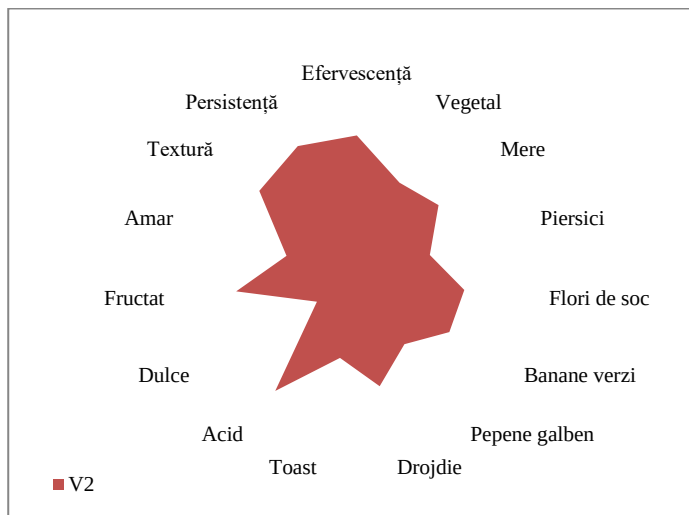


Figura 4.4: Profilul senzorial al probei V2

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, Franța).

Figure 4.4: Sensory profile of V2 sample

The data are expressed as the arithmetic mean plus/minus the standard deviation of the results obtained after triplicate analysis of all experimental variants. V2 – IOC DIVINE™, (IOC, Mardeuil, France).

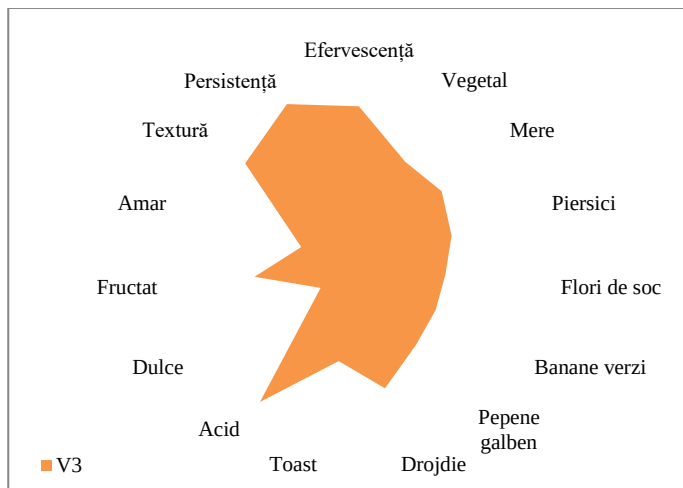


Figura 4.5: Profilul senzorial al probei V3

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italia).

Figure 4.5: Sensory profile of V3 sample

The data are expressed as the arithmetic mean plus/minus the standard deviation of the results obtained after triplicate analysis of all experimental variants. V3 – LEVULIA CRISTAL™ (AEB, San Polo, Italy).

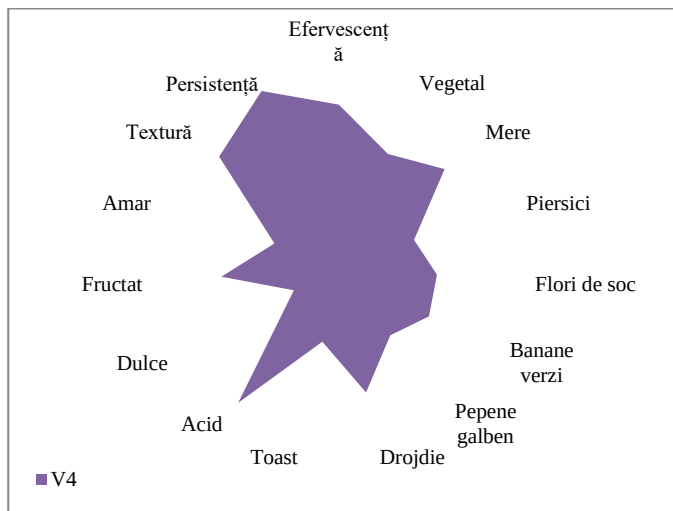


Figura 4.6: Profilul senzorial al probei V4

Datele sunt exprimate ca media aritmetică plus/minus deviația standard a rezultatelor obținute în urma analizării în triplicat a tuturor variantelor experimentale. V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, Franța)

Figure 4.6: Sensory profile of V4 sample

The data are expressed as the arithmetic mean plus/minus the standard deviation of the results obtained after triplicate analysis of all experimental variants. V4 – IOC 18-2007™ (IOC, Mardeuil, France)

CONCLUZII

Teza de doctorat cu titlul „*Studii privind influența diferitelor sușe de levuri asupra calității vinurilor spumante obținute prin metoda tradițională*” și-a propus să studieze influența levurilor (*Saccharomyces* spp.) utilizate pentru cea de-a doua fermentație asupra calității vinurilor spumante albe, obținute din soiul Muscat Ottonel.

Pentru îndeplinirea scopului general, a fost necesară realizarea următoarelor obiective specifice: studierea literaturii de specialitate și selectarea unei baze de date relevante; stabilirea protocolului experimental și a activităților specifice; realizarea probelor de vin spumant propuse de protocolul experimental; analiza proprietăților fizico-chimice generale ale probelor; evaluarea nivelului de ioni metalici din vinurile spumante obținute; analiza conținutului de acizi organici; determinarea principalilor compuși volatili din probele finale; studiul caracteristicilor senzoriale ale variantelor analizate, cu ajutorul degustătorilor autorizați; interpretarea statistică a datelor și compararea acestora cu rezultatele din literatura de specialitate.

În vederea îndeplinirii obiectivelor stabilite, au fost analizați parametri fizico-chimici de bază ai probelor obținute, profilul ionilor metalici, a acizilor organici, a compușilor volatili și a caracteristicilor senzoriale. Datele au fost interpretate statistic, fiind urmărită influența levurilor asupra calității probelor.

Rezultatele analizelor fizico-chimice ale vinurilor spumante analizate se încadrează în limitele admise de normativele Organizației Internaționale a Viei și Vinului. S-a constatat un impact important al levurilor asupra parametrilor fizico-chimici studiați. Parametrii precum densitatea, aciditatea totală, zahărul rezidual și extractul nereductiv au valori dependente. 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. 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.

Compoziția metalelor din vin în timpul fermentației, maturării, învechirii și depozitării nu este stabilă. Cantitatea de K și Ca a fost ascendentă pe parcursul păstrării

(de la 6 la 11 luni), pe când nivelul ionilor de Mg și Na s-au diminuat considerabil până la 11 luni. 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 s-a observat o dinamică ascendentă în perioada de păstrare. Analiza varianței a evidențiat o influență semnificativă a conținutului de metale în funcție de tipul levurilor inoculate. De asemenea, testul post-hoc a indicat diferențe semnificative între majoritatea perechilor de probe, pentru ionii metalici identificați.

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. Rezultatele au evidențiat un conținut mai ridicat în acizii organici analizați în cazul vinului bază, comparativ cu vinurile spumante obținute ulterior. Probele analizate au prezentat valori cuprinse între 6,33 g/L (V1) și 6,46 g/L (V2) 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 conținut acestui acid a înregistrat scăderi importante în timp.

Probele cu cele mai mici cantități de acid malic s-au caracterizat printr-un conținut mai ridicat de acid succinic, ca urmare a convertirii primului compus în cel ce-al doilea, sub acțiunea levurilor. După acidul malic, cel mai abundent acid a fost acidul tartric, cu o concentrație medie cuprinsă între 0,99 și 5,97 g/L. Valorile acidului tartric au rămas aproape constante între cele două momente de analiză (6 luni și 11 luni), înregistrându-se o ușoară scădere în cazul variantei V3 și creștere în cazul variantei V4. În general, acidul tartric nu este metabolizat în timpul proceselor biochimice desfășurate, dar diminuări cantitative pot fi înregistrate în cazul unor mecanisme fizico-chimice, cum ar fi precipitățile tartrice.

Rezultatele nu au indicat diferențe majore în ceea ce privește concentrația principalilor acizi organici și valorile pH-ului. 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-V2, V1-V4 și V2-V3 pentru determinările efectuate la 6 luni de la păstrare. Analizele realizate la 11 luni au arătat diferențe semnificative ($p < 0,01$) între grupurile V1-V2, V1-V3, V2-V3 și V3-V4.

Compușii volatili cuantificați au aparținut unor clase diferite precum esteri, acizi, alcooli și terpeni. Din prima categorie, s-a remarcat prezența octanoatului de etil, decanoatului de etil, laureatului de etil, miristatului de izopropil, palmitatului de etil și oleatului de etil. Concentrațiile acestora au variat în funcție de levurile inoculate. Datele au arătat o contribuție semnificativă a levurilor selectate la îmbogățirea fracției volatile a

vinurilor. În ceea ce privește caracteristicile organoleptice, s-au obținut diferențe importante în funcție de produsul levurian utilizat. Octanoatul de etil și decanoatul de etil au fost reprezentativi pentru toate variantele, fiind responsabili de notele fructate (în special banane, măr) și florale (floare de soc) ale probelor. Variantele V1 și V3 au indicat cele mai mari concentrații ale majorității compușilor de aromă analizați, în timp ce V2 și V4 au prezentat cele mai scăzute proporții. Se poate spune astfel că produsele administrate în variantele V1 și V3 s-au dovedit a fi mai eficiente în îmbogățirea cu compuși de aromă.

Analiza componentelor principale a descris variațiile compoziției compușilor volatili ai vinurilor spumante produse sub influența unor diferite tulpini de levuri comerciale. Primul factor a reprezentat 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 au arătat o 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 strâns 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 au arătat 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, au fost 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 (poziționată în sens opus). Variabilele raportate la factorul 1 permit diferențierea probelor după fracția volatilă.

Din punct de vedere senzorial, vinurile spumante analizate s-au caracterizat 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, compuși precum acetatul de izoamil, palmitatul de etil, 4-octanolul sau 1-heptanolul nu au arătat o contribuție semnificativă asupra profilului senzorial evidențiat. Probele au fost descrise 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. 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 efervescentă 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 s-au explicat prin prezența în cantități mari a octanoatului de etil, decanoatului de etil sau a succinatului de dietil. Mirosul floral a fost asociat cu prezența în cantități ridicate a alcoolului feniletlic.

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 (IOC 18-2007TM) s-a evidențiat prin aciditate și efervescentă ridicată, o bună textură (cea mai mare notă) și persistență crescută. Proba notată cu V2 (IOC DIVINETM) a fost apreciată pentru note intens fructate (mere, pepene galben), pe când varianta V3 (LEVULIA CRISTALTM) s-a remarcat prin caracterul vegetal, de drojdie, dar și mere.

Întrucât unul dintre scopurile experimentului a fost evaluarea influenței drojdiilor inoculate asupra fracției volatile a vinurilor spumante experimentale, datele au confirmat că diferite preparate pot genera diferite concentrații ale compușilor volatili.

Rezultate pot contribui la optimizarea tehnologiei de vinificație pentru obținerea de produse cu conținut scăzut de alcool cu bogat profilul de aromă.

CONCLUSIONS

The doctoral thesis entitled "*Studies on the influence of different yeast strains on the quality of sparkling wines obtained by the traditional method*" aimed to study the influence of yeasts (*Saccharomyces* spp.) used in the second fermentation on the quality of white sparkling wines, obtained from Muscat Ottone grapes.

To fulfill the general purpose, it was necessary to achieve the following specific objectives: studying the specialized literature and selecting a relevant database; establishing the experimental protocol and specific activities; carrying out the sparkling wine samples proposed by the experimental protocol; analysis of the general physico-chemical properties of the samples; evaluation of the level of metal ions in the obtained sparkling wines; analysis of the content of organic acids; determination of the main volatile compounds in the final samples; the study of the sensory characteristics of the analyzed variants, with the help of authorized tasters; statistical interpretation of the data and their comparison with the results of other authors.

For the established objectives, the following parameters were evaluated: the basic physical-chemical properties, concentrations of the main metal ions, organic acids and volatile compounds, the sensory characteristics of sparkling wines. The data were interpreted statistically, and the influence of leves on the quality of the samples was followed.

The results of the physico-chemical characteristics of the analyzed sparkling wines fall within the limits allowed by the norms of the International Organization of Vine and Wine. An important impact of yeasts on the studied physico-chemical parameters was found. Parameters such as density, total acidity, residual sugar and non-reducing extract have dependent values. Given that the same base wine was used to obtain them, the possible differences are attributed to the inoculation of different types of yeasts in order to carry out the secondary fermentation. Minor changes were observed in the main physico-chemical parameters analyzed at 11 months after the production of the samples, compared to the results recorded at 6 months. Analysis of variance indicated significant differences between the physico-chemical characteristics of the control sample and those containing yeasts ($p < 0.001$ for most parameters). The values were also influenced by the type of inoculated yeasts ($p < 0.001$ for most pairs of media, $p < 0.05$ for volatile acidity in both periods of analysis, non-significant differences for density). Following the application of the Tukey HSD post-hoc test, the pairs of variants that differed significantly for each individual physico-chemical indicator were highlighted. Thus, in the case of density, the differences concerned the control sample (V0) compared to the variants V1, V2, V3 and V4, which contained yeasts.

The metal composition of wine during fermentation, maturation, aging and storage is not stable. The amount of potassium and calcium increased during storage (from 6 to 11 months), while the level of magnesium and sodium ions decreased considerably until 11 months. Higher concentrations of some compounds (zinc, iron, copper, nickel, manganese) were identified in the samples in which yeasts were inoculated for the second fermentation. In addition, comparing the concentrations of iron, copper, nickel and manganese in V1-V4 samples, an upward trend was observed during the storage period. The analysis of variance revealed a significant influence of the metal content according to the type of inoculated yeasts. Also, the post-hoc test indicated significant differences between most pairs of samples for the identified metal ions.

The organic acids in wine come mainly from the raw material, from the administered treatments or they can be formed from the metabolic processes of the microorganisms. The results revealed a higher content in the analysed organic acids in the case of the base wine, compared to the sparkling wines. The analysed samples presented values between 6.33 g/L (V1) and 6.46 g/L (V2) malic acid when after 6 months of storage and between 5.61 g/L (V3') and 6.63 g/L (V2') after 11 months. An increasing trend of malic acid concentration was noted between 6 and 11 months of storage of most variants, except for V3, where the content of this acid registered important decreases over time.

The samples with the lowest amounts of malic acid were characterized by a higher content of succinic acid, as a result of the conversion of the first compound into the second, under the action of yeasts. After malic acid, the most abundant acid was tartaric acid, with an average concentration ranging from 0.99 to 5.97 g/L. Tartaric acid values remained almost constant between the two analysis moments (6 months and 11 months), registering a slight decrease in the case of the V3 variant and an increase in V4. In general, tartaric acid is not metabolized during the unfolded biochemical processes, but quantitative decreases can be registered in the case of some physicochemical mechanisms, such as tartaric precipitations.

The results indicated no major differences in the concentration of the main organic acids and the pH values. In a first stage, the concentration of organic acids showed minor variations in relation to the type of inoculated yeasts for the second fermentation ($p > 0.05$). Significant changes were obtained between the two analysis points (6 and 11 months of storage). For example, in the case of malic acid, post-hoc analysis revealed significant differences ($p < 0.05$) between V1-V2, V1-V4, and V2-V3 for determinations made 6 months after storage. The results obtained after 11 months of storage showed significant differences ($p < 0.01$) between the V1-V2, V1-V3, V2-V3 and V3-V4 groups.

The quantified volatile compounds belonged to different classes such as esters, acids, alcohols and terpenes. From the first category, the presence of ethyl octanoate, ethyl decanoate, ethyl laureate, isopropyl myristate, ethyl palmitate and ethyl oleate was noted.

Their concentrations varied according to the inoculated yeasts. The data showed a significant contribution of the selected yeasts to the enrichment of the volatile fraction of the sparkling wines. Regarding the organoleptic characteristics, important differences were obtained depending on the inoculated yeast. Ethyl octanoate and ethyl decanoate were representative for all variants, being responsible for the fruity (especially banana, apple) and floral (elder flower) notes of the samples. Variants V1 and V3 showed the highest concentrations of most of the analysed aroma compounds, while V2 and V4 showed the lowest proportions. It can thus be said that the products administered in variants V1 and V3 proved to be more effective in the enrichment of flavour compounds.

Principal component analysis described the variations in the composition of volatile compounds of sparkling wines produced under the influence of different strains of commercial yeasts. The first factor accounted for 59.82 % of the data variability and was closely correlated with most of the identified volatile compounds (ethyl octanoate and decanoate, 2-phenethyl acetate, ethyl laurate, hexanoic, octanoic, decanoic and 9-decenoic acid, alcohol isoamyl, 4-octanol, phenylethyl alcohol, L-linalool and α -terpineol). Therefore, these components showed a high correlation with most of the volatile compounds identified in the analysed samples. The first two principal components accounted for approximately 85 % of the total variability in the data. The first principal component that explained most of the total variability in the data (59.82 %) was highly correlated with isoamyl acetate, ethyl decanoate, ethyl laurate, isoamyl alcohol and L-linalool (factor loadings greater than 0.90 in all cases). For the second main component, diethyl succinate and isopropyl myristate showed high and positive values. Specific principal component analysis plots showed a positive correlation of 1-heptanol with butyric acid (r close to +1), but a negative correlation with isopropyl myristate (r close to -1). In addition, linalool and ethyl decanoate are positively correlated, while linalool and butyric acid show a negative correlation. Ethyl octanoate, ethyl decanoate and isoamyl alcohol, the most prevalent volatile substances in the analysed samples, were also positively correlated. On the other hand, they are negatively correlated with butyric acid and 1-heptanol (positioned in the opposite direction). The variables related to the factor 1 allow the differentiation of the samples according to the volatile fraction.

From a sensory point of view, the analysed sparkling wines were characterized by intensely fruity (bananas, apples) and floral (elder flowers) notes, associated with high levels of esters (e.g. ethyl octanoate and ethyl decanoate). Compounds such as isoamyl acetate, ethyl palmitate, 4-octanol or 1-heptanol did not show a significant contribution to the highlighted sensory profile. The samples were described as balanced on the palate, with increased persistence, high acidity (which gave the impression of freshness) and good texture (especially sample V4). The V1 variant was noted for its floral notes (elder flowers), while the fruity character was predominant in V2 sample (especially green bananas). The samples also differed in terms of effervescence. V1 received the highest score for this descriptor, while V4 presented the lowest effervescence. The intensity of the

sweet taste is lower the higher the degree of effervescence was perceived. Regarding the correlation between volatile compounds and sensory perception, the fruity notes (apples, green bananas, peaches) of the experimental samples were explained by the presence of large amounts of ethyl octanoate, ethyl decanoate or diethyl succinate. The floral odour was associated with the presence of high amounts of phenylethyl alcohol.

A significant influence of the yeasts on the final sensory profile was noted, with the control sample showing the lowest scores for most of the descriptors followed. V4 variant (IOC 18-2007™) stood out with high acidity and effervescence, good texture (highest note) and increased persistence. The V2 sample (IOC DIVINE™) was appreciated for intensely fruity notes (apples, melon), while the V3 (LEVULIA CRISTAL™) variant stood out for its vegetal, yeasty, but also apple character.

Since one of the aims of the experiment was to evaluate the influence of the inoculated yeasts on the volatile fraction of the experimental sparkling wines, the results confirmed that different preparations can generate different concentrations of volatile compounds.

The results can contribute to the optimization of winemaking technology to obtain low-alcohol products with a rich aroma profile.

BIBLIOGRAFIE

REFERENCES

1. Aguilera F., Peinado R.A., Mill C., Ortega J.M., Mauricio J.C., 2006 - *Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains*. International Journal of Food Microbiology 110, 34e42.
2. Alexandre H., Guilloux-Benatier M., 2006 - *Yeast autolysis in sparkling wine – a review*. Australian Journal of Grape and wine research 12: 119 – 127.
3. Alfonzo A., Francesca N., Matraxia M., Craparo V., Naselli V., Mercurio V., Moschetti G., 2020 - *Diversity of Saccharomyces Cerevisiae Strains Associated to Racemes of Grillo Grape Variety*. FEMS Microbiology Letters 367, fnaa079.
4. Antonelli A., Castellari L., Zambonelli C., Carnacini A., 1999 - *Yeast influence on volatile composition of wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 1139–1144.
5. Arneborg N., Hoy C.E., Jorgensen O.B., 1995 - *The effect of ethanol and specific growth rate on the lipid content and composition of Saccharomyces cerevisiae grown anaerobically in a chemostat*. Yeast 11, 953e959.
6. Bauer E.F., Pretorius I.S., 2000 - *Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine e a review*. South African Journal of Enology and Viticulture 21, 27-51.
7. Bekker M.Z., Day M.P., Smith P.A., 2019 - *Changes in metal ion concentrations in a Chardonnay wine related to oxygen exposure during vinification*. Molecules 24: 1523.
8. Benucci I., Esti M., 2020 - *Novel microencapsulated yeast for the production of sparkling wine by traditional method*. Internet Journal of Viticulture and Enology.
9. Benucci I., 2019 - *Impact of post-bottling storage conditions on colour and sensory profile of a rosé sparkling wine*. LWT - Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108732>.
10. Berger R.G., 2007 - *Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability*, Editura Springer, Berlin, Germania.
11. Bidan P., 1975 - *Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées, en particulier les acides aminés*. Bulletin de l'OIV, 536, 841–867.
12. Bidan P., 1998 - *Vins mousseux: Méthode de transfert, cuve close, élaboration en continu, vins mousseux gazéifiés (ou carboniques)*. In: Oenologie: Principes scientifiques et technologiques. C. Flanzy (Ed.). Tec & Doc Lavoisier. p. 840.
13. Borrull A., Lopez-Martinez G., Miro-Abella E., Salvado Z., Poblet M., Cordero-Otero R., Rozes N., 2015 - *New insights into the physiological state of Saccharomyces cerevisiae during ethanol acclimation for producing sparkling wines*. Food Microbiology 54: 20-29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.001>.

14. Bosch-Fuste J., Riu-Aumatell M., Guadayol J.M., Calxach J., Lopez-Tamames E., Buxaderas S., 2007 - *Volatile profiles of sparkling wines obtained by three extraction methods and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis*. Food Chemistry 105(1), 428-435.
15. Bozdogan A., Canbas A., 2011 - *Influence of yeast strain, immobilisation and ageing time on the changes of free amino acids and amino acids in peptides in bottle-fermented sparkling wines obtained from vitis vinifera cv. Emir*. International Journal of Food Science, 46, 1113–1121.
16. Butnariu M., 2020 - *Biotechnology of flavored or special wines*; în Biotechnological Progress and Beverage Consumption 19: 253-282. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00008-4>.
17. Caliar V., Burin V.M., Rosier J.P., Bordignon L.M.T., 2014 - *Aromatic profile of Brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties*. Food Research International 62, 965–973.
18. Caliar V., Panceri C.P., Rosier J.P., Bordignon-Luiz M.T., 2015 - *Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 61, 393–400.
19. Călin I. (2022). *Cercetări privind optimizarea tehnologiilor de producere a vinurilor cu conținut redus de dioxid de sulf în podgoria Iași*. Teză de doctorat, USV Iași.
20. Călugar A., Coldea T.E., Pop C.R., Pop T.I., Babes A.C., Bunea C.I., Manolache M., Gál E., 2020 - *Evaluation of Volatile Compounds during Ageing with Oak Chips and Oak Barrel of Muscat Ottonel Wine*. Processes 8, 1000.
21. Canonico L., Comitini F., Ciani M., 2018 - *Torulaspora delbrueckii for secondary fermentation in sparkling wine production*. Food Microbiology 74, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>.
22. Capozzi V., Tufariello M., Berbegal C., Fragasso M., De Simone N., Spano G., Russo P., Venerito P., Bozzo F., Grieco F., 2022 - *Microbial resources and sparkling wine differentiation: state of arts*. Fermentation 8:275. <https://doi.org/10.3390/fermentation8060275>.
23. Carpentieri A., Sebastianelli A., Melchiorre C., Pinto G., Trifuoggi M., Lettera V., Amoresano A., 2019 - *Fiano Greco and Falanghina grape cultivars differentiation by volatiles fingerprinting, a case study*. Heliyon, 5, e02287.
24. Carrau F.M., Boido E., Dellacassa E., 2008 - *Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process*. Natural Product Communications 3, 577–593.
25. Cebollero E., Gonzalez R., 2006 - *Induction of autophagy by second-fermentation yeasts during elaboration of sparkling wines*. Applied and Environmental Microbiology 72, 4121–4127.
26. Charpentier C., Feuillat M., 1993 - *Yeast autolysis*. In: Wine Microbiology and Biotechnology. In G. H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology (225-242). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers.

- 27.Coelho E., Coimbra M.A., Nogueira J., Rocha S.M., 2009 - *Quantification approach for assessment of sparkling wine volatiles from different soils, ripening stages, and varieties by stir bar sorptive extraction with liquid desorption*. Analytica Chimica Acta 635, 214–221.
- 28.Cotea D.V., Zănoagă C., Cotea V.V., 2009 - *Tratat de oenochimie*, Editura Academiei Române, București.
- 29.Cotea V.V., 2005 - *Tehnologia vinurilor efervescente*. Editura Academiei Române, București.
- 30.Cotea V.V., Focea M.C., Luchian C.E., Colibaba L.C., Scutarașu E.C., Niculaea M., Zamfir C.I. Popîrdă A. (2021). Influence of different commercial yeasts on volatile fraction of sparkling wines. Foods 10(2):247. Doi: 10.3390/foods10020247.
- 31.Curioni A., Vincenzi S., Flamini R., 2008 – *Proteins and peptides in grapes in wine*; editat de Flamini R. (2008). *Hyphenated technique in grape and wine chemistry*, Editura John Wiley & Sons, Ltd.
- 32.Danilewicz J.C., 2007 - *Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: Central role of iron and copper*. American Journal of Enology and Viticulture 58, 53–60.
- 33.Delfini, C.; Formica, J., 2001 - *Wine Microbiology: Science and Technology (Food Science and Technology)*, 1st ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- 34.DiGianvito P., Arfelli G., Suzzi G., Tofalo R., 2019 - *New Trends in Sparkling Wine Production: Yeast Rational Selection*. In *Alcoholic Beverages*; Grumezescu A.M., Holban A.M., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2019; pp. 347–386; ISBN 978-0-12-815269-0.
- 35.DiGianvito P., Perpetuini G., Tittarelli F.; Schirone M., Arfelli G., Piva A., Patrignani F., Lanciotti R., Olivastri L., Suzzi G., 2018 - *Impact of Saccharomyces cerevisiae strains on traditional sparkling wines production*. Food Research International 109, 552–560.
- 36.Dubois C., Flanzly C., Sablayrolles J.M., 1998 - *Blanquette methode ancestrale*. În *Oenologie: Principes scientifiques et technologiques*, ed. de Flanzly C. Tec & Doc Lavoisier, p. 833.
- 37.Englezos V., Pollon M., Rantsiou K., Ortiz-Julien A., Botto R., Segade S.R., Giacosa S., Rolle L., Cocolin L., 2019 - *Saccharomyces cerevisiae-Starmerella bacillaris strains interaction modulates chemical and volatile profile in red wine mixed fermentations*. Food Research International, 122, 392–401.
- 38.Escribano R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Gutiérrez A.R., 2018 - *Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-Saccharomyces species and clones*. Journal of Applied Microbiology 124, 1521–1531.
- 39.Escudero A., Charpentier M., Etiévant P., 2000 - *Characterization of aged champagne wine aroma by GC-O and descriptive profile analyses*. Sciences des Aliments 20, 331–346.

40. Esparza I., Salinas Í., Santamaría C., García-Mina J.M., Fernández J.M., 2005 - *Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols*. *Analytica Chimica Acta* 543, 267–274.
41. Etievant P., 1991 - *Wine. Volatile Compounds in Food and Beverages*. Routledge: Abingdon, UK.
42. Ferreira A.M., Mendes-Faia A., 2019 - *The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking*. *Foods* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/foods9091231>.
43. Ferreira R.B., Monteiro S., Piçarra-Pereira M.A., Tanganho M.C., Loureiro V.B., Teixeira A.R., 2000 - *Characterization of the proteins from grapes and wines by immunological methods*, *American Journal of Enology and Viticulture* 51, p. 22 – 28.
44. Feuillat M., Charpentier C., 1982 - *Autolysis of yeasts in Champagne*. *American Journal of Enology and Viticulture* 33: 6.
45. Frisch L.M., Mann M.A., Marek D.N., Baudrexel M., Vogel R.F., Niessen L., 2021 - *Studies on the Gushing Potential of Penicillium Expansum*. *Food Research International* 139, 109915.
46. Galani-Nikolakaki S., Kallithrakas-Kontos N., Katsanos A.A., 2002 - *Trace element analysis of Cretan wines and wine products*. *Science of the Total Environment* 285:155–163.
47. Gallardo-Chacón J.J., Vichi S., Urpí P., López-Tamames E., Buxaderas S., 2010 - *Antioxidant activity of lees cell surface during sparkling wine sur lie aging*. *International Journal of Food Microbiology* 143, 48–53.
48. García M.J., Aleixandre J.L., Álvarez I., Lizama V., 2009 - *Foam aptitude of Bobal variety in white sparkling wine elaboration and study of volatile compounds*. *European Food Research Technology* 229, 133–139.
49. Garofalo C., Arena M.P., Laddomada B., Cappello M.S., Blevé G., Grieco F., Beneduce L., Berbegal C., Spano G., Capozzi V., 2016 - *Starter Cultures for Sparkling Wine*. *Fermentation* 2:21.
50. Garofalo C., Berbegal C., Grieco F., Tufariello M., Spano G., Capozzi V., 2018 - *Selection of Indigenous Yeast Strains for the Production of Sparkling Wines from Native Apulian Grape Varieties*. *International Journal of Food Microbiology* 285, 7–17.
51. Genovese A., Lamorte S.A., Gambuti A., Moio L., 2013 - *Aroma of Aglianico and Uva di Troia grapes by aromatic series*. *Food Research International* 53, 15–23.
52. Gnoinski G.B., Schmidt S.A., Close D.C., Goemann K., Pinfold T.L., Kerslake F.L., 2021 - *Novel methods to manipulate autolysis in sparkling wine: effects on yeast*. *Molecules* 26 (2), 387. <https://doi.org/10.3390/molecules26020387>.
53. Gonzalez R., Martínez-Rodríguez A.J., Carrascosa A.V. (2003). *Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production*. *International Journal of Food Microbiology* 84, 21–26.
54. González-Royo E., Pascual O., Kontoudakis N., Esteruelas M., Esteve-Zarzoso B., Mas A., Canals J.M., Zamora F., 2014 - *Oenological consequences of sequential inoculation with non-Saccharomyces yeasts (Torulaspora delbrueckii or Metschnikowia*

pulcherrima) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. European Food Research and Technology. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>.

55.Gougeon R.D., Reinholdt M., Delmotte L., Miéché-Brendle J., Chézeau J.M., Le Dred R., Marchal R., Jeandet P., 2002 - *Direct observation of polylysine side-chain interaction with smectites interlayer surfaces through ¹H-²⁷Al heteronuclear correlation NMR spectroscopy*. Langmuir 18: 3396.

56.Gougeon R.D., Soulard M., Miéché-Brendle J., Chézeau J.M., Le Dred R., Jeandet P., Marchal R., 2003a - *Analysis of two bentonites of enological interest before and after commercial activation by solid Na₂CO₃*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51: 4096.

57.Gougeon R.D., Soulard M., Reinholdt M., Miéché-Brendle J., Chézeau J.M., Le Dred R., Marchal R., Jeandet P., 2003b - *Polypeptide adsorption onto a synthetic montmorillonite: A combined solid-state NMR, X-ray diffraction, thermal analysis and N₂ adsorption study*. European Journal of Inorganic Chemistry., 1366.

58.Hardy G., 2003 - *Les différentes methodes d'élaboration des vins effervescents*. Revue des Oenologues, 107S:9.

59.Heroiu E., 1998 - *Research on Organic Constituents of the Aroma of Wines from the Main Varieties Cultivated in the Vineyard of Ștefanești-Argeș*. Teză de doctorat, Universitatea din București, Romania.

60.Hidalgo P., Pueyo E., Pozo-Bayón M.A., Martinez-Rodriguez A.J., Martin-Alvarez P., Polo M.C., 2004 - *Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52, 6640–6645.

61.Hopfer H., Nelson J., Collins T.S., Heymann H., Ebeler S.E., 2015 - *The combined impact of vineyard origin and processing winery on the elemental profile of red wines*. Food Chemistry 172, 486–496.

62.Howard K.L., Mike J.H., Riesen R., 2005 - *Validation of a solid-phase micro-extraction method for headspace analysis of wine aroma components*. American Journal of Enology and Viticulture 56, 37–45.

63.Hui Y.H., Chen F., Nollet L.M.L., Guin, R.P.F., Martín-Bellos, O., Mínguez-Mosquera I.M., Paliyath G., Pessoa F.L.P., Quéré L.J., Sidhu J.S., ș.a., 2010 - *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, 1st ed. Ed.Wiley, Hoboken, NJ, USA.

64.Ivanova-Petropulos V., Petruševa D., Mitrev S., 2020 - *Rapid and simple method for determination of target organic acids in wine using HPLC-DAD analysis*. Food Analytical Methods 13, 1078–1087. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01724-4>.

65.Ivit I., Kopjar M., Buljeta I., Picher D., Mesic J., Pichler A., 2022 - *Influence of reverse osmosis process in different operating conditions on phenolic profile and antioxidant activity of conventional and ecological Cabernet Sauvignon red wine*. Membranes 12(1):76. <https://doi.org/10.3390/membranes12010076>.

66.Ivit N.N., Kemp B., 2018 - *The Impact of Non-Saccharomyces Yeast on Traditional Method SparklingWine*. Fermentation 4: 73.

- 67.Ivit N.N., Loira I., Morata A., Benito S., Palomero F., Suarez-Lepe J.A., 2018 - *Making natural sparkling wines with non-Saccharomyces yeasts*. European Food Research and Technology 244, 925–935. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-3015-y>.
- 68.Jackson R. S., 2008 - *Wine science: principles and applications*. Food Science and Technology, ediția a 3-a, Editura Academic Press.
- 69.Jackson R. S., 2009 - *Wine tasting – a professional handbook*, 2nd edition, Academic Press, USA.
- 70.Jackson R.S., 2014 - *Chemical Constituents of Grapes and Wine*. Wine Science, 347–426. Editura Academic Press.
- 71.Jaganatik Korenica A.M., Preiner D., Tomaz I., Jeromel A., 2020 - *Volatile Profile characterization of Croatian Commercial Sparkling Wines*. Molecules 25:4349. [10.3390/molecules25184349](https://doi.org/10.3390/molecules25184349).
- 72.Jeandet P., Vasserot Y., Liger-Blair G., Marchal R., 2021 - *Sparkling wine production*. În Concise Encyclopedia of Science and Technology of Wine Publisher: CRC Press
- 73.Jones J.E., Kerslake F.L., Close D.C., Dambergs R.G., 2014 - *Viticulture for Sparkling Wine Production: A Review*. American Journal of Enology and Viticulture 65, 407–416.
- 74.Jordão A.M., Vilela A., Cosme F., 2015 - *From Sugar of Grape to Alcohol of Wine: Sensorial Impact of Alcohol in Wine*. Beverages 1, 292–310.
- 75.Kappes S.M., Schmidt S.J., Lee S.Y., 2007 - *Relationship between physical properties and sensory attributes of carbonated beverages*. Journal of Food Science, 72(1), S001–S011.
- 76.Koufos G., Mavromatis T., Koundouras S., Fyllas N.M., Jones G.V., 2013 - *Viticulture-climate relationships in Greece: The impacts of recent climate trends on harvest date variation*. International Journal of Climatology 34, 1445–1459.
- 77.Kreitman G.Y., Danilewicz J.C., Jeffery D.W., Elias R.J., 2016 - *Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. Part 1: Copper-catalyzed oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 64, 4095–4104.
- 78.La Gatta B., Picariello G., Rutigliano M., Lopriore G., Petrella G., Rusco G., Tremonte P., Di Luccia A., 2016 - *Addition of lees from base wine in the production of Bombino sparkling wine*. European Food Research and Technology 242 (8), 1307–1317. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2634-z>.
- 79.Labanda J., Vichi S., Llorens J., López-Tamames E., 2009 - *Membrane separation technology for the reduction of alcoholic degree of a white model wine*. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 42, 1390–1395.
- 80.Lagace L.S., Bisson L.F., 1990 - *Survey of yeast proteases for effectiveness of wine haze reduction*. American Journal of Enology and Viticulture 41, 147-155.
- 81.Lanaridis P., Salaha M.J., Tzourou I., Tsoutsouras E., Karagiannis S., 2002 - *Volatile compounds in grapes and wines from two Muscat varieties cultivated in Greek islands*. OENO One 36, 39–47.

- 82.Lencioni L., Romani C., Gobbi M., Comitini F., Ciani M., Domizio P., 2016 - *Controlled mixed fermentation at winery scale using Zygorulasporea florentina and Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology 234, 36–44.
- 83.Lengyel E., 2002 - *Primary aromatic character of wine*. Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology XVI, 1.
- 84.Liger-Belair G., 2017 - *Effervescence in Champagne and SparklingWines: From Grape Harvest to Bubble Rise*. The European Physical Journal Special Topics 226, 3–116.
- 85.Lima M.D.S., Da Conceição Prudencio Dutra M., Toaldo I.M., Corrêa L.C., Pereira G.E., De Oliveira D., Bordignon-Luiz M.T., Ninow J.L., 2015 - *Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration*. Food Chemistry 188, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.014>.
- 86.Lima M.M.M., Choy Y.Y., Tran J., Lydon M., Runnebaum R.C., 2022 - *Organic acids characterization: wines of Pinot noir and juices of 'Bordeaux grape varieties'*. Journal of Foods Composition and analysis 114:104745. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104745>.
- 87.Lima M.M.M., Hernandez D., Yeh A., Reiter T., Runnebaum R.C., 2020 - *Reproducibility of elemental profile across two vintages in pinot noir wines from fourteen different vineyard sites*. Food Research International 141, 110045 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110045>.
- 88.López M., Alvarez S., Riera F.A., Alvarez R., Álvarez-Blanco S., 2002 - *Production of Low Alcohol Content Apple Cider by Reverse Osmosis*. Industrial & Engineering Chemistry Research 41, 6600–6606.
- 89.Loureiro V., Malfeito-Ferreira M., 2003 - *Spoilage Yeasts in the Wine Industry*. International Journal of Food Microbiology 86, 23–50.
- 90.Loyaux D., Roger S., Adda J., 1981 - *The evolution of champagne volatiles during aging*. Journal of the Science of Food and Agriculture 32(12), 1254e1258.
- 91.Marchal R., Chaboche D., Douillard R., Jeandet, P., 2002a - *Influence of lysozyme on Champagne base wine foaming properties*. J. Agric. Food Chem., 50:1420.
- 92.Marchal R., Chaboche D., Marchal-Delahaut L., Gerland C., Gandon, J.P., Jeandet P., 2000 - *Detection and quantification of lysozyme in Champagne wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 3225.
- 93.Marchal R., Lallement A., Jeandet P., Establet G., 2003 - *Clarification of Muscat musts using wheat proteins and the flotation technique*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 2040.
- 94.Marchal R., Marchal-Delahaut L., Michels F., Parmentier M., Lallement A., Jeandet P., 2002b - *Wheat gluten used as clarifying agent of musts and white wines*. American Journal of Enology and Viticulture, 53: 308.
- 95.Marcon Â.R., Schwarz L., Dutra S., Delamare A., Gottardi F., Parpinello G., Echeverrigaray S., 2019 - *Chemical Composition and Sensory Evaluation of Wines Produced with Different Moscato Varieties*; EDP Sciences: Les Ulis, France 12, p. 02033.

96. Martinez-Lapuente L., Guadalupe Z., Ayestaran B., Ortega-Heras M., Perez-Margarino S., 2013 - *Changes in Polysaccharide Composition during Sparkling Wine Making and Aging*. Journal of Food Agricultural and Food Chemistry 61: 12362-12373. [dx.doi.org/10.1021/jf403059p](https://doi.org/10.1021/jf403059p).
97. Martínez-Rodríguez A.J., Polo M.C., Carrascosa A.V., 2001a - *Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines*. International Journal of Food Microbiology, 71, 45–51.
98. Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa A.V., Barcenilla J.M., Pozo-Bayón M.A., Polo, M.C., 2001b - *Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production*. Food Microbiology 18, 183–191.
99. Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., 2008 - *Sparkling Wines and Yeast Autolysis*. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Springer Nature: Berlin, Germany, 61–80.
100. Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa A.V., Polo M.C., 2001c - *Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of Saccharomyces cerevisiae during induced autolysis in a model wine system*. International Journal in Food Microbiology 68, 155–160.
101. Martí-Raga M., Peltier E., Mas A., Beltran G., Marullo P., 2017 - *Genetic causes of phenotypic adaptation to the second fermentation of sparkling wines in Saccharomyces cerevisiae*. Genes 7:399-412.
102. Mas A., Padilla, B., Esteve-Zarzoso B., Beltran G., Reguant C., Bordons A., 2016 - *Taking advantage of natural biodiversity for wine making: the WILDWINE project*. Agriculture and Agricultural Science Procedia 8, 4–9.
103. Maujean A., Seguin N., 1983 - *Contribution à l'étude des goûts de lumière dans les vins de Champagne. Les réactions photochimiques responsables des goûts de lumière dans le vin de Champagne*. Sciences des Aliments, 3: 589.
104. McMahon K.M., Culver C., Castura J.C., Ross C.F., 2017 - *Perception of carbonation in sparkling wines using descriptive analysis (DA) and temporal check-all-that-apply (TCATA)*. Food quality and preference 59:14-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.01.017>.
105. McMahon K.M., Culver C., Ross C. F., 2017 - *The production and consumer perception of sparkling wines of different carbonation levels*. Journal of Wine Research 28.
106. Medina-Trujillo L., González-Royo E., Sieczkowski N., Heras J., Canals J.M., Zamora F., 2016 - *Effect of Sequential Inoculation (Torulaspora Delbrueckii/Saccharomyces Cerevisiae) in the First Fermentation on the Foaming Properties of Sparkling Wine*. Bio Web of Conferences 7:02024. <http://dx.doi.org/10.1051/bioconf/20160702024>.
107. Mena C.M., Cabrera C., Lorenzo M.L., 1997 - *Determination of lead contamination in Spanish wines and other alcoholic beverages by flow injection atomic absorption spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45:1812–1815

108. Molina A.M., Swiegers J.H., Varela C., Pretorius I.S., Agosin E., 2007 - *Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds*. Applied Microbiology and Biotechnology 77, 675–687.
109. Molnar I., Oura E., Suomalainen H., 1981 - *Study of volatile substances produced during autolysis of Champagne yeasts*. Acta Alimentaria 10, 27–36.
110. Moreno J., Peinado R., 2012 - *Enological chemistry* (ediția 1), Editura Academic Press.
111. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C., 2009 - *Wine chemistry and biochemistry*, Editura Springer Science+Business Media.
112. Muñoz-Redondo J.M., Ruiz-Moreno M.J., Puertas B., Cantos-Villar E., Moreno-Rojas J.M., 2020 - *Multivariate optimization of headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of terpenoids in sparkling wines*. Talanta 208, 120483.
113. Mustea M., 2004 - *Viticultura, bazele biologice, înființarea și întreținerea plantațiilor tinere de vii roditoare*. Editura Ion Ionescu de la Brad, Iași.
114. Nascimento A.M.D.S., De Souza J.F., Lim M.D.S., Pereira G.E., 2018 - *Volatile Profiles of Sparkling Wines Produced by the Traditional Method from a Semi-Arid Region*. Beverages 4, 103.
115. Nunez Y.P., Carrascosa A.V., Gonzalez R., Polo M.C., Martinez- Rodriguez A.J., 2005 - *Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by a champenoise method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 7232–7237.
116. Nykänen L., 1986 - *Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages*. American Journal of Enology and Viticulture 37, 84–96.
117. Oșlobeanu M., Macici M., Georgescu M., Stoian V., 1992 - *Zonarea soiurilor de viță de vie în România*, Editura Ceres, București
118. Palacios S., Vasserot Y., Maujean A., 1997 - *Evidence of sulfur products adsorption by yeast lees*. American Journal of Enology and Viticulture 48: 525.
119. Passe D.H., Horn M., Murray R., 1997 - *The effects of beverage carbonation on sensory responses and voluntary fluid intake following exercise*. International Journal of Sport Nutrition 7, 286–297.
120. Penacho V., Valero E., Gonzalez R., 2012 - *Transcription profiling of sparkling wine second fermentation*. International Journal of Food Microbiology 153, 176–182.
121. Pérez-Bernal J.L., Villar-Navarro M., Morales M.L., Ubeda C., Callejón R.M., 2017 - *The smartphone as an economical and reliable tool for monitoring the browning process in sparkling wine*. Computers and Electronics in Agriculture 141, 248–254.
122. Pérez-Magariño S., Ortega-Heras M., Martínez-Lapuente L., Guadalupe Z., Ayestarán B., 2013 - *Multivariate analysis for the differentiation of sparkling wines elaborated from autochthonous Spanish grape varieties: volatile compounds, amino acids*

and biogenic amines. *European Food Research and Technology* 236:827-841. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-013-1934-9>.

123. Perpetuini G., Di Gianvito P., Arfelli G., Schirone M., Corsetti A., Tofalo R., Suzzi G., 2016 - *Biodiversity of autolytic ability in flocculent Saccharomyces cerevisiae strains suitable for traditional sparkling wine fermentation*. *Yeast* 33 (7): 303–312. <https://doi.org/10.1002/yea.3151>.

124. Pickering G.J., Heatherbell D.A., Vanhanen L.P., Barnes M., 1998 - *The effect of ethanol concentration on the temporal perception of viscosity and density in white wine*. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 306–318.

125. Pohl P., 2007 - *What do metals tell us about wine?* *Trends in Analytical Chemistry* 26, 941–949.

126. Pons-Mercadé P., Giménez P., Gombau J., Vilomara G., Conde M., Cantos A., Rozès N., Canals J.M., Zamora F., 2020 - *Oxygen consumption rate of lees during sparkling wine (Cava) aging; influence of the aging time*. *Food chemistry* 342:128234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128238>.

127. Postel W., Ziegler L., 1991 - *Influence of the duration of yeast contact and of the manufacturing process on the composition and quality of sparkling wines*. *Wein-Wissenschaft* 46, 26e32.

128. Pozo-Bayon M.A., Hernandez, M.T., Martin-Alvarez, P.J., Polo, M. C., 2003 - *Study of low molecular weight phenolic compounds during the aging of sparkling wines manufactured with red and white grape varieties*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2089-2095.

129. Pozo-Bayón M.A., Martinez-Rodriguez A., Pueyo E., Moreno-Arribas M.V., 2009 - *Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology*. *Trends in Food Science & Technology* 20: 289-299. doi:10.1016/j.tifs.2009.03.011.

130. Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., Polo M.C., 1995 - *Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (sparkling wines)*. *American Journal of Enology and Viticulture* 46:518-524.

131. Pușcă I., 1985 - *Tehnologia de preparare a vinurilor spumante*. Editura Ceres, București.

132. Raymond Eder M.L., Rosa A.L., 2021 - *Non-conventional grape varieties and yeast starters for first and second fermentation in sparkling wine production using the traditional method*. *Fermentation* 7 (4):321. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040321>.

133. Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., 2004 - *Trattato di Enologia I Microbiologia del Vino*. Edagricole: Bologna, Italy.

134. Riu-Aumatell M., Bosch-Fusté J., López-Tamames E., Buxaderas S., 2006 - *Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees*. *Food Chemistry* 95, 237–242.

135. Robles A., Fabjanowicz M., Chmiel T., Płotka-Wasyłka J., 2019 - *Determination and identification of organic acids in wine samples*. *Problems and*

challenges. Trends in Analytical Chemistry 120. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>.

136. Rotaru L., 2009 - *Soiuri de viță de vie pentru struguri de vin*. Editura “Ion Ionescu de la Brad”, Iași.

137. Ruiz-Moreno M.J., Muñoz-Redondo J.M., Cuevas F.J., Marrufo-Curtido A., Leon J.M., Ramírez P., Moreno-Rojas J.M., 2016 - *The influence of pre-fermentative maceration and ageing factors on ester profile and marker determination of Pedro Ximenez sparkling wines*. Food chemistry 230: 697-704. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.048>.

138. Saha B., Torley P., Blackmann J.W., Schmidtke L.M., 2013 - *Review of processing technology to reduce alcohol levels in wines*. Proceedings of the 1st International Symposium Oenoviti International, Bordeaux, France.

139. Saliba A., Ovington L.A., Moran C., 2013 - *Consumer demand for low-alcohol wine in an Australian sample*. International Journal of Wine Research 1.

140. Sánchez-Palomo E., Díaz-Maroto M.C., Pérez-Coello M.S., 2005 - *Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS*. Talanta 66, 1152–1157.

141. Sartor S., Toaldo I.M., Panceri C.P., Caliarì V., Luna A.S., de Gois J.S., Bordignon-Luiz M.T., 2019 - *Changes in organic acids, polyphenolic and elemental composition of rosé sparkling wines treated with mannoproteins during over-lees aging*. Food Research International 124, 34–42.

142. Satyanarayana T., Kunze G., 2009 - *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer: Berlin, Germany.

143. Scutarașu E.C., 2021 - *Studii privind influența folosirii unor preparate enzimactice în tehnologia de obținere a vinurilor albe în podgoria Iași*, Teză de doctorat, USV Iași.

144. Strauss C.R., Wilson B., Gooley P.R., Williams P.J., 1986 - *Role of Monoterpenes in Grape and Wine Flavor*. ACS Symposium Series 1380:222–242.

145. Swiegers J., Bartowsky E., Henschke P., Pretorius I.S., 2005 - *Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour*. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 139–173.

146. Takacs L., Vatai G., Korány K., 2007 - *Production of alcohol free wine by pervaporation*. Journal of Food Engineering 78, 118–125.

147. Tariba B., 2011 - *Metals in wine-Impact on wine quality and health outcomes*. Biological Trace Element Research 144, 143–156.

148. Tini V., Zambonelli C., Benevelli M., Castellari L., 1995 - *I ceppi autolisogeni di Saccharomyces cerevisiae in spumantizzazione*. Industrial Bevande XXIV:113–118.

149. Teliban I.V., 2021 - *Studii privind evoluția compușilor volatili și a acizilor la producerea vinurilor albe din soiurile Fetească regală și Aligote, în Centrul Viticol Bucium din Podgoria Iași*. Teză de doctorat, USV Iași.

150. Tofalo R., Perpetuini G., Rossetti A.P., Gaggiotti S., Piva A., Olivastri L., Cicheli A., Compagnone D., Arfelli G., 2022 - *Impact of Saccharomyces cerevisiae and*

- non-Saccharomyces yeasts to improve traditional sparkling wines production*. Food Microbiology 108:104097. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104097>.
151. Torchio F., Segade S.R., Gerbi V., Cagnasso E., Giordano M., Giacosa S., Rolle L., 2012 - *Changes in varietal volatile composition during shelf-life of two types of aromatic red sweet Brachetto sparkling wines*. Food Research International 48, 491–498.
 152. Torrens J., Riu-Aumatell M., Vichi S., López-Tamames E., Buxaderas S., 2010 - *Assessment of Volatile and Sensory Profiles between Base and Sparkling Wines*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 2455–2461.
 153. Torrens J., Urpí P., Riu-Aumatell M., Vichi S., López-Tamames E., Buxaderas S., 2008 - *Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine*. International Journal of Food Microbiology 124:48–57.
 154. Torresi S., Frangipane M.T., Anelli G., 2011 - *Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review*. Food chemistry 129: 1232-1241. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.006.
 155. Tracey R.P., Britz T.J., 1989 - *The effect of amino acids on malolactic fermentation by Leuconostoc oenos*. Journal of Applied Bacteriology, 67: 589.
 156. Tufariello M., Chiriatti M.A., Grieco F., Perrotta C., Capone S., Rampino P., Tristezza M., Mita G., Grieco F., 2014 - *Influence of Autochthonous Saccharomyces Cerevisiae Strains on Volatile Profile of Negroamaro Wines*. LWT-Food Science and Technology 58, 35–48.
 157. Tufariello M., Rizzuti A., Palombi L., Ragone R., Capozzi V., Gallo V., Mastorilli P., Grieco F., 2021 - *Non-Targeted Metabolomic Approach as a Tool to Evaluate the Chemical Profile of Sparkling Wines Fermented with Autochthonous Yeast Strains*. Food control 126:108099.
 158. Valade M., Panaiotis F., Tribault-Sohier I., 1993 - *Les problèmes organoleptiques liés au bouchon de liège*. Le Vigneron Champenois 3: 35.
 159. Valero E., Millan C., Ortega J.M., 2001 - *Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in Saccharomyces cerevisiae (M,30-9) in enological fermentations*. Journal of Bioscience and Bioengineering 92, 33-38.
 160. Vararu F., Moreno-García J., Zamfir C.I., Cotea V.V., Moreno J., 2016 - *Selection of aroma compounds for the differentiation of wines obtained by fermenting musts with starter cultures of commercial yeast strains*. Food Chemistry 197:373–381.
 161. Vasserot Y., Pitois C., Jeandet P. (2001). *Protective effect of a composite cork stopper on Champagne wine pollution with 2,4,6-trichloroanisole*. American Journal of Enology and Viticulture 52: 280.
 162. Vasserot Y., Steinmetz V., Jeandet P., 2003 - *Study of thiol consumption by yeast lees*. Ant. Leeuwenhoek, International Journal of Molecular Microbiology 83: 201.
 163. Velázquez R., Zamora E., Álvarez M.L., Ramírez M., 2019 - *Using Torulaspora Delbrueckii Killer Yeasts in the Elaboration of Base Wine and Traditional Sparkling Wine*. International Journal of Food Microbiology 289:134–144.

164. Vigentini I, Cardenas S.B., Valdetara F., Faccincani M., Panont C.A., Picozzi C., Foschino R., 2017 - *Use of Native Yeast Strains for In-Bottle Fermentation to Face the Uniformity in Sparkling Wine Production*. *Frontiers in Microbiology* 8, 1225.
165. Viviers M.Z., Smith M.E., Wilkes E., Smith P., 2013 - *Effects of five metals on the evolution of hydrogen sulfide, methanethiol, and dimethyl sulfide during anaerobic storage of chardonnay and shiraz wines*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 12385–12396.
166. Vogt E.I., Kupfer V.M., Vogel R.F., Niessen L., 2017 - *Evidence of Gushing Induction by Penicillium Oxalicum Proteins*. *Journal of Applied Microbiology* 122, 708–718.
167. Volpe M.G., La Cara F., Volpe F., De Mattia A., Serino V., Petitto F., Zavalloni C., Limone F., Pellecchia R., De Prisco P.P., 2009 - *Heavy metal uptake in the enological food chain*. *Food Chemistry* 117, 553–560.
168. Waterhouse A.L., Sacks G.L., Jeffery D.W., 2016 - *Understanding wine chemistry*, Editura Wiley.
169. ***, 2015 - *Review document on sensory analysis of wine*, OIV, Franța. <https://www.oiv.int/public/medias/3307/review-on-sensory-analysis-of-wine.pdf>
170. ***, 2020 - *Compendium of International Methods of Analysis of Vines and Musts*. OIV, Franța.
171. ***, 2023 – *International Code of Oenological Practices*. OIV, Franța.
172. ***ISO 3591:1977. *Sensory Analysis. Apparatus. Wine-tasting glass*
173. ***ISO 8589: 2010. *Sensory Analysis. General guidance for the design of test room*
174. ***www.goodpairedays.com
175. ***www.spitbucket.net
176. ***www.statiunea-viticola-iasi.ro
177. ***www.champagne-mandois.fr
178. www.agilent.com

ANEXE

APPENDICES

LISTA PUBLICAȚIILOR

LIST OF PUBLICATIONS

Lucrări ISI

1. **Foce M.C.**, Luchian C.E., Moroșanu A.M., Niculaua M., Cotea V.V., Odăgeriu G., Zamfir C.I., 2017 - *Content of metals and organic acids from experimental sparkling white wine*. Bio Web of Conferences 9: 02007. Doi: 10.1051/bioconf/20170902007.
2. Andrieș M.T., Zamfir C.I., Luchian C.E., Niculaua M., Colibaba C., Odăgeriu G., **Foce M.C.**, Cotea V.V., 2017 - *Reverse osmosis influence over the content of metals and organic acids in low alcoholic beverages*. Bio Web of Conferences 9:02005. Doi: 10.1051/bioconf/20170902005.
3. Cotea V.V., **Foce M.C.**, Luchian C.E., Colibaba L.C., Scutarașu E.C., Niculaua M., Zamfir C.I. Popîrdă A., 2021 - *Influence of different commercial yeasts on volatile fraction of sparkling wines*. Foods 10(2):247. Doi: 10.3390/foods10020247.

Lucrări BDI

1. **Foce M.C.**, Luchian C., Zamfir C. , Niculaua M., Moroșanu A.M., Nistor A., Andrieș T., Lăcureanu G., Cotea V.V., 2017 - *Organoleptic chracteristics of experimental sparkling wines*. Lucrări științifice seria Horticultură 60 (2): 221-226, USAMV Iași.

Prezentări conferințe

1. **Foce M.**, **Cotea V.V.** **Luchian C.**, **Niculaua M.**, **Moroșanu A.M.**, **Nistor A.**, **Zamfir C.**, 2017 - *The volatile profile of sparkling wines obtained by classical method and using reverse osmosis*; prezentată la al 16-lea Simpozion Internațional „Perspective ale agriculturii mileniului 3”, organizat de USAMV Cluj-Napoca, în perioada 28-30 septembrie 2017.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1: Cercetări privind importanța levurilor indigene în vinificație	55
Tabelul 3.1: Parametri de lucru pentru evaluarea metalelor prin lichid cromatografie	75
Tabelul 3.2: Parametri de lucru pentru evaluarea acizilor organici prin lichid cromatografie	75
Tabelul 4.1: Parametri fizico-chimici generali ai probelor după 6 luni de păstrare	80
Tabelul 4.2: Parametri fizico-chimici generali ai probelor analizate la 11 luni	81
Tabelul 4.3: Rezultatele testului post-hoc Tukey HSD asupra parametrilor fizico-chimici determinați la 6 luni de păstrare	82
Tabelul 4.4: Rezultatele testului post-hoc Tukey HSD asupra parametrilor fizico-chimici determinați la 11 luni de păstrare	83
Tabelul 4.5: Conținutul de ioni metalici din probele experimentale analizate	86
Tabelul 4.6: Conținutul de metale grele din probele experimentale analizate	87
Tabelul 4.7: Rezultatele testul Tukey HSD pentru principalii ioni metalici analizați	88
Tabelul 4.8: Rezultatele testul Tukey HSD pentru metalele grele	89
Tabelul 4.9: Acizii organici identificați în materia primă a vinului și în vinurile spumante analizate	93
Tabelul 4.10: Rezultatele analizei post-hoc Tukey HSD pentru acizii organici analizați	94
Tabelul 4.11: Influența levurilor asupra concentrației compușilor volatili	100
Tabelul 4.12: Diferențe semnificative evidențiate prin testul Tukey HSD	102
Tabelul 4.13: Încărcările factoriale ale probelor experimentale	103

LIST OF TABELS

Table 1.1: Research on the importance of indigenous yeasts in winemaking	55
Table 3.1: Working parameters for the evaluation of metals by liquid chromatography	75
Table 3.2: Working parameters for the evaluation of organic acids by liquid chromatography	75
Table 4.1: General physico-chemical parameters of the samples after 6 months of storage	80
Table 4.2: General physico-chemical parameters of the samples analyzed at 11 months	81
Table 4.3: Tukey HSD post hoc test results on the determined physicochemical parameters on 6 months of storage	82
Table 4.4: Tukey HSD post hoc test results on physicochemical parameters determined at 11 months of storage	83
Table 4.5: The content of metal ions in the analyzed experimental samples	86
Table 4.6: Heavy metal content of the analyzed experimental samples	87
Table 4.7: Tukey HSD test results for the analyzed metal ions	88
Table 4.8: Tukey HSD test results for heavy metals	89
Table 4.9: Organic acids identified in the raw material of the wine and in the analyzed sparkling wines	93
Table 4.10: Tukey HSD post hoc analysis results for the analyzed organic acids	94
Table 4.11: Influence of yeasts on the concentration of volatile compounds	100
Table 4.12: Significant differences revealed by the Tukey HSD test	102
Table 4.13: Factor loadings of the experimental samples	103

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1: Recoltarea manuală a strugurilor și condiționarea acestora	38
Figura 1.2. Reprezentarea schematică a elementelor morfologice și modificările biochimice ale levurii în timpul autolizei în vinul spumant	43
Figura 1.3: Etapele procesului de obținere a vinurilor spumante prin metoda Champenoise	46
Figura 1.4: Obținerea vinurilor spumante prin metoda transvazării	47
Figura 1.5: Metoda ancestrală de obținere a vinurilor spumante	48
Figura 1.6: Obținerea vinurilor spumante prin fermentare în cisterne	49
Figura 2.1: Exemple de alcooli: 1-propanol; 2-metil-1-propanol	56
Figura 2.2: Acidul galic; cis-resveratrol; acidul trans-cafeic; quercitina; acidul gentisic.	57
Figura 2.3: 4-mercapto-4-metil-2-pentanonă; citral; geraniol	58
Figura 2.4: Leucina; izoleucina; valina; fenilalanina; treonina	59
Figura 3.1: Evidențierea arealului geografic al podgoriei Iași-Copou, România	66
Figura 3.2: Struguri Muscat Ottonel	67
Figura 3.3: Procesarea strugurilor în vederea obținerii vinului-bază	68
Figura 3.4: Etapele tehnologice ale obținerii procelor experimentale	69
Figura 3.5: Dopuirea buteliilor în vederea defășurării fermentației secundare	70
Figura 3.6: Poziționarea înclinată a buteliilor în vederea realizării remuajului	71
Figura 3.7: Eliminarea sedimentului prin degorjare	72

Figura 3.8: Etichete utilizate pentru probele experimentale	72
Figura 3.9: Depozitarea probelor	73
Figura 3.10: Sistem de gaz-cromatografie Agilent 7890A	74
Figura 3.11: Exemplu de cromatogramă obținută la testarea vinurilor spumante	76
Figura 3.12: Organizarea sesiunii de evaluare senzorială a probelor experimentale	77
Figura 4.1: Analiza componentelor principale asupra rezultatelor privind compuşii volatili	104
Figura 4.2: Evidențierea cantității de compuși volatili cu ajutorul hărții termice	105
Figura 4.3: Profilul senzorial al probei V1	106
Figura 4.4: Profilul senzorial al probei V2	107
Figura 4.5: Profilul senzorial al probei V3	117
Figura 4.6: Profilul senzorial al probei V4	108

LIST OF FIGURES

Figure 1.1. Schematic representation of morphological elements and biochemical changes of yeast during autolysis in sparkling wine.	38
Figure 1.2: Stages of the process of obtaining sparkling wines by the Champenoise method	43
Figure 1.3: Obtaining sparkling wines by the transfer method	46
Figure 1.4: The ancestral method of obtaining sparkling wines	47
Figure 1.5: Obtaining sparkling wines by fermentation in tanks	48
Figure 2.1: Examples of alcohols: 1-propanol; 2-methyl-1-propanol	49
Figure 2.2: Gallic acid; <i>cis</i> -resveratrol; <i>trans</i> -caffeic acid; quercetin; gentisic acid	56
Figure 2.3: 4-mercapto-4-methyl-2-pentanone; citral; geraniol	57
Figure 2.4: Leucine; isoleucine; valine; phenylalanine; threonine	58
Figure 3.1: The geographical area of the Iasi Copou vineyard, Romania	59
Figure 3.2: Muscat Ottonel grapes	66
Figure 3.3: Processing of grapes to obtain the base wine	67
Figure 3.4: Technological stages of obtaining experimental trials	68
Figure 3.5: Filling the bottles for secondary fermentation	69
Figure 3.6: Inclined positioning of the bottles to carry out the remuage	70
Figure 3.7: Sediment removal by degorging	71
Figure 3.8: Labels used for experimental samples	72
Figure 3.9: Sample storage	72

Figure 3.10: Agilent 7890A Gas-Chromatography system	73
Figure 3.11: Example of a chromatogram obtained when testing sparkling wines	74
Figure 3.12: Organization of the sensory evaluation session of the experimental samples	76
Figure 4.1: Principal component analysis of volatile compound results	77
Figure 4.2: Highlighting the amount of volatile compounds using the thermal map	104
Figure 4.3: Sensory profile of V1 sample	105
Figure 4.4: Sensory profile of V2 sample	106
Figure 4.5: Sensory profile of V3 sample	107
Figure 4.6: Sensory profile of V4 sample	117