

“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IAȘI
DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL DOMAIN: HORTICULTURE
SPECIALIZATION: VITICULTURE AND OENOLOGY

DOCTORAL THESIS

PhD student,
Eng. Sorin C. Macoviciuc

PhD supervisor,
Univ. prof. PhD Valeriu V. Cotea m.c A.R.

IAȘI
2024

**UNIVERSITATEA PENTRU ȘTIINȚELE VIETII “ION IONESCU DE LA
BRAD” IAȘI
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘIINȚE INGINEREȘTI
DOMENIUL: HORTICULTURĂ
SPECIALIZAREA: VITICULTURĂ ȘI OENOLOGIE**

**TEZĂ DE DOCTORAT
CONTRIBUȚII LA DIVERSIFICAREA SORTIMENTELOR DE
VINURI FĂRĂ ADAOS DE SULFIȚI DIN PODGORIA PANCIU
Doctorand,
Ing. Sorin C. Macoviciuc**

**Conducător de doctorat,
Prof. univ. dr. Valeriu V. Cotea m.c. A.R.**

**IAȘI
2024**

**“ION IONESCU DE LA BRAD” UNIVERSITY OF LIFE SCIENCES IAȘI
DOCTORAL SCHOOL OF ENGINEERING SCIENCES
DOCTORAL DOMAIN: HORTICULTURE
SPECIALIZATION: VITICULTURE AND OENOLOGY**

DOCTORAL THESIS
**CONTRIBUTIONS TO THE DIVERSIFICATION OF SULFITE-
FREE WINE VARIETIES FROM THE PANCIU VINEYARD**
PhD student,
Eng. Sorin C. Macoviciuc

PhD supervisor,
Univ. prof. PhD Valeriu V. Cotea c.m. R.A.

IAȘI
2024

CUPRINS

INTRODUCERE	14
REZUMAT.....	16
PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII.....	26
1 ROLUL DIOXIDULUI DE SULF ÎN VINIFICAȚIE	27
1.1 Context	27
1.2 Chimia dioxidului de sulf	29
1.3 Moleculele care leagă dioxidul de sulf	30
1.3.1 Acetaldehida.....	30
1.3.2 Acizi cetonici	31
1.3.3 Zaharuri și derivați	32
1.3.4 Molecule cu grup dicarbonilic.....	33
1.3.5 Alte combinații.....	33
1.4 Proprietățile anti-microbiene ale dioxidului de sulf.....	33
1.4.1 Activitățile antifungice.....	33
1.4.2 Activități antibacteriene ale dioxidului de sulf.....	35
1.4.3 Activitatea antioxidantă a dioxidului de sulf.....	36
1.5 Mecanismul de acțiune și importanța SO ₂ în industria vinului.....	37
1.6 Efectele fiziologice ale dioxidului de sulf	38
1.7 Efectele adverse ale SO ₂ și reglementări legale.....	39
1.8 Alterarea bacteriană a vinului	40
1.9 Principii privind alterarea bacteriană a vinului	40
1.10 Îndepărtarea sau inhibarea bacteriilor nedorite din vin	43
2 SUBSTANȚE CHIMICE ȘI PROCESE FIZICE CA ALTERNATIVĂ LA SO ₂ FOLOSIT ÎN TIMPUL VINIFICAȚIEI.....	44
2.1 Generalități	44
2.2 Dicarbonatul de dimetil	44
2.3 Lizozima	45
2.4 Chitosan	46
2.5 Extracte de plante naturale.....	46
2.6 Extracte fenolice pe bază de struguri.....	47
2.7 Extractele din lăstari de viță de vie	48
2.8 Glutacion	49
2.9 Specii fermentative/protective de tip <i>Pichia Kluyveri</i>	50
2.10 Impactul levurilor de tip <i>P. kluyveri</i> asupra parametrilor de calitate ai vinului ..	51
2.10.1 Etanol	51
2.10.2 Glicerol	52
2.10.3 Acizii organici.....	52
2.10.4 Compuși aromatici	53
2.10.5 Aminoacizi.....	55
2.10.6 Impact senzorial în fermentarea vinurilor convenționale.....	56
2.10.7 Factorul killer și influența sa asupra ecologiei vinului.....	56
2.11 Procese de tratare fizică - mecanică.....	58

2.11.1	Procese termice	58
2.11.2	Procese care nu implică tratamente termale.....	59
2.11.3	Presiune hidrostatică ridicată	59
2.11.4	Ultrasunete de mare putere.....	60
2.11.5	Iradieră Ultra-violet.....	60
2.11.6	Tehnologie de câmp electric pulsat.....	61
3	CADRUL ORGANIZATORIC ȘI INSTITUȚIONAL	62
3.1	Descrierea Centrului de Cercetări pentru Oenologie “Valeriu D. Cotea”	62
3.2	Cadru natural și particularități geologice ale Podgoriei Panciu	64
3.3	Particularități ale soiurilor cultivate.....	65
3.3.1	Fetească regală	65
3.3.2	Cabernet Sauvignon	66
	PARTEA A II A CONTRIBUȚII PERSONALE.....	68
4	SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE.....	69
5	TEHNOLOGIILE APLICATE PENTRU PRODUCEREA VINURILOR INCLUSE ÎN STUDIU	71
5.1	Tehnologia de vinificație a vinurilor albe liniștite din soiul Fetească Regală.....	71
5.2	Tehnologia de vinificație a vinurilor albe frizzante din soiul Fetească regală	73
5.3	Tehnologia de vinificație a vinurilor rozé din soiul Cabernet Sauvignon.....	75
5.4	Tehnologia de vinificație a vinurilor roșii din soiul Cabernet Sauvignon.....	77
6	EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ A VINURILOR INCLUSE ÎN STUDIU DE DEZVOLTARE TEHNOLOGICĂ	84
6.1	Context	84
6.2	Material și metode	84
6.3	Pregătirea probelor.....	85
6.4	Calibrare și validare a metodelor	85
6.5	Rezultate și discuții.....	85
6.5.1	Fetească regală liniștit	86
6.5.2	Fetească regală Frizzante	87
6.5.3	Cabernet Sauvignon vinificat roze	88
6.5.4	Cabernet Sauvignon vinificat roșu	89
6.6	Concluzii.....	90
7	CORELAȚIA DINTRE AMINOACIZII DETERMINAȚI ȘI AMINE BIOGENE ÎN CONDIȚIILE FERMENTAȚIEI MALOLACTICE SUPLIMENTARE.....	97
7.1	Context	97
7.2	Materiale și metode.....	99
7.2.1	Reactivi și materiale de referință.....	99
7.2.2	Condiții cromatografice	99
7.2.3	Prepararea probelor standard.....	100
7.2.4	Analiza statistică	101
7.3	Rezultate și discuții.....	102

	7.3.1	Concentrația de aminoacizi în relație cu aminele biogene	102
	7.3.2	Analiza componentelor principale	110
	7.4	Discuții privind variația aminoacizilor în corelație cu aminele biogene.....	111
	7.4.1	Mecanisme propuse de amine biogene în eșantioanele de vin	111
	7.5	Concluzii.....	115
8		EVALUAREA NIVELELOR DE ANTOCIANI ÎN CONTEXTUL VINURILOR VINIFICATE PRIN METODE CARE NU IMPLICĂ UTILIZAREA SO₂	117
	8.1	Context	117
	8.2	Reactivi și materiale de referință	118
	8.2.1	Metode instrumentale.....	118
	8.2.2	Analiză statistică	119
	8.3	Rezultate și discuții.....	119
	8.3.1	Evaluare instrumentală.....	119
	8.3.2	Evaluarea probelor analitice.....	121
	8.3.3	Discuții privind evoluția antocianilor în contextul utilizării amestecurilor taninice	128
	8.3.4	Analiza discriminant liniară	130
	8.4	Concluzii.....	132
9		MONITORIZAREA EVOLUȚIEI DIN PUNCT DE VEDERE A MODIFICĂRILOR PARAMETRILOR SPECIFICI STĂRILOR ANTI-OXIDANTE	134
	9.1	Evaluarea diferențelor de culoare prin tehnici CIELab.....	134
	9.1.1	Principiul metodei	134
	9.1.2	Analiza caracteristicilor cromatice.....	134
	9.2	Rezultate și discuții.....	135
	9.3	Evaluarea tendințelor de evoluție din punct de vedere a modificărilor capacității anti-radicalice.....	143
	9.3.1	Principii.....	143
	9.3.2	Reactivi și instrumente.....	143
	9.3.3	Interpretarea statistică a datelor spectrofotometrice.....	144
	9.4	Evaluarea valorilor pentru DPPH în condițiile mediilor produse.	148
	9.5	Testarea conținuturilor de polifenoli, flavone și taninuri implicați în stabilitatea vinurilor fără SO ₂	150
	9.5.1	Determinarea conținutului total de fenoli.....	150
	9.5.2	Determinarea conținutului total de flavone.....	151
	9.5.3	Rezultate și discuții privind implicațiile în calitatea și stabilitatea anti-oxidantă a vinurilor.....	152
	9.5.4	Concluzii	158
10		EFACTUL NIVELELOR DE DIOXID DE SULF ADĂUGAT ASUPRA CARACTERISTICILOR AROMATICE ALE VINURILOR DIN PODGORIA PANCIU	160
	10.1	Context	160

10.2	Material și metode	161
10.3	Rezultate și discuții privind implicațiile tehnologiilor de vinificație asupra compușilor volatili	161
10.3.1	Determinarea compușilor volatili.....	161
10.3.2	Efectul asupra fermentației alcoolice.....	163
10.3.3	Efectul asupra fermentației malolactice.....	166
10.4	Influența taninurilor oenologice asupra compușilor volatili	167
10.5	Concluzii.....	178
11	ANALIZA SENZORIALĂ ÎN ACORD CU EVOLUȚIA OXIDATIVĂ A VINURILOR.....	179
11.1	Context	179
11.2	Materiale și metode.....	179
11.3	Rezultate și discuții.....	180
11.4	Concluzii.....	186
12	BIBLIOGRAFIE	187
	LISTA FIGURILOR	208
	LISTA TABELELOR.....	211
	LISTA PUBLICAȚIILOR.....	215

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	14
ABSTRACT.....	16
PART I – CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	26
1 THE ROLE OF SULFUR DIOXIDE IN WINEMAKING	27
1.1 Context	27
1.2 Chemistry of sulfur dioxide	29
1.3 Molecules that bind sulfur dioxide	30
1.3.1 Acetaldehyde.....	30
1.3.2 Ketonic Acids.....	31
1.3.3 Sugars and derivatives.....	32
1.3.4 Molecules with dicarbonyl group.....	33
1.3.5 Other combinations	33
1.4 Antimicrobial properties of sulfur dioxide	33
1.4.1 Antifungal activities	33
1.4.2 Antibacterial activities of sulfur dioxide	35
1.4.3 Antioxidant activity of sulfur dioxide	36
1.5 Mechanism of action and importance of SO ₂ in the wine industry.....	37
1.6 Physiological effects of sulfur dioxide.....	38
1.7 Adverse effects of SO ₂ and legal regulations.....	39
1.8 Bacterial spoilage of wine.....	40
1.9 Principles regarding bacterial spoilage of wine	40
1.10 Removal or Inhibition of Undesirable Bacteria from Wine	43
2 CHEMICAL SUBSTANCES AND PHYSICAL PROCESSES AS ALTERNATIVES TO SO ₂ USED IN VINIFICATION	44
2.1 General information.....	44
2.2 Dimethyl dicarbonate.....	44
2.3 Lysozyme.....	45
2.4 Chitosan	46
2.5 Natural plant extracts.....	46
2.6 Grape-based phenolic extracts	48
2.7 Extracts from vine shoots	48
2.8 Glutathion	49
2.9 Fermentative/protective species like <i>Pichia Kluyveri</i>	50
2.10 Impact of <i>P. kluyveri</i> yeasts on various wine quality parameters.....	52
2.10.1 Ethanol	52
2.10.2 Glycerol.....	52
2.10.3 Organic acids	53
2.10.4 Aromati compounds.....	53
2.10.5 Amino acids	55
2.10.6 Sensory impact in conventional wine fermentation	56
2.10.7 The killer factor and its influence on wine ecology	56
2.11 Physical - mechanical treatment processes	59

2.11.1	Thermal processes.....	59
2.11.2	Processes that do not involve thermal treatments.	59
2.11.3	High hydrostatic pressure.....	59
2.11.4	High Power Ultrasound.....	60
2.11.5	Ultra-violet irradiation	60
2.11.6	Pulsed Electric Field Technology	61
PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS		68
3	THE ORGANIZATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK	62
3.1	Description of the Oenology Research Center "Valeriu D. Cotea"	62
3.2	Natural setting and geological peculiarities of the Panciu Vineyard.....	64
3.3	Particularities of cultivated varieties.....	65
3.3.1	Fetească regală	65
3.3.2	Cabernet Sauvignon	66
4	RESEARCH SCOPE AND OBJECTIVES, RESEARCH MATERIAL AND METHOD	69
5	THE TECHNOLOGIES APPLIED FOR THE PRODUCTION OF THE WINES INCLUDED IN THE STUDY	71
5.1	Vinification technology of still white wines from the Fetească Regală variety	71
5.2	Vinification technology of frizzante white wines from the Fetească Regală variety.....	73
5.3	Vinification technology of rosé wines from the Cabernet Sauvignon variety....	75
5.4	Vinification technology of red wines from the Cabernet Sauvignon variety	77
6	PHYSICAL-CHEMICAL EVALUATION OF THE WINES INCLUDED IN THE TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT STUDY	84
6.1	Context	84
6.2	Material and methods	84
6.3	Samples preparation	85
6.4	Calibration and validation of methods.....	85
6.5	Results and discussion	85
6.5.1	Fetească regală still	86
6.5.2	Fetească regală Frizzante	87
6.5.3	Cabernet Sauvignon vinified rose	88
6.5.4	Cabernet Sauvignon vinified red.....	89
6.6	Conclusions	90
7	CORRELATION BETWEEN DETERMINED AMINO ACIDS AND BIOGENOUS AMINES UNDER ADDITIONAL MALOLACTIC FERMENTATION CONDITIONS.....	97
7.1	Context	97
7.2	Material and methods	99
7.2.1	Reagents and reference materials	99
7.2.2	Chromatographic conditions	99
7.2.3	Preparation of standard samples.....	100
7.2.4	Statistical analysis	101

7.3	Results and discussion	102
7.3.1	Amino acid concentration in relation to biogenic amines	102
7.3.2	Principal component analysis	110
7.4	Discussions of amino acid variation in correlation with biogenic amines	111
7.4.1	Proposed mechanisms of biogenic amines in wine samples	111
7.5	Conclusions	115
8	ASSESSMENT OF ANTHOCYAN LEVELS IN THE CONTEXT OF WINES WINE BY METHODS NOT INVOLVING THE USE OF SO ₂	117
8.1	Context	117
8.2	Reagents and reference materials.....	118
8.2.1	Instrumental methods.....	118
8.2.2	Statistical analysis.....	119
8.3	Results and discussion	119
8.3.1	Instrumental evaluation.....	119
8.3.2	Evaluation of analytical samplese.....	121
8.3.3	Discussions regarding the evolution of anthocyanins in the context of the use of tannic mixtures	128
8.3.4	Linear discriminant analysis	130
8.4	Conclusions	132
9	MONITORING THE EVOLUTION FROM THE POINT OF VIEW OF CHANGES IN THE SPECIFIC PARAMETERS OF THE ANTI-OXIDANT STATES	134
9.1	Evaluation of color differences by CIELab techniques	134
9.1.1	The principle of the method	134
9.1.2	Analysis of chromatic characteristics.....	134
9.2	Results and discussion	135
9.3	Evaluation of evolutionary trends in terms of changes in anti-radical capacity	143
9.3.1	Principles.....	143
9.3.2	Reagents and instruments.....	143
9.3.3	Statistical interpretation of spectrophotometric data.....	144
9.4	Evaluation of DPPH values under the conditions of the produced media	148
9.5	Testing the contents of polyphenols, flavones and tannins involved in the stability of SO ₂ -free wines	150
9.5.1	Determination of total phenol content.....	150
9.5.2	Determination of total flavone content.....	151
9.5.3	Results and discussion of the implications for the quality and antioxidant stability of wines.....	152
9.5.4	Conclusions.....	158
10	THE EFFECT OF ADDED SULFUR DIOXIDE LEVELS ON THE AROMATIC CHARACTERISTICS OF WINES FROM THE PANCIU VINEYARD.....	160
10.1	Context	160
10.2	Material and methods	161

10.3 Results and discussion on the implications of winemaking technologies on volatile compounds	161
10.3.1 Determination of volatile compounds	161
10.3.2 Effect on alcoholic fermentation	163
10.3.3 Effect on malolactic fermentation	166
10.4 The influence of oenological tannins on volatile compounds	167
10.5 Conclusions	178
11 SENSORY ANALYSIS ACCORDING TO THE OXIDATIVE EVOLUTION OF WINES	179
11.1 Context	179
11.2 Material and methods	179
11.3 Results and discussion	180
11.4 Conclusions	186
12 BIBLIOGRAPHY	186
LIST OF FIGURES	207
LIST OF TABLES	209
LIST OF PUBLICATIONS	213

INTRODUCERE

Vinurile fără dioxid de sulf (SO_2) reprezintă o categorie specială de vinuri care sunt produse și procesate fără utilizarea acestui conservant comun în industria vinicolă. Aceste vinuri sunt adesea considerate opțiuni pentru cei sensibili la sulfiți sau pentru cei care preferă produsele naturale și minim procesate. Tendința generală este guvernată de schimbarea comportamentelor generale în privința consumului de alimente și produse înrudite, dar și datorită efectelor pe care le are dioxidul de sulf asupra sănătății umane, efecte care sunt stabilite și bine documentate în practica clinică și medicală.

Procesul de vinificație al vinurilor fără SO_2 implică adesea utilizarea unor tehnici specifice pentru a preveni oxidarea și a menține stabilitatea vinului. Printre aceste tehnici se numără utilizarea strictă a practicilor igienice în toate etapele de vinificație, de la recoltare până la îmbuteliere, și manipularea ușoară a strugurilor pentru a minimiza contactul cu oxigenul.

Deși vinurile fără SO_2 pot avea avantaje pentru sănătatea consumatorilor sensibili la sulfiți, cum ar fi evitarea reacțiilor alergice, ele pot fi mai sensibile la instabilitatea microbiologică și la oxidare. Astfel, producătorii trebuie să fie foarte atenți la condițiile de stocare și la manipularea corectă a acestor vinuri pentru a menține integritatea lor organoleptică. În acest scop cercetarea actuală este concentrată pe dezvoltarea de produse enologice, certificate, cu comptabilitate biologică totală, care pot suplini utilizarea dioxidului de sulf și a căror dezvoltare și testare este pe deplin realizată și validată astfel că pot reprezenta alternative apreciate și de bază în practica viti-vinicolă. În ceea ce privește profilul senzorial, vinurile fără SO_2 pot avea arome și gusturi diferite față de cele tratate cu sulf. Ele pot prezenta note fructate mai pure și o paletă aromatică mai complexă, în funcție de varietatea de struguri și de tehnologiile utilizate în procesul de fermentație.

În concluzie, vinurile fără SO_2 reprezintă o opțiune atractivă pentru consumatorii care caută alternative naturale și care sunt interesați de produse vinicole cu un profil aromatic distinct și mai puțin procesat. Cu toate acestea, ele necesită atenție suplimentară în gestionarea procesului de vinificație și în condițiile de stocare pentru a menține calitatea și stabilitatea în timp.

Studiul se concentrează pe impactul dioxidului de sulf (SO_2) asupra caracteristicilor vinului, în special asupra evoluției culorii și a capacității antioxidante, precum și asupra proprietăților aromatice ale vinurilor din Podgoria Panciu.

INTRODUCTION

Wines without sulfur dioxide (SO₂) represent a special category of wines that are produced and processed without using this common preservative in the wine industry. These wines are often considered options for those sensitive to sulfites or for those who prefer natural and minimally processed products. The general trend is governed by changing behaviors towards food and related products, driven by the known effects of sulfur dioxide on human health, effects that are well-established and documented in clinical and medical practice.

The production process of wines without SO₂ often involves specific techniques to prevent oxidation and maintain wine stability. These techniques include strict hygiene practices throughout all stages of winemaking, from harvesting to bottling, and gentle handling of grapes to minimize oxygen contact.

Although wines without SO₂ may offer health advantages for sulfite-sensitive consumers, such as avoiding allergic reactions, they can be more sensitive to microbiological instability and oxidation. Therefore, producers must be meticulous about storage conditions and proper handling to maintain their organoleptic integrity. Current research is focused on developing certified enological products with total biological compatibility that can substitute the use of sulfur dioxide, with their development and testing fully completed and validated, making them highly regarded alternatives in viticulture and winemaking practice.

Regarding sensory profile, wines without SO₂ can exhibit different aromas and flavors compared to sulfite-treated wines. They may present purer fruity notes and a more complex aromatic palette, depending on grape variety and fermentation techniques.

In conclusion, wines without SO₂ represent an attractive option for consumers seeking natural alternatives and are interested in wines with a distinct aromatic profile and minimal processing. However, they require additional attention in managing the winemaking process and storage conditions to maintain quality and stability over time. The study focuses on the impact of sulfur dioxide (SO₂) on wine characteristics, particularly on color evolution, antioxidant capacity, and aromatic properties of wines from the Panciu Vineyard.

REZUMAT

Cuvinte cheie: Fetească regală, Cabernet Sauvignon, dioxid de sulf, aminoacizi, amine biogene, antociani, activitate anti-radicalică, compuși volatili

Scopul studiului ”CONTRIBUȚII LA DIVERSIFICAREA SORTIMENTELOR DE VINURI FARA ADAOS DE SULFIȚI DIN PODGORIA PANCIU” este producerea, monitorizarea evoluției și calității vinurilor Cabernet Sauvignon și Fetească regală fără conținut de dioxid de sulf adăugat și vinificate în diverse variante tehnologice specifice tipului de vin realizat. În acest context s-a urmărit adaptarea a 4 variante tehnologice care acoperă cele mai importante categorii din punct de vedere a interesului și actualizărilor tehnologice și științifice în domeniul viticulturii și enologiei.

Punctele cheie ale studiului sunt concentrate pe etapele principale de vinificație adaptate la substituirea dioxidului de sulf prin utilizarea de specii non-*Saccharomyces* precum *Pichia Kluyvery* în faza inițială de tratare a strugurilor precum și prin desăvârșirea metodelor de protecție antioxidantă cu utilizarea produselor oenologice care s-au dovedit a avea un caracter protectiv la fel de eficient ca și SO₂.

Monitorizarea a fost realizată într-un studiu longitudinal cu etape transversale în care date complementare au fost colectate din diferite eșantioane (transversal), iar apoi rezultatele au fost urmărite în timp (longitudinal). În final, eșantioanele reprezentative au fost supuse evaluărilor de calitate și performanță.

Optimizarea procedurilor de vinificație. Esențial de notat este faptul că pentru vinurile fără dioxid de sulf, tratamentul strugurilor împotriva oxidării a constat în utilizarea *Pichia kluyveri*, în timp ce pentru vinurile cu dioxid de sulf, tratamentul a constat în utilizarea metabisulfidului de potasiu, acidului ascorbic și taninului galic.

O etapă importantă a fost protecția antioxidantă și conservarea. Protecția antioxidantă a fost realizată în 2 pași diferiți. Pentru vinurile cu dioxid de sulf adăugat, după finalizarea fermentației, protecția antioxidantă a fost realizată în principal cu adăugare de acid ascorbic în doze de 20 mg/L și soluții dioxid de sulf liber echivalent la 40 mg/L SO₂ liber. Toate vinurile au necesitat corecții ale acidității cu acid lactic în doze echivalente cu 6.1-6.3 g acid tartric/L.

Alte etape aplicate în metodele de vinificație au fost stabilizarea tartrică folosind carboximetil celuloză, gumă arabică sau poliaspartat de potasiu, iar limpezirea s-a efectuat utilizând bentonită, silice coloidală sau clei de pește, dozele fiind conform specificațiilor de tehnice de calitate, dar optimizate pentru fiecare tip de vin.

Corelația dintre aminoacizii determinați și amine biogene în condițiile fermentației malolactice suplimentare a avut ca scop evaluarea aminelor biogene

specifice pentru vinuri în relație cu aminoacizii corespunzători prin determinarea corelațiilor directe în perioada de maturare a vinului.

Vinurile roșii (Cabernet Sauvignon) au avut niveluri semnificativ mai mari de amine biogene 49,54 mg/L (523 $\mu\text{mol/L}$) în conținut total, continuând cu vinurile roze Cabernet Sauvignon roze (452 $\mu\text{mol/L}$), Fetească regală (386.5 $\mu\text{mol/L}$) și în final Fetească regală Frizzante (302.3 $\mu\text{mol/L}$).

Decarboxilarea este principal sursă de producere amine biogene produsă sub activitatea enzimelor responsabile de tip decarboxilază. Glutamina și arginina sunt implicate în formarea de putresceină și spermidină prin mecanism decarboxilare/dezaminare.

Agenții de clarificare folosiți precum bentonita și gelatina, au afectat nivelurile de aminoacizi din vin în măsuri diferite. S-a confirmat chelatizarea cu componente ale agenților de clarificare astfel că valori comparative între vinurile brute și vinurile condiționate au prezentat variații semnificative.

Ca o concluzie a studiului, o explicație a corelațiilor este faptul că pH-ul influențează enzimele decarboxilaze prin activare catalitică. Nivelele de pH ale vinurilor cuprinse între 3.0 și 4.0 nu au fost favorizante.

Din datele anterioare, absența SO_2 nu a influențat stabilitatea diferită a eșantioanelor, astfel încât o clasificare a distribuției din perspectiva fermentației malolactice și alcoolice a fost realizată folosind analiza componentelor principale (PCA).

Evaluarea nivelelor de antociani în contextul vinurilor vinificate prin metode care nu implică utilizarea SO_2 a avut ca obiectiv evaluarea substanțelor chimice și impactul senzorial a două produse comerciale de levuri non-*Saccharomyces* utilizate pentru bio-protecție.

pH-ul a fost important pentru stabilitatea vinurilor și a fost menținut între 3.1 și 3.3 pe durata procesului de vinificație. Pe perioada de monitorizare, s-a produs o modificare a pH-ului pusă pe seama variației acizilor organici determinată de posibil precipitarea acidului tartric, considerat instabil.

Impactul substanțelor anti-oxidante sunt verificate în funcție de variația pe parcursul maturării vinului. În cazul Cabernet Sauvignon, modificarea culorii a fost mai intensă decât în cazul Cabernet Sauvignon Roze.

În cazul probelor de roze pentru care s-a efectuat adaosul de precursori de glutation și tanin galic, de menționat sunt implicațiile asupra descreșterii petunidinei ($r=-0.60$), dar a prezentat o influență pozitivă asupra conținutului de flavone ($r=0.74$, $p<0.05$). Precursorii de glutation au structurat efecte direct proporționale și între delfidina și conținuturile de polifenoli totali ($r=0.60$) și respectiv flavone ($r=0.90$).

Analiza discriminant liniară a determinat diferențierea între vinurile roze și roșii în funcție de perioada de macerație (roșu comparativ cu roze) precum și includerea fermentației malolactice suplimentare la vinurile roze.

Monitorizarea evoluției din punct de vedere a modificărilor parametrilor caracteristici stărilor anti-oxidante

Efectul SO₂ asupra culorii vinului nu a fost considerat exhaustiv, cu excepția, în principal, a rolului său direct bine-cunoscut în decolorarea antocianilor. Astfel, scopul acestui studiu a fost de a evalua culoarea vinului în funcție de prezența SO₂ pe tot parcursul procesului de vinificație și pe durata maturării. În completarea analizelor CIELab, s-au realizat și măsurători spectrofotometrice ale intensității culorii (CI). Pentru aceste analize, toate probele au fost măsurate în triplicat.

Evaluarea evoluției tentelor de culoare globale ale vinurilor, s-a efectuat prin utilizarea software Cielab Color space, în care s-a efectuat introducerea de combinații de trei valori: L* pentru luminozitatea perceptuală și cromaticitatea a* și b* pentru cele patru culori unice ale viziunii umane: roșu, verde, albastru și galben.

S-au construit diagrame cluster Colordistance care oferă un instrument comparativ obiectiv pentru orice analiză a culorii. Fiecare diagramă de tip cluster a evidențiat diferențele de tonalitate între vinuri considerând prezența SO₂ dar și din punct de vedere a evoluției în perioada de monitorizare. Scorul privind diferențele de culoare (color distance score) s-a calculat și evaluat pentru fiecare tip de soi de vin.

Valorile diferite ale diferențelor de tonalitate sunt diferite pentru fiecare soi, fapt care este confirmat de testele de multi-varianță aplicate. O explicație poate fi determinată de posibile reacții de oxidare care pot produce schimbări ale culorii vinului alb către o nuanță mai închisă.

Evaluarea tendințelor de evoluție din punct de vedere a modificărilor capacității anti-radicalice.

Proprietățile antioxidante ale compușilor fenolici din vinuri sunt evaluate prin capacitatea de a inhiba radicalii organici stabili. Evaluarea se realizează pe capacitatea vinurilor sau a mediilor hidro-alcoolice care conțin compuși cu caracteristici antioxidante de a neutraliza radicali liberi.

Pentru fiecare diluție testată, s-a indicat cinetica reacției prin intermediul curbelor de reacție. Concentrația la platou s-a calculat pe baza unei funcții de tip model răspuns liniar – platou.

Analiza multifactorială, folosind ca indicatori de comparație tipul de vin - tratament (+SO₂ și -SO₂) și respectiv soi (CS, CSR, FR, FRF) a relevat faptul că la comparația între tratamente, doar în cazul probelor de Cabernet Sauvignon (CS) și respectiv Cabernet Sauvignon Roze (CSR) nu este diferență semnificativă între cele 2 tipuri de vin.

Din punct de vedere a capacității antioxidante, considerând nivelurile tuturor compușilor de tip fenolici, flavone și respectiv taninuri este de remarcat faptul că nivelele medii ale compușilor studiați grupate după criteriul +SO₂/-SO₂, au relevat inexistența unor diferențe semnificative considerând și perioada de monitorizare respectiv stabilitatea acestor compuși în diverse tipuri de vin.

Au existat diferențe semnificative între și în cadrul fiecărei varietăți, în funcție de tipul de vin, din punct de vedere a tratamentelor antioxidante. S-a constatat faptul că acestea au prezentat similarități la nivelul amestecurilor introduse, prin intermediul tipurilor de taninuri cu specificitate la tipul de vin (CS, CSR, FR sau FRF). Din punct de vedere a comparației dintre cele 2 tehnologii, coeficienții de corelație au fost similari și au prezentat variații comparative. S-a constatat că pentru IFC/ flavone, coeficienții de corelație au fost $r=0.80$ ($-SO_2$) și $r=0.88$ ($+SO_2$), o relație similară s-a produs pentru IFC/ taninuri ($r=0.95$) ($-SO_2$) care s-a menținut și pentru probele $+SO_2$ ($r=0.98$).

Prin urmare, putem concluziona că activitatea antioxidantă a vinurilor este mai mult legată de tipul de compuși fenolici individuali găsiți în vinuri decât de conținutul total de fenoli.

Efectul nivelelor de dioxid de sulf adăugat asupra caracteristicilor aromatice ale vinurilor din Podgoria Panciu

În studiu au fost utilizate o serie de alcooli, compuși carbonilici și esteri: acetaldehidă, metanol, butan-1-ol, butan-2-ol, propan-1-ol, 2-metil-propan-1-ol, 2-metil-pentan-2-ol, pentan-1-ol acetat de izoamil și lactat de etil.

Prezența în concentrații similare de acetaldehidă la probele cu și fără sulfiți a confirmat inexistența excesului de compuși carbonilici liberi, ceea ce nu a determinat inhibarea fermentației levuriene.

Pentru a explica evoluția pozitivă a acetaldehidei, s-a considerat auto-oxidarea alcoolului etilic care poate fi catalizată și de oxidarea acidului ascorbic la acid dehidroascorbic la vinurile care au fost tratate cu acid ascorbic.

Lactat de etil (ETL) a avut valori diferite de concentrație în raport cu soiurile incluse în studiu. Valorile mai mari în raport cu ceilalți esteri se explică prin faptul că vinurile fără SO_2 și vinurile roșii au suferit fermentație malolactică iar corecția de aciditate s-a realizat tocmai prin utilizare de acid lactic.

De remarcat este dezvoltarea metanolului care a crescut peste limitele tolerante la 130 mg/L, respectiv 5 mg/L și ar putea avea un impact ușor negativ asupra proprietăților olfactive .

Corelând toate aceste aspecte în analiza componentelor principale, s-au evidențiat mai multe grupe pe baza similarităților și a asemănărilor în ceea ce privește distribuția variabilelor implicate.

Descriptorii vizuali au urmărit variații care să evidențieze eventuale modificări ale aspectului ca urmare a unor procese de oxidare. Parametrii olfactivi au fost selectați pentru a defini tipicitatea senzorială și au fost clasificați pe categorii de tip arome primare, secundare și terțiare. Parametrii gustativi au urmărit evaluarea dulceaței, astringenței, amărăciunii, persistență precum și intensitatea aromelor corespunzătoare. Semnificația valorilor obținute pentru diferiți parametri senzoriali a fost testată cu ajutorul analizei ANOVA. Pentru tehnologia secundară s-a considerat

fermentația malolactică, vinificația vinurilor în sec și respectiv utilizare de taninuri cu caracter antioxidant.

În ceea ce privește evaluarea culorii, se poate observa că probele fără dioxid de sulf au prezentat valori mai mari tonalităților care anticipau modificări de culoare caracteristice proceselor de oxidare.

Probele de vin supuse sulfitării au prezentat note mai puternice pentru arome fructate în cazul tuturor tipurilor de varietăți cu sulfiți adăugați (Cabernet sauvignon roze), (Fetească regală) și respectiv (Fetească regală Frizzante). Cu toate că valorile notelor florale sunt mai scăzute, este de remarcat faptul că la valori medii nu reprezintă valori semnificativ statistice față de probele fără adaos de sulfiți. Rezultatele au indicat faptul că parametrii pentru probele tratate cu taninuri au prezentat evaluări ușor mai ridicate în raport cu probele la care s-a utilizat SO₂.

Evaluarea senzorială a indicat că momentul și metoda de inoculare a fermentației malolactice (MLB) au afectat semnificativ gustul și aroma vinurilor. Vinurile co-inoculate au fost observate să aibă niveluri mai ridicate pentru notele fructate, proaspete și florale decât vinurile care au folosit fermentația malolactică secvențială. Procesul spontan a fost perceput ca producând vinuri cu arome mai untate și amăruie.

ABSTRACT

Keywords: Fetească Regală, Cabernet Sauvignon, sulfur dioxide, amino acids, biogenic amines, anthocyanins, radical scavenging activity, volatile compounds

The purpose of the study "CONTRIBUTIONS TO THE DIVERSIFICATION OF WINE VARIETIES WITHOUT ADDED SULFITES FROM THE PANCIU VINEYARD" is the production, monitoring of evolution, and quality of Cabernet Sauvignon and Fetească regală wines without added sulfur dioxide, vinified in various technological variants specific to the type of wine produced. In this context, the adaptation of four technological variants covering the most important categories from the perspective of interest and technological and scientific updates in the field of viticulture and oenology was pursued.

The key points of the study are focused on the main stages of winemaking adapted to the substitution of sulfur dioxide by using non-*Saccharomyces* species such as *Pichia Kluyveri* in the initial stage of grape treatment, as well as perfecting antioxidant protection methods with the use of oenological products that have proven to be as effective in protection as SO₂.

Monitoring was carried out in a longitudinal study with transversal stages where complementary data were collected from different samples (transversal), and then the results were followed over time (longitudinal). Finally, representative samples were subjected to quality and performance evaluations.

Optimizing winemaking procedures

It is essential to note that for sulfite-free wines, the treatment of grapes against oxidation consisted of using *Pichia kluyveri*, while for wines with sulfur dioxide, the treatment consisted of using potassium metabisulfite, ascorbic acid, and gallic tannin.

An important stage was antioxidant protection and preservation. Antioxidant protection was carried out in two different steps. For wines with added sulfur dioxide, after the completion of fermentation, antioxidant protection was mainly achieved with the addition of ascorbic acid at doses of 20 mg/L and free sulfur dioxide solutions equivalent to 40 mg/L free SO₂. All wines required acidity adjustments with lactic acid at doses equivalent to 6.1-6.3 g tartaric acid/L.

Other stages applied in winemaking methods were tartaric stabilization using carboxymethylcellulose, arabic gum, or potassium polyaspartate, and clarification was performed using bentonite, colloidal silica, or fish glue, with doses according to quality technical specifications, but optimized for each type of wine.

The correlation between determined amino acids and biogenic amines under conditions of additional malolactic fermentation aimed to evaluate the specific biogenic amines in wines in relation to the corresponding amino acids by determining direct correlations during the wine maturation period.

Red wines (Cabernet Sauvignon) had significantly higher levels of biogenic amines at 49.54 mg/L (523 μ mol/L) in total content, followed by rosé wines Cabernet Sauvignon Rosé (452 μ mol/L), Fetească Regală (386.5 μ mol/L), and finally Fetească Regală frizzante (302.3 μ mol/L).

Decarboxylation is the main source of biogenic amine production under the activity of decarboxylase enzymes. Glutamine and arginine are involved in the production of putrescine and spermidine through decarboxylation/ deamination mechanisms.

Clarifying agents used, such as bentonite and gelatin, affected the amino acid levels in wine to different extents. Chelation with components of the clarifying agents was confirmed, showing significant variations in comparative values between raw and conditioned wines.

As a conclusion of the study, an explanation of the correlations is that pH influences decarboxylase enzymes through catalytic activation. The pH levels of the wines ranging between 3.0 and 4.0 were not favorable.

From previous data, the absence of SO₂ did not influence the differential stability of the samples, so a classification of the distribution from the perspective of malolactic and alcoholic fermentation was performed using principal component analysis (PCA).

Evaluation of anthocyanin levels in the context of wines vinified using methods that do not involve the use of SO₂.

The objective of this study is to evaluate the chemical substances and sensory impact of two commercial non-Saccharomyces yeast products used for bio protection.

The pH was important for the stability of the wines and was maintained between 3.1 and 3.3 throughout the winemaking process. During the monitoring period, a change in pH occurred due to the variation in organic acids, likely caused by the precipitation of tartaric acid, considered unstable.

The impact of antioxidant substances was verified according to variations during the maturation of the wine. In the case of Cabernet Sauvignon, color change was more intense than in Cabernet Sauvignon Rosé.

For the rosé samples with added glutathione precursors and gallic tannin, notable implications include the decrease in petunidine ($r=-0.60$), but there was a positive influence on the flavone content ($r=0.74$, $p<0.05$). Glutathione precursors had directly proportional effects between delphinine and total polyphenol content ($r=0.60$) and flavones ($r=0.90$).

Linear discriminant analysis determined the differentiation between rosé and red wines based on the maceration period (red versus rosé) and the inclusion of additional malolactic fermentation in rosé wines.

Monitoring the evolution of changes in antioxidant state parameters

The effect of SO₂ on wine color was not considered exhaustive, mainly focusing on its well-known role in anthocyanin discoloration. Thus, the aim of this study was to evaluate the wine color based on the presence of SO₂ throughout the winemaking process and during maturation. In addition to CIELab analyses, spectrophotometric measurements of color intensity (CI) were also conducted. All samples were measured in triplicate for these analyses.

The evaluation of the overall color hues of the wines was performed using CIELab Color Space software, which incorporates combinations of three values: L* for perceptual lightness and chromaticity a* and b* for the four unique human vision colors: red, green, blue, and yellow.

Cluster diagrams created with Color distance software provided an objective comparative tool for color analysis. Each cluster diagram highlighted the hue differences between wines considering the presence of SO₂ and the evolution during the monitoring period. The color distance score was calculated and evaluated for each type of wine.

Different hue difference values were observed for each variety, confirmed by multivariate tests. Possible oxidation reactions might explain color changes in white wines towards a darker shade.

Evaluation of antioxidant capacity evolution trends

The antioxidant properties of phenolic compounds in wines are evaluated by their capacity to inhibit stable organic radicals. This assessment is based on the wine's or hydro alcoholic solutions ability to neutralize free radicals.

For each dilution tested, the reaction kinetics were indicated through reaction curves. The plateau concentration was calculated based on a linear response-plateau model function.

Multifactorial analysis using wine type - treatment (+SO₂ and -SO₂) and variety (CS, CSR, FR, FRF) as comparison indicators revealed that, for Cabernet Sauvignon (CS) and Cabernet Sauvignon Rosé (CSR) samples, there was no significant difference between the two types of wine treatments.

Regarding antioxidant capacity, considering levels of phenolic compounds, flavones, and tannins, the mean levels of the studied compounds grouped by +SO₂/-SO₂ criteria revealed no significant differences, even when considering the monitoring period and stability of these compounds in various wine types.

There were significant differences within each variety depending on the type of wine and antioxidant treatments. These treatments showed similarities in the mixtures introduced, through tannins specific to each wine type (CS, CSR, FR, or FRF). Correlation coefficients were similar between the two technologies, with comparable variations. For IFC/flavones, correlation coefficients were $r=0.80$ (-SO₂) and $r=0.88$ (+SO₂). A similar relationship occurred for IFC/tannins ($r=0.95$) (-SO₂), which was maintained for +SO₂ samples ($r=0.98$).

Thus, we can conclude that the antioxidant activity of wines is more related to the type of individual phenolic compounds found in wines rather than the total phenol content.

Effect of added sulfur dioxide levels on the aromatic characteristics of Panciu vineyard wines

The study utilized various alcohols, carbonyl compounds, and esters: acetaldehyde, methanol, butan-1-ol, butan-2-ol, propan-1-ol, 2-methyl-propan-1-ol, 2-methyl-pentan-2-ol, pentan-1-ol, isoamyl acetate, and ethyl lactate.

The presence of similar concentrations of acetaldehyde in both sulfite-treated and sulfite-free samples confirmed the absence of excess free carbonyl compounds, which did not inhibit yeast fermentation.

To explain the positive evolution of acetaldehyde, the self-oxidation of ethyl alcohol, which can be catalyzed by the oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid in wines treated with ascorbic acid, was considered.

Ethyl lactate (ETL) had varying concentration values depending on the included varieties. Higher values compared to other esters can be explained by malolactic fermentation in sulfite-free and red wines, with acidity correction achieved using lactic acid.

Notably, methanol development exceeded tolerance limits to 130 mg/L and 5 mg/L, respectively, potentially having a slightly negative impact on olfactory properties.

By correlating these aspects in principal component analysis, multiple groups were highlighted based on similarities in the distribution of involved variables.

Visual descriptors tracked variations indicating potential changes in appearance due to oxidation processes. Olfactory parameters were selected to define sensory typicity, classified into primary, secondary, and tertiary aroma categories. Gustatory parameters evaluated sweetness, astringency, bitterness, persistence, and corresponding aroma intensity. The significance of values obtained for different sensory parameters was tested using ANOVA analysis. Secondary technology considered malolactic fermentation, dry winemaking, and the use of tannins with antioxidant characteristics.

In color evaluation, it was observed that sulfite-free samples had higher hue values anticipating color changes characteristic of oxidation processes.

Sulfite-treated wine samples had stronger fruit notes across all varieties with added sulfites (Cabernet Sauvignon rosé), (Fetească regală), and (Fetească regală Frizzante). Although floral note values were lower, they were not statistically significant compared to sulfite-free samples. Results indicated that tannin-treated samples had slightly higher evaluations than SO₂-treated samples.

Sensory evaluation indicated that the timing and method of malolactic fermentation inoculation (MLB) significantly affected the taste and aroma of wines.

Co-inoculated wines had higher levels of fruity, fresh, and floral notes than wines using sequential malolactic fermentation. The spontaneous process was perceived as producing wines with more buttery and bitter aromas.

PARTEA I – STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII
PART I - PRESENT STATE OF RESEARCH

1 ROLUL DIOXIDULUI DE SULF ÎN VINIFICAȚIE

1. THE ROLE OF SULFUR DIOXIDE IN VINIFICATION

1.1 Context

Dioxidul de sulf (SO₂) este cel mai utilizat aditiv în vinificație deoarece prezintă proprietăți antifungice, permite inhibarea micro-organismelor nedorite, previne oxidarea și inhibarea enzimatică, elimină reacțiile de brunificare non-enzimatică și contribuie la calitatea vinului. Cu toate aceste avantaje, s-au constatat mai multe efecte cu impact asupra sănătății umane, astfel că au fost investigate și efectele negative posibile ale produselor care prezintă diverse cantități de SO₂ adăugat. În acest context, excesul de SO₂ s-a constatat că produce efecte negative asupra calității vieții, dar și schimbări organoleptice în produsele finale. Utilizarea generală a dioxidului de sulf (SO₂) datează de la sfârșitul secolului al XVIII-lea. Proprietățile sale multiple conferă un rol indispensabil în vinificație. Trebuie luat în considerare și faptul că levurile produc cantități mici de SO₂ în timpul fermentației. În general, cantitatea formată este rar mai mult de 10 mg/L, dar în anumite cazuri poate depăși 30 mg/L. Prin urmare, absența totală a dioxidului de sulf în vin este rară, chiar în absența sulfitării (Irwin ș.a., 1993).

Proprietățile principale ale SO₂ sunt următoarele:

Antiseptic: inhibă dezvoltarea microorganismelor. Are o activitate mai mare asupra bacteriilor decât asupra levurilor. La concentrații scăzute, inhibarea este tranzitorie. Concentrațiile mari distrug un procentaj din populația microbială. Eficacitatea unei anumite concentrații de dioxid de sulf este crescută prin reducerea populației microbiologice inițiale sau prin filtrare sterilă în prealabil. În timpul depozitării, SO₂ împiedică dezvoltarea tuturor tipurilor de microorganisme (levuri, bacterii lactice și, într-o mai mică măsură, bacterii acetice), prevenind fermentația secundară a vinurilor albe dulci, contaminarea cu *Brettanomyces*, formarea ulterioară a etil-fenolilor sau dezvoltarea levurilor mico-dermice (și diferite tipuri de deteriorare bacteriană).

Antioxidant: în prezența catalizatorilor, se leagă de oxigenul dizolvat conform următoarei reacții:



Această reacție este lentă. Protejează vinurile de oxidările chimice, dar nu are efect asupra oxidărilor enzimatică, reacții care sunt foarte rapide. SO₂ protejează vinul de o oxidare excesiv de intensă a compușilor săi fenolici și a unor elemente ale aromei sale. Previne maderizarea și contribuie și la stabilirea unui potențial redox suficient de scăzut, favorizând evoluția nedorită aromei și gustului vinului în timpul depozitării și maturării.

Antioxidazic: inhibă instantaneu funcționarea enzimelor de oxidare (tirozinază, lacază) și poate asigura distrugerea lor în timp. Prin acest mecanism, înainte de fermentație, SO₂ poate proteja musturile de oxidare. De asemenea, ajută și la evitarea casării oxidative la vinurile albe și roșii obținute din struguri putreziți. Legând aldehida acetică și alte produse similare, protejează aromele vinului și face să dispară caracterul plat.

Adăugarea SO₂ la vin ridică mai multe probleme. Dozele excesive trebuie evitate, mai ales din motive de sănătate, dar și din cauza impactului lor asupra aromei. Dozele mari neutralizează aroma, în timp ce cantități și mai mari produc defecte caracteristice de aromă, adică un miros de lână umedă care devine rapid sufocant și iritant, împreună cu o senzație de arsură la post gust. Cu toate acestea, o concentrație insuficientă nu asigură stabilitatea totală a vinului, în acest fel oxidarea excesivă sau dezvoltarea microbiană pot compromite calitatea acestuia (Divol ș.a., 2012).

Concentrația dioxidului de sulf în vin este exprimată în mod obișnuit în mg SO₂ pe litru (sau ppm), deși această substanță există în multiple forme în vin.

Dioxidul de sulf, anhidrida sulfurică sau gazul sulfuric pot fi folosite la fel de bine sau poate fi folosit chiar și acidul sulfuric. Expresia „sulf”, totuși, este fundamental incorectă. Adăvirile de SO₂ făcute la vin sunt întotdeauna exprimate în formă anhidră, în mg/L sau în g/hL, indiferent de forma efectiv utilizată - gaz sau soluție lichidă de dioxid de sulf, bisulfid de potasiu (KHSO₃) sau metabisulfid de potasiu (K₂S₂O₅). Efectul adăvirii la vin este același, indiferent de forma utilizată. Echilibrul stabilit între diferitele forme este identic. Depinde de pH și prezența moleculelor care se leagă cu dioxidul de sulf.

Progrese semnificative în înțelegerea SO₂ și a proprietăților sale au permis producătorilor de vin să-și justifice utilizarea acestuia în vin. Ca urmare, concentrațiile de SO₂ utilizate în vin au scăzut considerabil.

În practică, concentrația utilizată este chiar mai mică. Pentru vinurile albe (cu excepția vinurilor speciale), concentrația medie este de 105 mg/L; pentru vinurile roșii este de 75 mg/L. Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV) recomandă valori ușor mai mari decât cele susținute de UE în țările sale membre. În anumite țări, reglementarea SO₂ dictează o limită comună pentru toate vinurile. De exemplu, această valoare este de 350 mg/L în SUA, Canada, Japonia și Australia.

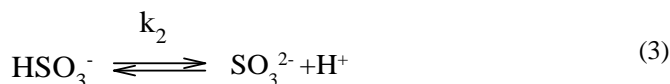
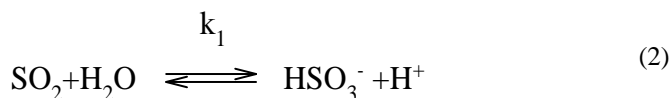
Datorită echilibrului fluctuant între formele libere și legate ale SO₂, în general, legislația diferitelor țări se referă exclusiv la concentrația totală de dioxid de sulf. Anumite țări au însă reglementări pentru fracțiunea liberă.

Astăzi, mai ales din motive de sănătate, se caută posibilitatea reducerii autorizate a concentrațiilor în diferite tipuri de vinuri. O astfel de abordare constă în optimizarea condițiilor și perfecționarea metodelor de utilizare a acestui produs. Pot fi luate în considerare și produse substituibile. Datorită efectelor variate ale dioxidului de sulf în vin, existența unei alte substanțe care să îndeplinească aceleași roluri fără

dezavantaje pare foarte puțin probabilă, dar existența adjuvanților care completează efectul SO₂ în cazul unora dintre proprietățile sale este perfect concepiabilă. Cercetarea enologică a fost întotdeauna preocupată de căutarea unui astfel de produs sau proces de substituție.

1.2 Chimia dioxidului de sulf

În timpul solubilizării SO₂, echilibrul este conform următoarei reacții:



Acidul sulfuros nu există într-o soluție. Cu toate acestea, deține două funcții acide ale căror pK-uri sunt 1.81 și 6.91, la 20°C. Neutralizarea unui acid începe la aproximativ pH = pK - 2. Absența sulfiților neutri (SO₃²⁻) la pH-ul vinului poate fi dedusă. Dar prima funcție este parțial neutralizată în funcție de pH. Cunoașterea proporției de acid liber (SO₂ activ) și bisulfid (HSO₃⁻) este importantă, deoarece proprietățile enologice esențiale sunt atribuite primei funcții. Calculul se face prin aplicarea legii acțiunii de masă:

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HSO}_3^-]}{[\text{SO}_2][\text{H}_2\text{O}]} = K_1 \quad (4)$$

Concentrațiile în apă pot fi tratate ca și constante sau cu valori apropiate de 1.

$$\frac{[\text{H}^+][\text{HSO}_3^-]}{[\text{SO}_2]} = K_1 \quad (5)$$

Care rezultă în:

$$\log \frac{[\text{HSO}_3^-]}{[\text{SO}_2]} = \text{pH} - \text{p}K_1 \quad (6)$$

Tabelul 1.1 indică rezultatele în domeniile de pH corespunzătoare la diverse tipuri de vinuri. Proporția în SO₂ molecular, care corespunde la SO₂ activ, variază de la 1 la 10. Acest lucru explică nevoia pentru sulfitare suplimentară atunci când valorile de pH sunt ridicate.

Valoarea pK este influențată și de temperatura și de puterea alcoolică (tabel 1.2), precum și de forța ionică - concentrația în săruri. Usseglio-Tomasset (1995) a calculat efectul acestor factori asupra proporției de dioxid de sulf sub formă de SO₂ activ

Ionul bisulfid (HSO₃⁻) reprezintă fracțiunea corespunzătoare a acidului neutralizat de baze, astfel încât aproape în întregime este sub formă de săruri ionizate.

Ca urmare, proprietățile antiseptice ale unei anumite concentrații de SO₂ liber față de levuri sau bacterii variază în funcție de pH. În același mod, gustul și mirosul

neplăcut al dioxidului de sulf, pentru aceeași valoare a SO₂ liber, cresc cu cât vinul este mai acid.

<i>pH</i>	<i>Proporții SO₂ molecular (%)</i>	<i>Proporții bisulfid (HSO₃⁻) (%)</i>
3	6.06	94.94
3.1	4.88	95.12
3.2	3.91	96.09
3.3	3.13	96.87
3.4	2.51	97.49
3.5	2.00	98.00
3.6	1.60	98.40
3.7	1.27	98.73
3.8	1.01	98.99
3.9	0.81	99.19
4.0	0.64	99.36

Tabel 1.1 Proporțiile dintre conținutul de SO₂ liber și bisulfid HSO₃⁻ la diverse valori de pH.
Table 1.1 Proportions of free SO₂ and bisulphite HSO₃⁻ contents at various pH values.

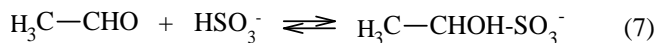
<i>Etanol</i>	<i>Temperatură (°C)</i>							
<i>% alcool</i>	19	22	25	28	31	34	37	40
0	1.78	1.85	2	2.14	2.25	2.31	2.37	2.48
5	1.88	1.96	2.11	2.24	2.34	2.4	2.47	2.56
10	1.98	2.06	2.21	2.34	2.44	2.5	2.57	2.66
15	2.08	2.16	2.31	2.45	2.54	2.61	2.67	2.76
20	2.18	2.26	2.41	2.55	2.64	2.72	2.78	2.86

Tabel 1.2. Valori pentru constanta pK₁ pentru SO₂ în funcție de tăria alcoolică și temperatură.
Table 1.2. Values for the pK₁ constant for SO₂ as a function of alcohol strength and temperature.

Mirosul neplăcut al SO₂ este uneori mai puțin rezultatul unei adii exagerate ci este mai mult dependent și de natura vinului - calitate inferioară, absența caracterului și aromei și aciditate foarte mare.

1.3 Moleculele care leagă dioxidul de sulf

1.3.1 Acetaldehida



Reacția este generală pentru cea mai mare proporție în dioxidul de sulf în vin. Constanta de echilibru este foarte mică $0,0024 \times 10^{-3}$ și corespunde unei rate de combinare mai mare de 99%. Concentrațiile de acetaldehidă sunt între 30 și 130 mg/L și corespunde unei valori a SO₂ între 44 și 190 mg/L.

În vinurile care nu mai conțin SO₂ liber, o disociere slabă a acidului aldehidic sulfuros eliberează acetaldehidă în urme. Acetaldehida este considerată responsabilă pentru caracterul plat al vinului, dar prezența este considerată imposibilă în vinul care conține SO₂ liber.

La pH 3.3, 98% din aceasta este combinată în 90 de minute și combinația este totală în 5 ore. În limitele normale, combinația este independentă de temperatură.

Cantitatea de SO₂ liber eliberată prin creșterea temperaturii este foarte mică. Concentrațiile în musturile botirizate sunt de ordinul a 10 mg/L, până la un maxim de 20 mg/L. Aceste concentrații pot explica o combinație medie de sub 10 mg/l SO₂ (Barbe ș.a., 2000).

Fermentația alcoolică este principala sursă de acetaldehidă în vin. Este un produs intermediar în formarea etanolului din zaharuri. Acumularea sa este legată de intensitatea fermentației glicero-piruvice. Depinde în principal de nivelul de aerare, dar cele mai mari valori se obțin atunci când activitatea levurilor are loc în prezența SO₂ liber. Formarea acidului aldehydic sulfuros este un mijloc de protecție pentru levuri împotriva acestui antiseptic. Prin urmare, nivelul de sulfitare a strugurilor controlează concentrația de acetaldehidă legată de SO₂.

Având în vedere aceste fenomene, adăugarea de SO₂ la un must fermentat ar trebui evitată. Ar fi imediat combinat fără a fi eficient. Când strugurii sunt botritizați, la adăugarea unei concentrații de 50 mg/L SO₂ s-a constatat un grad de combinare cu până la 40 mg/L mai mare decât în cazul vinurilor martor nesulfitate.

1.3.2 Acizi cetonici

Acidul piruvic și acidul 2-oxoglutaric (anterior acid α -cetoglutaric) sunt în general prezenți în vin. Acestea sunt produse secundare ale fermentației alcoolice. Având în vedere valoarea lor mică a constantei de aciditate, acestea pot juca un rol important în rata de combinare SO₂. De exemplu, un vin care conține 200 mg/L de acid piruvic și 100 mg/L acid 2-oxoglutaric are o concentrație de 93 mg/L SO₂ legată de acești acizi pentru fiecare 20 mg de SO₂ liber. Cele două substanțe se pot combina cu cantități foarte diferite de SO₂. În vinurile făcute din struguri botirizați, pentru un conținut liber de SO₂ de 50 mg/L, este probabil ca acidul 2-oxoglutaric să se combine cu o medie de 43 mg/L și acidul piruvic cu 58 mg/L (Barbe ș.a., 2000). Procentajele medii ale acizilor piruvic și 2-oxoglutaric în echilibrul de combinare SO₂ sunt de 20.7% și 16.7%.

Prin urmare, este interesant să se înțeleagă condițiile de formare și acumulare a acestor acizi în timpul fermentației alcoolice. Acestea se formează la începutul procesului fermentativ. După ce cresc inițial, concentrația lor scade spre sfârșitul fermentației. Acest lucru explică concentrația mai mare a acestor molecule în vinurile dulci față de cele seci. Temperaturile ridicate și pH-urile, împreună cu aerarea, favorizează sinteza și acumularea acizilor cetonici. În numeroase fermentații, tiamina (la o concentrație de 0.5 mg/L) a fost arătat că reduce concentrația acestor acizi și implicit combinațiile cu dioxidul de sulf. Efectul tiaminei nu este surprinzător. Este un element esențial al carboxilazei care asigură decarboxilarea acidului piruvic în acetaldehidă. Acesta este un pas esențial al fermentației alcoolice. Acumularea acizilor cetonici pare să rezulte dintr-o deficiență de tiamină. Pentru a fi eficientă, tiamina trebuie adăugată la must clarificat și sulfitat suficient de devreme și nu

prezintă efecte asupra acumulării acetaldehidei. În anumite cazuri, efecte secundare utile sunt observate: activarea fermentației și diminuarea acidității volatile. Considerând mediile, în 80% din cazuri, tiamina crește fracția liberă de SO₂ în vinurile dulci cu un conținut de 20 mg, pentru aceeași fracție de SO₂ legat (Jackowetz, 2013).

1.3.3 Zaharuri și derivați

Având în vedere existența funcțiilor aldehydice și cetonice în diferite molecule de zahăr, se poate aștepta ca acestea să aibă o putere de combinare cu dioxidul de sulf. Fructoza și zaharoza, cu toate acestea, nu reacționează practic. Arabinoza se leagă de SO₂ la o rată de aproximativ 8 mg de SO₂ pe gram de arabinoză pentru 50 mg de SO₂ liber pe litru. Deoarece concentrația de arabinoză din vin este scăzută (mai puțin de 1 g/L), această combinație nu este luată în considerare în general. Glucoza are o putere de combinare mult mai mică. Un gram se combină cu 0.3 mg de SO₂ pentru 50 mg de SO₂ liber pe litru. Datorită concentrației ridicate de glucoză din musturi și vinuri dulci, această combinație ar trebui luată în considerare și inclusă în interpretarea scăderii SO₂ liber după sulfitarea strugurilor sau a mustului. Ribereau-Gayon ș.a., 2006 au identificat următoarele substanțe: ceto-5-fructoză (5-oxofructoză), xilosonă, ceto-2-gluconic (2-oxogluconic) și acidul diceto-2,5-gluconic (2,5-dioxogluconic). Datorită concentrațiilor lor în unele vinuri (capabile să atingă câteva zeci de miligrame pe litru) și valorilor lor ale constantelor de aciditate, unele dintre ele pot juca un rol semnificativ în legarea cu dioxidul de sulf. Aceste substanțe există natural în strugurii sănătoși și copti dar sunt formate în cantități mari și de *Botrytis cinerea* și bacteriile acide acetice (*Acetobacter* și *Pseudomonas*).

Conform unor descoperiri mai recente (Barbe ș.a., 2002), printre toți compușii menționați anterior, acidul 2-oxo și acidul 2,5-dixogluconic sunt întotdeauna prezenți într-un raport de 2.5 la litru și nu au o afinitate semnificativă pentru SO₂. În schimb, la pH-ul musturilor și vinurilor botirizate, acidul gluconic (20 g/L) este în echilibru cu două lactone, γ - și δ -gluconolactonă, reprezentând aproximativ 10% din concentrația acidului. Afinitatea corespunde celei a unui compus mono carbonilic cu o constantă de disociere a combinației bisulfat $K = 4.22$ mM. Astfel, lactonele acidului gluconic sunt susceptibile să se combine cu până la 135 mg/L SO₂ pentru un conținut de SO₂ liber de 50 mg/L.

Conținutul de 5-oxofructoză este și el frecvent de ordinul a 100 mg/L în vinurile obținute din struguri botirizați (Barbe ș.a., 2002). Concentrațiile cresc odată cu puterea de combinare. 5-oxofructoza poate explica combinarea a 4 până la 78% din dioxidul de sulf. Concentrațiile acestui compus nu sunt alterate de fermentația alcoolică sau orice alt aspect al metabolismului levurilor. Concentrațiile excesive pot fi evitate doar prin monitorizarea calității strugurilor. În cazul special al mustului

obținut din struguri afectați de putrezire în stadiul matur aceasta contribuie, în medie, cu peste 60% la echilibrul de combinare.

1.3.4 Molecule cu grup dicarbonilic

În strugurii afectați de putrezire, s-au identificat molecule cu două grupuri carbonil. Acestea sunt probabil formate în timpul dezvoltării *Botrytis cinerea* și a altor microorganismе implicate în diferite tipuri de putrezire. Având în vedere faptul că concentrațiile nu depășesc 3 mg/L, contribuția glicoxalului la echilibrul de combinare SO₂ este practic neglijabilă. (Barbe ș.a., 2002). Concentrațiile de glicoxal și, în special, metilglioxal scad în timpul fermentației alcoolice, astfel încât acești doi compuși α-dicarbonilici sunt responsabili doar pentru cantități neglijabile de SO₂ combinat în vin.

1.3.5 Alte combinații

Au fost identificate alte substanțe susceptibile să fixeze cantități mici de dioxid de sulf: acidul glucuronic, acidul galacturonic și xilosona, acidul glicoxic, acidul oxaloacetic, alhida glicolică, acetoină, diacetil, 5-(hidroximetil)furfural etc. Contribuția lor individuală este neglijabilă. În cazul dihidroxiacetonei, concentrația de 100 mg/L reprezintă combinarea a aproximativ 16 mg/L pentru 50 mg/L SO₂ liber, deși această valoare poate fi de până la 72 mg/L în anumite tipuri de must. În timp ce gliceraldehida are o afinitate mai mare pentru SO₂ (K = 0,4 mM) (Vivas, 1995) este prezentă doar în cantități mici, astfel încât contribuția sa la echilibrul de combinare SO₂ este neglijabilă.

SO₂ se poate lega și cu compuși fenolici. În cazul taninilor proantocianici, o soluție de 1 g/L se leagă cu 20 mg/L SO₂. Combinările sunt semnificative cu antocianii. Aceste reacții sunt direct vizibile prin decolorarea produsă. Combinarea este reversibilă; culoarea reapare atunci când dioxidul de sulf liber dispare. Această reacție este legată de temperatură și aciditate, care afectează cantitatea de SO₂ liber.

1.4 Proprietățile anti-microbiene ale dioxidului de sulf

Cele mai importante proprietăți enologice ale dioxidului de sulf sunt caracterul antiseptic și un puternic agent de reducere care protejează împotriva oxidării. Proprietățile enologice ale dioxidului de sulf pot face ca acesta să pară indispensabil în vinificație.

1.4.1 Activitățile antifungice

Acțiunea antiseptică a SO₂ față de levuri poate apărea în diferite moduri. Pe de o parte, poate fi utilizat pentru a opri fermentarea vinurilor dulci. Distruge eficient populația existentă (acțiune fungicidă). Pe de altă parte, protejează aceleași vinuri dulci de posibile refermentări - evaluate prin creșterea unei mici populații reziduale. Inhibă eficient multiplicarea celulară (activitate fungistatică). Sulfitearea moderată

este cunoscută și pentru a inhiba temporar creșterea levurilor fără distrugerea lor totală. Dispariția ulterioară a SO₂ liber permite reactivarea activității levurilor.

Dioxidul de sulf legat nu are o acțiune antiseptică asupra levurilor. Levurile folosesc formarea acestei combinații pentru a inactiva SO₂. HSO₃⁻ posedă de asemenea o activitate antiseptică scăzută, dar nedeterminată. Tabelul 1.3 indică concentrațiile de SO₂ liber, titrabil prin iod, care trebuie adăugate vinurilor (în funcție de pH-ul lor) pentru a avea o activitate antiseptică egală cu 2 mg/L SO₂ molecular. Activitatea antiseptică a formei bisulfid HSO₃⁻ este mai mult sau mai puțin semnificativă, în funcție de diferitele ipoteze luate în considerare. Conform experienței obținute în stabilitatea vinului, HSO₃⁻ pare să fie de 20 de ori mai puțin activ decât SO₂, în special în vinurile care conțin zaharuri reduse.

Dioxidul de sulf este fungistatic la pH-uri ridicate și la concentrații scăzute și este un fungicid la pH-uri scăzute și concentrații ridicate. Forma HSO₃⁻ este exclusiv fungistatică. Fiecare tulpină de drojdie are probabil o sensibilitate specifică la diferitele forme ale dioxidului de sulf. Romano și Suzzi (1992) au considerat mecanisme posibile care ar putea explica aceste diferențe. Conform aceluiași autori sulfitația trebuie făcută înainte de fermentare pentru a crește rezistența levurilor la SO₂. Levurile din mustul nesulfitat, izolate după fermentare, sunt mai sensibile la SO₂ decât cele provenind din același must care este sulfitat înainte de fermentare.

<i>pH</i> vin	<i>Activitate H-SO₃⁻</i>			
	Fără diferență semnificativă	De 100 de ori mai scăzută decât SO ₂	De 20 de ori mai scăzută decât SO ₂	De 10 de ori mai scăzută decât SO ₂
2.8	22	20	14	11
3.0	34	29	19	14
3.2	54	43	24	16
3.4	87	61	28	18
3.6	134	81	31	19
3.8	200	100	33	20

Tabel 1.3. Concentrații ale SO₂ liber necesare în vinuri pentru a menține activitatea antiseptică egală cu 2 mg/L SO₂ activ.

Table 1.3. Concentrations of free SO₂ required in wines to maintain antiseptic activity equal to 2 mg/L active SO₂.

În ceea ce privește vinificarea vinurilor dulci (activitate fungicidă), fermentația pare să se oprească brusc după adăugarea a 100 mg/L de SO₂. Concentrația de zahăr rămâne constantă, cu toate că dioxidul de carbon continuă să fie eliberat timp de aproximativ o oră. În acest timp, levurile nu par să fie afectate de sulfitație - ele sunt încă capabile să se multiplice, indiferent de concentrația utilizată. Este necesar să se aștepte cel puțin 5 ore și mai des 24 ore pentru a observa o scădere a viabilității celulare.

Pentru a asigura o oprire completă a fermentației, Ough (1988) a estimat că trebuie adăugați 1.50 mg/L SO₂ molecular. După eliminarea levurilor prin diferite tratamente, conform aceluiași autori, 1.20 mg/L SO₂ molecular este suficient pentru

a asigura maturarea corespunzătoare a vinurilor care conțin zaharuri reziduale (activitate fungistatică). Concentrații mai mici ar putea fi recomandate pentru vinurile depozitate la temperaturi scăzute cu o populație mică de levuri.

Unii autori (Divol ș.a., 2012) au rezumat mecanismul de acțiune a SO₂ asupra levurilor. SO₂ molecular pătrunde în celulă prin transport activ sau difuzie simplă. Considerând pH-ul intracelular, SO₂ trebuie să existe în celulă sub formă de HSO₃⁻. Odată ajuns în interiorul celulei, reacționează cu numeroși constituenți precum coenzimele (NAD, FAD, FMN), co-factorii și vitaminele (tiamina). Ar avea de asemenea un efect asupra numeroaselor sisteme enzimatice și asupra acizilor nucleici. În cele din urmă, i se atribuie și o scădere semnificativă a ATP-ului.

1.4.2 Activități antibacteriene ale dioxidului de sulf

Activitatea SO₂ liber asupra bacteriilor lactice este bine cunoscută. Este chiar mai influențată de pH decât activitatea față de levuri. Totuși, fracțiunea combinată cu etanal sau acid piruvic are și ea o activitate antibacteriană. Molecula combinată SO₂ are o acțiune directă asupra bacteriilor.

Mecanismul nu este explicat prin descompunerea combinației de către bacterii, ceea ce duce la eliberarea SO₂ liber. Dioxidul de sulf combinat cu acetaldehida (sau acid piruvic) pare să posede o activitate antibacteriană cu 5-10 ori mai slabă decât SO₂ liber, dar poate fi de 5-10 ori mai abundent. Un număr mare de bacterii sunt eliminate datorită unei concentrații de 5 mg/L SO₂ liber. Aceeași concentrație în formă combinată reduce populația cu 50%. *Oenococcus oeni* dar este mai puțin rezistent la *Lactobacillus* și *Pediococcus*.

Aceste observații au dus la aplicații tehnice semnificative pentru controlul fermentației malolactice și stocarea vinurilor. Sulfitarea strugurilor nu acționează doar rapid asupra bacteriilor în perioada pre-fermentativă; acționează prin eliberarea unei anumite concentrații de dioxid de sulf combinat care protejează și încetinește creșterea bacteriană până la finalizarea fermentației alcoolice. Astfel, mediul care conține încă zahăr este protejat de dezvoltarea bacteriană prematură care ar putea duce la producerea de aciditate volatilă.

Când fermentația malolactică nu este considerată (în vinurile albe seci, de exemplu), trebuie remarcat faptul că stabilitatea vinului nu se datorează numai acțiunii bactericide a SO₂ liber, ci mai degrabă concentrației de SO₂ combinat pe care vinul o conservă după fermentație; acțiunea sa este de durată în timpul maturării. În anumite tipuri de vin cu un pH prea scăzut, concentrațiile de SO₂ combinate de 80-120 mg/L pot face fermentația malolactică imposibilă.

Dioxidul de sulf este activ și asupra bacteriilor de acid acetic, dar sunt necesare studii suplimentare cu privire la acest subiect. Aceste bacterii rezistă la concentrații relativ ridicate. Bacteriile acetice sunt prevenite cel mai eficient prin

evitarea contactului cu oxigenul din aer și controlarea temperaturii în crămă (Valera ș.a., 2017).

1.4.3 Activitatea antioxidantă a dioxidului de sulf

Consumul chimic de oxigen de către SO₂ este lent și corespunde următoarei reacții:



Într-un mediu sintetic, s-a demonstrat că SO₂ ia câteva zile pentru a consuma 8.0-8.6 mg de oxigen pe litru (această cantitate corespunde saturării acestui mediu). O astfel de oxidare necesită prezența catalizatorilor, în special a ionilor de fier și cupru. Cu toate acestea, musturile sunt foarte oxidabile și ar trebui protejate rapid și eficient împotriva oxidării. Sulfitarea realizează acest lucru. Dioxidul de sulf, cu toate acestea, acționează prin efectul său antioxidant, adică prin combinarea cu oxigenul care este disponibil pentru oxidarea constituenților mustului.

Experimental s-a constatat în saturarea unui must alb de struguri cu oxigen și măsurarea ratei de epuizare a oxigenului electrochimic. În absența sulfitării, epuizarea acestui oxigen este foarte rapidă și se realizează în câteva minute (între 4 și 20 în medie). Acest fenomen demonstrează oxidabilitatea extrem de ridicată a mustului de struguri.

În cazul în care mustul este sulfitat la un moment dat, oxigenul nu mai este consumat și concentrația sa rămâne constantă după un timp dat, care variază în funcție de condiții. Ca o aproximare inițială, timpul variază între 1 și 6 minute când sulfitarea variază între 10 și 100 mg/L. Valoarea timpului este mult mai mare pentru mustul obținut din struguri alterați (Arapitsas ș.a., 2018).

În rezumat, deși efectul anti-oxigen al dioxidului de sulf este implicat în maturarea vinului, rolul său este nesemnificativ în timpul vinificației. În acest caz, SO₂ protejează împotriva oxidărilor prin distrugerea oxidazelor sau cel puțin blocând activitatea lor, dacă distrugerea nu este totală. Fenomenele de oxidare enzimatică sunt inhibitate în acest mod până la începutul fermentației. De la acest punct, caracterul reductiv al fermentației continuă să asigure protecția. Cu toate acestea, fenomenele oxidative pot fi reluate la sfârșitul fermentației în măsura în care oxidazele active rămân după epuizarea SO₂ liber. Testul casărilor oxidazice sau, chiar mai bine, determinarea activității lacazei, permite evaluarea riscului și a măsurilor necesare de luat. În must, oxidările enzimatice sunt mai semnificative decât oxidările chimice deoarece sunt mai rapide. În vin, totuși, oxidările chimice joacă un rol incontestabil, deoarece enzimele oxidative nu mai există. În acest caz, SO₂ reacționează cu oxigenul pentru a proteja vinul (Valera ș.a., 2017).

Putrezirea este responsabilă pentru cele mai grave fenomene oxidative. De fapt, *Botrytis cinerea* secretă o lacază mai activă și stabilă decât tirozinaza strugurilor.

Este responsabil pentru casarea oxidativă din vinurile roșii derivate din struguri alterați.

O sulfitare adecvată poate proteja într-o oarecare măsură împotriva acestui fenomen. Tabelul 1.4 arată că sulfitatea intensă a strugurilor alterați (deoarece puteau fi folosiți în trecut) crește concentrația totală de compuși fenolici și intensitatea culorii, în timp ce reduce riscul de casare oxidativă. Progresele în protecția fitosanitară a viței de vie au făcut ca astfel de situații să fie extrem de rare.

	<i>Compuși fenolici totali</i>	<i>Intensitatea culorii</i>	<i>Potential de casare oxidativă</i>
<i>Fără SO₂</i>	32	0.53	++++
<i>+ 10gSO₂/hL</i>	41	0.63	++
<i>+ 20g SO₂/hL</i>	45	0.83	0

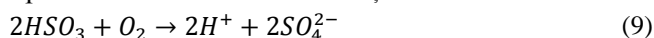
Tabel 1.4. Protecția culorii vinului roșu vinificat din struguri botirizați prin sulfitare (Sudraud, 1985).

Table 1.4. Color protection of red wine vinified from botrytized grapes by sulfiting (Sudraud, 1985).

De la începutul dezvoltării fungice, secreția de oxidază de către *Botrytis cinerea* în interiorul boabelor poate fi considerabilă, în timp ce semnele externe sunt abia vizibile. Această situație poate fi observată în cazul strugurilor roșii. Primele pete maronii sunt mai greu de observat pe strugurii roșii decât pe cei albi. În timpul vremii reci, vegetația externă a *Botrytis cinerea* este mai puțin dezvoltată. Acești factori trebuie luați în considerare atunci când se alege concentrația corespunzătoare de sulfitare.

1.5 Mecanismul de acțiune și importanța SO₂ în industria vinului

În general, SO₂ este sub forma unui lichid, o soluție cu concentrația nominală de 5% v/v, este cel mai des utilizată în industria vinului. Se pot utiliza și sub formă de săruri precum metabisulfid de sodiu (Na₂S₂O₅) sau metabisulfid de potasiu (K₂S₂O₅), bisulfid de potasiu (KHSO₃), bisulfid de sodiu (NaHSO₃), bisulfid de calciu (CaHSO₃) și sulfid de sodiu (Na₂SO₃) (Sudraud și Chauvet, 1985). După adăosul în vin, compușii care conțin sulf sunt dizolvați și procesul de hidroliză implică apariția ionilor sulfid HSO₃⁻, SO₃²⁻ și acid sulfuros H₂SO₃. Acești ioni reacționează direct cu oxigenul înainte ca polifenolii din vin și sunt convertiți în ioni sulfat SO₄²⁻ și acid sulfuric (H₂SO₄) (Ribéreau-Gayon ș.a., 2000; Clarke and Bakker, 2004). Aceste reacții sunt prezentate în următoarea reacție:



Din alte puncte de vedere în explicarea mecanismului de acțiune a SO₂, s-a concluzionat faptul că SO₂ reacționează ca un antioxidant prin eliminarea oxigenului, ca urmare a reacțiilor cu peroxidul de hidrogen produs prin oxidarea polifenolilor și prin reducerea compușilor de tip chinonic formați prin oxidare și transformarea lor la formele fenol.

Acidul sulfuros (H_2SO_3) care este una din formele reactive ale SO_2 , se combină cu acetaldehida și determină apariția acidului sulfuros aldehydic. Astfel, SO_2 concurează pentru peroxidul de hidrogen pentru a preveni formarea de aldehydă și pentru a preveni aroma nedorită a acetaldehidei în vin (Elias și Waterhouse, 2010).

1.6 Efectele fiziologice ale dioxidului de sulf

Adăugarea dioxidului de sulf la vin ridică obiecțiile legate de sănătate. Acestea ar trebui luate în considerare, deși acest produs se mândrește cu o istorie îndelungată de utilizare. Utilizarea sa a fost întotdeauna reglementată, iar tehnicile enologice au căutat întotdeauna metode de reducere a concentrațiilor sale. Începând cu începutul secolului, posibila toxicitate a dioxidului de sulf a fost subiectul multor cercetări (Divol ș.a., 2012).

Toxicitatea acută a fost studiată la animale. Absorbția unei doze unice de sulfiți este ușor toxică. În funcție de specia de animal, DE50 (doza letală pentru 50% dintre indivizi) este între 0.7 și 2.5 g de SO_2 pe kilogram greutate corporală. Prin urmare, sulfitul de sodiu ar avea o toxicitate acută similară cu produse inofensive precum bicarbonatul de sodiu sau clorura de potasiu.

Toxicitatea cronică a fost studiată și la animale (Jacobs și Hatfield, 1972). Pe parcursul mai multor generații, s-a absorbit regulat o cantitate care conținea 1.5 g SO_2 /kg. Au rezultat trei tipuri de complicații: o deficiență de tiamină legată de distrugerea sa prin dioxidul de sulf; o modificare histopatologică a stomacului; și încetinirea creșterii. Acest studiu a permis stabilirea unei concentrații maxime netoxice pentru șobolani la 72 mg/kg greutate corporală. Această valoare a condus Organizația Mondială a Sănătății să stabilească DZR (doza zilnică recomandată) la 0.7 mg SO_2 /kg greutate corporală.

În ceea ce privește toxicitatea sa la oameni, studiile efectuate indică apariția simptomelor de intoxicație precum greață, vărsături și iritații gastrice la concentrații absorbite semnificativ de mari (4 g de sulfid de sodiu într-o singură concentrație). Nu s-au observat efecte secundare cu o concentrație de 400 mg de dioxid de sulf timp de 25 de zile.

La oameni, posibila sa toxicitate a fost adesea atribuită distrugerii bine-cunoscute a tiaminei sau vitaminei B1 de către sulfiți, dar reacția corespunzătoare s-a dovedit a fi foarte limitată la un pH de aproximativ 2, ceea ce corespunde pH-ului stomacului.

În 1973, s-a dovedit că există reacții alergice la sulfiți. Acestea apar la concentrații ingerate foarte mici (aproximativ 1 mg) și se referă în principal la astmatici (4-10% din populația umană). Astmaticii sunt deci îndemnați să se abțină să bea vin. Deși sensibilitatea la SO_2 nu a fost demonstrată clar pentru non-astmatici, aceste reacții alergice au determinat FDA (Food and Drug Administration) din SUA

să solicite menționarea prezenței sulfiților pe etichetele vinurilor din Statele Unite atunci când concentrația depășește 10 mg/L.

Având în vedere doza zilnică recomandată (DZR) de 0.7 mg/kg/zi, concentrația acceptabilă pentru un individ este între 42 și 56 mg pe zi, în funcție de greutatea corporală (60 și 80 kg, respectiv). Consumul a jumătate de sticlă de vin pe zi (375 ml) poate furniza o cantitate de SO₂ mai mare decât DZR. Dacă concentrația totală de SO₂ este la limita maximă autorizată de UE (160 mg/L pentru vinurile roșii și 210 mg/L pentru vinurile albe), cantitatea de SO₂ furnizată de jumătatea unei sticle este de 60 mg pentru roșii și 79 mg pentru albe. Concentrațiile medii de SO₂ observate în Franța sunt mult mai mici: 75 mg/L pentru vinurile roșii și 105 mg/L pentru vinurile albe. Prin urmare, consumul zilnic al unei jumătăți de sticlă furnizează respectiv 28 și 39 mg SO₂ (Ribéreau-Gayon ș.a., 2006).

1.7 Efectele adverse ale SO₂ și reglementări legale

Pe lângă efectul său antioxidant, SO₂ joacă un rol important ca aditiv antimicrobian împotriva microorganismelor nedorite, cum ar fi levurile sălbatice și bacteriile acidului acetic din vin. Levurile sunt foarte sensibile la SO₂. Bacteriile devin inactice la concentrații de 40-50 mg/L SO₂, în timp ce levurile din sunt rezistente până la concentrații de 150-400 mg/L SO₂ (Santos ș.a., 2012).

Minimizarea oxidării este de mare importanță pentru gust, miros și culoarea vinurilor. Polifenolii sunt oxidați de către polifenol oxidaza (tirozinaza) și de enzimele de tip lactaze care pot cauza schimbarea culorilor și a aromelor din vin. SO₂ inhibă enzime precum polifenol oxidaza, peroxidaza proteaza și, de asemenea, reduce reacțiile Maillard care generează casarea (înnegrirea vinurilor).

Pe lângă toate efectele pozitive ale SO₂, efectele negative asupra sănătății umane au făcut obiectul unor cercetări de mai mulți ani. Consumatorii au observat diferite niveluri de efecte adverse împotriva SO₂ (majoritatea persoanelor sensibile la sulfuri sunt afectate în cantități de SO₂ variind de la 20 la 50 mg), care sunt asociate cu numeroasele riscuri pentru sănătate, cum ar fi angio-edem, diaree, dureri abdominale, bronho-constricție și anafilaxie. Alte boli asociate sunt astm, reacții alergice, dureri de cap, oboseală, mâncărimi. SO₂ și derivații acestuia pot cauza activarea unor gene proto-oncogene și inactivarea unor gene supresoare tumorilor.

Odată cu înțelegerea efectelor adverse ale SO₂, au fost introduse reglementări și standarde legale în legislația națională/internațională referitoare la SO₂ utilizat în vinuri. În legislația Uniunii Europene, producătorii sunt obligați să precizeze în etichetă „conține sulfiți”, în cazul unui conținut de sulfid mai mare de 10 mg/L în alimente. Conform Organizației Internaționale a Viei și Vinului (OIV), aceste limite sunt de 150 mg/L pentru vinurile cu conținut de zahăr <5 g/L; 200 mg/L pentru vinurile cu un conținut de zahăr ≥ 5 g/L (OIV, 2018) (tabel 1.5). Reglementările OIV și ale Uniunii Europene au redus treptat utilizarea SO₂ la 100 mg/L pentru „Vinurile

Organice”. Potrivit Departamentului Agriculturii din SUA (USDA), această limită este de 100 mg/L pentru vinurile etichetate ca „struguri organici produși” (USDA, 2019). Limitele maxime de SO₂ pot fi mai mari pe baza tipului de vin și conținut de zahăr din reglementări.

Tipul de vin /zaharuri	Vinuri convenționale : EC 606/2009	Vinuri organice /zaharuri : EC 203/2012
Vinuri roșii / < 5 G/L	150 mg/L	100 mg/L / < 2 g/L 120 mg/L / > 2 g/L și < 5 g/L
Vinuri roșii / ≥ 5 G/L	200 mg/L	170 mg/L
Vinuri albe și roze / < 5 G/L	200 mg/L	150 mg/L / < 2 g/L 170 mg/L / > 2 g/L și < 5 g/L
Vinuri albe și roze / ≥ 5 G/L	200 mg/L	220 mg/L

Tabel 1.5. Reglementări OIV și ale Uniunii Europene pentru limite pentru SO₂ în vinuri convenționale.

Table 1.5. OIV and European Union regulations for SO₂ limits in conventional wines.

1.8 Alterarea bacteriană a vinului

Bacteriile sunt parte a ecosistemului microbial natural al vinului și joacă un rol important în producerea vinului prin reducerea acidității și contribuind la aroma și gustul acestuia. În mod invers, acestea pot cauza numeroase probleme nedorite de deteriorare a vinului, care reduc calitatea și valoarea acestuia. Unul dintre obiectivele vinificației este minimizarea potențialului de deteriorare microbială și această revizuire se concentrează asupra deteriorării bacteriene a vinului și explorează opțiunile pentru reducerea creșterii bacteriilor nedorite.

Pentru a controla populația microbială, se pot explora mai multe tehnologii, inclusiv câmpuri electrice pulsate, presiune ultra-înaltă, ultrasunete sau iradiere cu UV și produse naturale, inclusiv bacteriocine și lizozim.

1.9 Principii privind alterarea bacteriană a vinului

Bacteriile și levurile sunt găsite în mustul de struguri și vin provin din vie, struguri și echipamentele de procesare din crama (Fleet, 1993). Această “microfloră naturală” include câteva zeci de specii de levuri, *Saccharomyces cerevisiae* fiind predominantă. Bacteriile care se găsesc în mustul de struguri și vin sunt doar cele care produc acid lactic și acid acetic (AAB). Acestea includ patru genuri de bacterii lactice (LAB), *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* și *Pediococcus* și două genuri de AAB, *Acetobacter* și *Gluconobacter*.

Mulți dintre metaboliții secundari produși de bacterii sunt volatili și pot afecta potențial calitățile senzoriale ale vinului; această revizuire se va concentra asupra compușilor de deteriorare a gustului. Tabelul 1.6 listează acești compuși, descrierile lor senzoriale și concentrațiile pragului de aromă.

Creșterea încărcăturii bacteriene de tip *Lactobacillus*, *Pediococcus* și chiar a unor specii de *Oenococcus* în vin, de obicei după fermentarea malolactică, duce la numeroase căi de deteriorare, deoarece acestea pot forma compuși nedoriți de aromă și gust. Apariția compușilor cu diverse proprietăți din vin depinde de concentrație și stilul vinului (Bartowsky și Borneman, 2011). De exemplu, aromele butirice sau de caramel ale compusului carbonilic diacetil (2,3-butanediona), care este un metabolit intermediar al metabolismului acidului citric în LAB (Bartowsky ș.a., 2004), pot adăuga arome plăcute și complexitate vinului la concentrații sub 4 mg/L. Cu toate acestea, diacetilul din vin poate deveni obiectabil cu note butiroase evidente dacă depășește această concentrație.

O varietate de factori, inclusiv cei pe care producătorul îi poate controla, în special în timpul fermentației malolactice, afectează concentrația diacetilului. Tulpina bacteriană utilizată, expunerea la oxigen, temperatura fermentației și durata fermentației malolactice au impact asupra formării de diacetil (Bartowsky și Henschke, 2004b).

Acidul acetic, acetaldehida și acetatul de etil sunt principalele tipuri de compuși de deteriorare produși de speciile AAB asociate cu vinul. Acidul acetic și acetaldehida sunt formate din metabolismul oxidativ al etanolului. În plus, AAB poate forma esterul etilic al acidului acetic, acetatul de etil, care are o aromă astringentă, similară cu solvenții organici (Jiranek ș.a., 2008). Vinul prezintă un risc ridicat de deteriorare prin AAB în timpul maturării prelungite în butoaie dacă vinul nu ocupă cât mai mult din spațiul de depozitare și monitorizat regulat, dar o gestionare proastă în timpul îmbutelirii și depozitării vinului roșu poate duce la deteriorarea acestuia din cauza proliferării *Acetobacter pasteurianus* (Bartowsky și Henschke 2004a, 2008). Se pot observa creșteri mici ale acidului acetic în timpul fermentației alcoolice.

Datorită metabolismului levurilor sau după finalizarea fermentației malolactice, de obicei din metabolismul acidului citric produs de LAB (Ramos și Santos 1996), se formează compuși de gust neplăcut. Vinurile cu gust de șoarece rezultă din metabolismul ornitinei și lizinei, ducând la formarea de compuși nitrogen-heterociclici extrem de puternici și neplăcuți [2-acetiltetrahidropiridina, 2-acetil-1-pirolina și 2-etiltetrahidropiridina] (Costello ș.a., 2004).

Acești compuși sunt percepuți pe palatul paladin ca un gust persistent de șoarece închis într-o cușcă datorită interacțiunii cu mediul bucal. Formarea de compuși nitro-heterociclici pare să fie limitată la LAB heterofermentative (*O. oeni* și unele specii de *Lactobacillus*) (Costello ș.a., 2004). Levurile *Dekkera* și *Brettanomyces* asociate cu vinul au fost arătate că produc acești compuși (Jiranek ș.a., 2008), cu toate acestea, nu par să fie principala sursă a acestei probleme.

Acidul sorbic (acid 2,4-hexadienoic) poate fi utilizat ca și conservant chimic în vinurile îndulcite la îmbuteliere pentru a preveni fermentația secundară după îmbuteliere. Cu toate acestea, mai multe specii LAB, inclusiv tulpinile *O. oeni*, sunt

capabile sa metabolizeze acidul sorbic rezultând formarea de 2-etoxihexa-3,5-dien, care are un miros asemănător cu frunzele zdrobite de mușcată (*Pelargonium spp.*). Astfel, este necesară precauție la îmbutelierea vinului conservat cu acid sorbic pentru a asigura eliminarea populației bacteriene (Terrell ș.a., 1993).

<i>Compus</i>	<i>Descriptor olfactiv</i>	<i>Nivel aromă</i>	<i>Bacterie (gen)</i>
<i>Acetaldehidă</i>	Măr învinețit, cireasă, nucă	100 mg/L	<i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
<i>Acid acetic</i>	Oțet, acru,iute	200 mg/L	<i>Acetobacter, Gluconobacter, LAB*</i>
<i>Acetat de etil</i>	Lac de unghii	7.5 mg/L	<i>Acetobacter, Gluconobacter, LAB*</i>
<i>2,3-Butandionă (diacetil)</i>	Unt, nuci, caramel	0.1 – 2.0 mg/L	<i>Oenococcus, Lactobacillus</i>
<i>2-Etoxi-3,5-hexadienă</i>	Frunze de mușcată zdrobite	0.1 μg/L	<i>Lactobacillus, Pediococcus</i>
<i>2-Acetil-tetrahidropiridină</i>	Șoarece	4.0 – 5.0 μg/L	<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
<i>2-Etil-tetrahidropiridină</i>	Șoarece	2.0 – 18 μg/L	<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
<i>2-acetil-1-pirolină</i>	Șoarece	7.0 – 8.0 μg/L	<i>Lactobacillus, Oenococcus</i>
<i>Acroleină</i>	Amar		<i>Lactobacillus, Pediococ</i>
<i>β-D-Glucan (exopolizaharidă)</i>	Textură groasă, vâscoasă, uleioasă, vicioasă		<i>Pediococcus</i>
<i>Manitol</i>	Vâscos, dulce, iritant		<i>Oenococcus</i>

Tabel 1.6. Compuși de alterare a vinului ca urmare a metabolismului bacterian în timpul vinificației (*LAB, bacterii lactice; include specii din *Lactobacillus, Oenococcus* și *Pediococcus*).

Table 1.6. Wine spoilage compounds as a result of bacterial metabolism during winemaking (*LAB, lactic acid bacteria; includes *Lactobacillus, Oenococcus* and *Pediococcus* species).

Metabolismul mai multor zaharuri și poliolo de către bacterii poate duce la deteriorarea vinului. Senzația de amar din vin poate apărea din metabolismul glicerolului, în principal de către *Lactobacillus sp.* Gustul amar este considerat a fi rezultatul reacției fenolilor din vinul roșu cu acroleina. Acest tip de deteriorare a vinului este adesea denumit “amertume” (amar în franceza).

Metabolismul fructozei de către LAB hetero-fermentative, inclusiv *O. oeni*, poate duce la formarea de manitol, un alcool de zahar cu șase atomi de carbon (Wisselink ș.a., 2002). Vinul cu gust de manitol este complex deoarece este însoțit de obicei și de acid acetic ridicat, acid d-lactic, n-propanol și 2-butanol. Un astfel de vin deteriorat poate fi perceput și ca având o textură lipicioasă cu un miros de oțet și gust ușor dulce. Trecerea la formarea de manitol prin fermentația heterolactică și fermentația manitolului are loc la nivel metabolic, este legată de rata de creștere și menținerea echilibrului redox (Suarez ș.a., 2007).

Un vin cu o textură vâscoasă și groasă este denumit “ropos”; acest lucru se datorează prezentei exopolizaharidelor în exces, cum ar fi β-d-glucanul. În acest context, formarea de exopolizaharide este aproape exclusiv din cauza creșterii *Pediococcus* în vin, care este stimulată de pH-ul ridicat. Formarea de β -d-glucan și

polimerizarea sa sunt bine caracterizate si s-a demonstrat ca sunt rezultatul prezentei unui plasmid care poarta gena DPS (glucosil-transferaza). Recent, au fost izolate unele tulpini *O. oeni* care poartă gena DPS (Walling ș.a., 2005).

1.10 Îndepărtarea sau inhibarea bacteriilor nedorite din vin.

Cum se poate evita cel mai bine deteriorarea vinului nu este întotdeauna clar. Chiar și practicile adecvate de igienă și natura chimică agresivă a vinului nu pot fi considerate un mijloc sigur împotriva bacteriilor nedorite, iar reglementările privind fabricarea vinului pot limita opțiunile intervenționale disponibile producătorului de vin. Ca barieră inițială, concentrațiile ridicate de etanol (până la 16% v/v), aciditatea ridicată a vinului (pH-ul poate fi chiar 2.9) pot inhiba dezvoltarea populațiilor bacteriene; totuși, în cazul vinurilor cu concentrații mai mici de etanol și aciditate scăzută (cu pH mai mare de 3.7), poate fi dificil să se oprească creșterea bacteriană. Depozitarea vinului la temperaturi sub 15°C ar putea ajuta la minimizarea capacității bacteriilor de a se multiplica în vin.

Spre deosebire de tratamentul mustului în fabricarea berii, mustul de struguri nu este pasteurizat înainte de inocularea cu levuri. Încălzirea vinului înainte de îmbuteliere a fost explorată, inclusiv pasteurizarea rapidă, cu toate acestea, îngrijorările cu privire la impactul acestuia asupra caracteristicilor senzoriale ale vinului au făcut ca această tehnologie să nu fie larg utilizată (Ribereau-Gayon ș.a., 2006).

În mod tradițional, dioxidul de sulf a fost folosit pentru a controla microorganismele nedorite în timpul vinificației, unde este adăugat de obicei la bazinele de struguri culeși mecanic și după fermentația malolactică. SO₂ acționează atât ca agent anti microbian, cât și ca antioxidant în vin (Romano și Suzzi, 1993). Cu toate acestea, mai multe specii bacteriene sunt rezistente la concentrații ridicate de SO₂.

2 SUBSTANȚE CHIMICE ȘI PROCESE FIZICE CA ALTERNATIVĂ LA SO₂ FOLOSIT ÎN TIMPUL VINIFICAȚIEI

2. CHEMICALS AND PHYSICAL PROCESSES AS ALTERNATIVES TO SO₂ USED DURING VINIFICATION

2.1 Generalități

O categorie de metode utilizate pentru substituția SO₂ este reprezentată de tratamente chimice care includ utilizarea dimetil-carbonat, lizozimă, chitosan, complex cu Ag coloidal; tratamentele cu bacterionicine, aplicare de extracte naturale cum ar fi extracte fenolice pe bază de struguri, extracte de coardă de viță de vie, extracte pe bază de măslin și alte tipuri de extracte. În acest scop, s-au studiat efectele tratamentelor termice asupra calității vinului. Tehnicile de procesare termică asupra strugurilor, mustului și vinului se focalizează pe transformarea polifenolilor precum și variațiile antioxidante asupra procesării. Această tehnică este una din cele mai importante cu rol în reducerea adaosului de SO₂ la vin.

Există mai mulți inhibitori chimici și produse naturale care pot fi utilizați pentru controlul bacteriilor din vin. Cu toate acestea, aceste opțiuni sunt aditivi și, ca atare, este necesară aprobarea legislativă pentru utilizarea lor în fabricarea vinului.

Mulți conservanți chimici au fost identificați pentru a reduce nivelul de SO₂ utilizat în vinificație. Recent s-a sugerat că utilizarea compușilor chimici precum dicarbonat de dimetil, lizozima, chitosanul etc. pot preveni oxidarea vinului și inhibă microorganismele nedorite.

“Produsele naturale” cum ar fi lizozima și bacteriocidele pentru inhibarea creșterii bacteriene au fost utilizate cu succes în diverse industrii farmaceutice și alimentare timp de aproape 50 de ani, iar lizozima a fost aprobată recent pentru utilizare în fabricarea vinului (rata maximă de adăugare: 500 mg/L). Lizozima, singurul compus cu activitate muramidazică, este inefficient împotriva celulelor eucariote, adică nu poate fi utilizat pentru a controla levurile care deteriorează gustul, cum ar fi *Dekkera/Brettanomyces* (McKenzie și White, 1991).

2.2 Dicarbonatul de dimetil

Dicarbonatul de dimetil (DMDC) este un inhibitor chimic al microorganismelor (Daudt și Ough, 1980) prin inactivarea enzimelor celulare. Se hidrolizează la metanol și dioxid de carbon, constituenți naturali ai mustului de struguri și ai vinului care nu afectează gustul sau culoarea vinului. Cu toate acestea, eficacitatea DMDC variază între specii și tulpini. Studiile au demonstrat că bacteriile sunt mai rezistente decât levurile la DMDC (150-400 mg/L) (Delfini ș.a., 2002). Studii mai recente la vinul roșu sugerează că rata permisă de adăugare a

dicarbonatului de dimetil (200 mg/L) nu inhibă eficient LAB sau AAB (Costa ș.a., 2008), ceea ce sugerează că DMDC ar putea să nu fie un bun conservant împotriva contaminării bacteriene nedorite a vinului. Alte dezavantaje ale utilizării DMDC în vin sunt solubilitatea sa redusă în apă și toxicitatea potențială după ingestie sau inhalare în timpul tratamentului vinului.

DMDC este mai puțin eficient împotriva bacteriilor în comparație cu SO₂. Din acest motiv, în practica viti-vinicolă, în limita dozei maxime legale admise, DMDC este un conservant eficient pentru a controla contaminarea, dar este ineficientă împotriva bacteriilor acidului lactic și acidului acetic din vinuri (Bordeu & Huang, 1988). Pe de altă parte, acțiunea DMDC este temporară, deci nu este recomandat să fie utilizat în cazul vinurilor supuse maturării (Terrel ș.a., 1993).

Amestecuri de SO₂ în concentrații diferite (25 și 50 mg/L) cu lizozimă și DMDC au favorizat formarea de compuși volatili și amine biogene în vinuri. Efectele amestecurilor de lizozimă/DMDC asupra reducerii nivelului de SO₂ în timpul vinificației au fost următoarele:

- amestecul format din concentrații scăzute de SO₂ cu lizozima și DMDC a redus concentrația de amine biogene (histamină, tiramină, putrescină, cadavrină, feniletilamină + spermidină și spermină);
- concentrația totală de amine volatile (dimetilamină, izopropilamină, izobutilamină, pirolidină, etilamină, dietilamină, amilamină și hexilamină) a fost determinată ca fiind mai mare în proba fermentată numai cu SO₂;
- concentrațiile de amine cu grupe amino secundare (dimetilamină, dietilamină, pirolidină) au fost mai mari în proba fermentată numai cu SO₂ decât în cele fermentate cu DMDC și lizozimă sau cu un amestec de conservanți;
- lizozima însăși și lizozima în combinație cu SO₂ au redus formarea de amine biogene, iar amestecul de conservanți s-a părut mai recomandabil.

2.3 Lizozima

Lizozima este o proteină care s-a dovedit a avea efecte anti microbiene asupra multor alimente derivate din ou alb. Este activă la valori de pH cuprinse între 2.8 și 4.2 (Delfini ș.a., 2004). Studiile au raportat că lizozima este eficientă pe multe microorganisme din vin, în special pe unele tulpini de bacterii lactice din vinuri (Azzolini ș.a., 2010). Cu toate acestea, tulpinile *Lactobacillus* și *Pediococcus* au supraviețuit la concentrații mai mari de lizozimă

Deși OIV a permis utilizarea lizozimei cu până la 500 mg/L în vinuri, această substanță nu este foarte preferată de producătorii de vin din cauza prețului ridicat, utilizare, stabilizare. De asemenea, utilizarea acestuia în vinificație ar putea prezenta un risc pentru consumatorii alergici la ouă de găină (Santos ș.a., 2013). Este necesar să se menționeze conținutul de lizozimă în etichetele sticlei de vin.

2.4 Chitosan

Chitosanul este un biopolimer aprobat de autoritățile europene și de OIV pentru utilizare ca agent de purificare și anti microbian pentru vinuri (Raafat & Sahl, 2009). În procesul de vinificație, poate fi folosit pentru a preveni deteriorarea bacteriilor. Chitosanul cu surse fungice a arătat o reducere crescută a polifenolilor oxidați în suc și vin și controlul speciilor *Brettanomyces* (Chorniak, 2007).

Inactivarea bacteriilor acidului acetic a fost investigată la vinurile contaminate artificial. Valera ș.a., (2017) au comparat efectele chitosanului și SO₂ și ambele molecule au redus activitatea metabolică a tulpinilor de bacterii ale acidului acetic din vinuri.

În plus, Chinnici ș.a., (2014) au investigat efectele protectoare ale sulfurilor și aditivilor chitosanici împotriva degradării oxidative a tiolilor varietali. Oxidarea tiolului a fost redusă semnificativ de chitosan. Totodată s-a demonstrat că aditivul poate contribui la păstrarea caracterului divers al vinurilor din strugurii aromatici și la nivelurile reduse de sulfuri.

Filmele de chitosan-genipină au fost folosite pentru a produce vinuri fără adăugarea de SO₂ ca și conservant (Nunes ș.a., 2016). S-a observat că aceste vinuri erau mai puțin susceptibile la brunificare decât cele preparate folosind dioxid de sulf. În plus, s-a demonstrat că formarea complexelor de fer-tartrat-chitosan inhibă reacțiile de oxidare, precum și creșterea microbiană, reducând reacțiile de oxidare prin reducerea disponibilității fierului și a altor metale. Utilizarea filmelor de chitosan-genipină în vinificație a fost propusă ca o tehnică prietenoasă cu mediul și ușoară, care poate păstra vinurile cu calitățile organoleptice necesare.

2.5 Extracte de plante naturale

Una dintre cele mai promițătoare alternative naturale la sulfiți în vinificație este utilizarea extractelor naturale de plante. Extractele de plante anti-oxidative și anti microbiene bogate în compuși fenolici au fost propuse recent ca o alternativă totală sau parțială la sulfuri în vinificație. Flavonoidele, compușii fenolici și derivații lor, care se găsesc în structura acestor extracte, s-au dovedit a fi eficiente în prevenirea auto-oxidării. De asemenea alte substanțe fitochimice (terpene, alcaloizi, lactone etc.) găsite în extracte pot contribui la proprietățile antioxidante (Yıldırım ș.a., 2015).

Mecanismele de acțiune au fost descrise ca eliminarea radicalilor liberi, combinarea cu ioni metalici, inhibarea sau reducerea formării de oxigen. În plus, acești compuși inhibă radicalii liberi ai substanțelor nutritive, oferind hidrogen în grupele hidroxil ale inelelor aromatice. Studiile actuale indică faptul că creșterea microorganismelor patogene și de deteriorare poate fi puternic redusă sau inhibată de anumite extracte de plante. Activitățile antioxidante ridicate, precum și activitățile antimicrobiene eficiente le fac o metodă naturală alternativă, în loc de conservanți potențial sintetici.

Vinurile tratate cu acești conservanți naturali vor fi mai competitive pe piața globală actuală. Din acest motiv, sunt necesare studii actuale despre efectele extractelor de plante asupra calității și a proprietăților senzoriale asupra produsului final. S-a raportat că vinurile tratate cu aceste extracte fenolice bogate previn oxidarea și provoacă o percepție senzorială mai bună decât SO₂ (Sonni ș.a., 2009). În prezent, aceste teste includ; adăugarea de compuși fenolici (cum ar fi acidul cafeic, catechina, taninurile etc.) în vin, extracte pe bază de plante (extract de pieleță de eucalipt și migdale) sau subproduse vitivinicole, cum ar fi tescovină de struguri (semințe și pieleță de struguri), extracte de viță de vie și stejar (Bastante ș.a., 2017).

Contribuția adăugării acestor compuși la calitatea vinurilor și activitățile lor antimicrobiene și antioxidante sunt rezumate în tabelul 2.1. De asemenea, acești subiecți au fost prezentați și descriși în următoarele subiecte.

<i>Tratamente</i>	<i>Contribuții la calitatea vinului</i>	<i>Sctivitate antimicrobiană</i>	<i>Dezavantaje</i>
<i>Prođuși secundari rezultați din vinificație (extracte din pieleță, semințe)</i>	Inhibarea enzimelor, Activitate de eliminare a radicalilor liberi, Procesul de fermentare nu este afectat negativ, Caracter organoleptic mai bun	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>E. coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> ,	Adăugarea de taninuri enologice (galotanin și procianidin) pentru a arăta o valoare mai mare a culorii galbene la vinurile roșii
<i>Cipsuri și extracte de lemn de stejar, extracte de lăstari de viță de vie</i>	Activitate antioxidantă ridicată, Contribuția componentelor volatile la profilul senzorial și aromatic,	Bacteriile acidului acetic și bacteriile patogene	Mai puțin eficient în vinurile albe decât vinurile
<i>Extracte din plante (pieleța de eucalipt și migdale, ulei esențial de cimbru, hidroxitirozol</i>	Prevenirea oxidării, Creșterea compoziției aromatice	<i>E. coli O157: H7</i> , <i>Salmonella enteritidă</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella poona</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> și <i>Candida albicans</i> , LAB	Sunt necesare studii suplimentare la diferite concentrații și condiții de depozitare mai lungi.

Tabel 2.1. Contribuția extractelor de plante naturale la calitatea vinurilor convenționale și activitățile lor antimicrobiene și antioxidante.

Table 2.1. Contribution of natural plant extracts to the quality of conventional wines and their antimicrobial and antioxidant activities.

2.6 Extracte fenolice pe bază de struguri

Vinurile roșii conțin mai mulți compuși fenolici decât vinul alb datorită fermentării în contact cu pieleța și semințe strugurelui conform tehnicii de vinificație. În plus, antocianii sunt un grup semnificativ de compuși fenolici din vinurile roșii, deoarece sunt responsabili de culoarea caracteristică a vinului. Compușii fenolici se

găesc în mod natural în vin și la fel ca și în subprodusele vinului (tescovină de struguri, pieleță, semințe și ciorchine). Acești compuși sunt foarte importanți datorită efectelor lor antioxidante, antimicrobiene și antiinflamatorii (Cheynier, 2012). Studiile au demonstrat că adaosul semințelor de la struguri albi la vinurile albe a furnizat aproximativ 380 mg/L echivalenți de acid galic (GAE) în indicii polifenolici comparativ cu vinul din grupul martor. Studiile actuale au demonstrat că adăugarea de tescovină de struguri la vinuri în timpul fermentației a crescut numărul total de compuși fenolici, catechină și procenidină dimerică în produsul final. Culoarea vinului și scorurile senzoriale rămân aceleași sau mai bune decât vinul din grupul de control. S-a raportat că adăugarea de taninuri la vin previne oxidarea și a conferit proprietăți senzoriale mai bune decât vinurile la care s-a adăugat SO₂ (Sonni ș.a., 2009).

Există unele studii care demonstrează că compușii fenolici găsiți în mod natural în semințele de struguri și extractele de tescovină au o capacitate antimicrobiană ridicată împotriva bacteriilor patogene care provoacă numeroase deteriorări ale vinului. În plus față de componentele principale, cum ar fi polifenoli din extractul de semințe de struguri, alte fitochimice (terpene, alcaloizi, lactone, etc.) găsite în extract contribuie la proprietatea sa anti-microbiană. Recent, Garcia-Ruiz ș.a., (2011) au raportat un studiu comparativ al potențialului inhibitor al unor acizi fenolici, stilbeni și flavonoizi pe diferite tulpini ale bacteriilor acidului lactic izolate din vinuri. Valorile IC₅₀ ale majorității fenolilor au fost mai mari decât cele ale SO₂. Cu toate acestea, flavonoidele și stilbenii au prezentat cele mai mari efecte inhibitoare. Unii dintre autori indică faptul că aceste extracte inhibă microorganismele patogene precum *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* și *Candida albicans* (Silva ș.a., 2018).

2.7 Extractele din lăstari de viță de vie

Vinul roșu este deosebit de bogat în taninuri și, prin urmare, mai puțin predispus la oxidare decât vinurile albe sau roze. Aceste taninuri pot fi obținute din stejari bogați în tanin și semințe de struguri sau acid galic și acid elagic. În timpul procesului de vinificație, este posibil să se îmbogățească vinurile cu taninuri obținute din struguri sau stejar și să se obțină vinuri de calitate superioară. Pascual ș.a., (2017) au studiat vinurile model pentru a determina capacitățile de consum de oxigen ale taninurilor enologice (cum ar fi elagitaninuri) obținute din diferite surse și au demonstrat că adăugarea de tanin a fost o alternativă bună decât SO₂. În plus, taninurile condensate sunt agenți anti-microbieni buni care acționează prin apoptoza peretelui celular al microorganismelor și prin inactivarea enzimelor de legare. Tratarea vinurilor cu taninuri este o practică enologică permisă în multe țări, inclusiv în UE și Statele Unite.

Maturarea vinului în butoaie de stejar este o practică obișnuită pentru îmbunătățirea calității vinului datorită efectelor benefice ale vinului asupra aromei, compoziției aromatice, stabilizării culorii și astringenței. Compușii polifenolici, care apar în mod natural în butoiul de stejar, sunt transferați parțial vinului în timpul maturării. Odată cu difuzia oxigenului din lemn, apar reacții diferite între antocianii și proantocianii din vin care stabilizează culoarea vinului și astringența (Zamora, 2019). În timpul acestui proces apar schimbări semnificative în compoziția vinului. Ca urmare, compușii volatili, profilurile senzoriale și aromatice ale vinului au crescut prin adăugarea de chipsuri de stejar de vin. Alamo-Sanza ș.a., (2019) au declarat că există o relație semnificativă între conținutul fenolic și activitatea antioxidantă a extractului de lemn în vinurile roșii cu vârsta de 10 ani cu așchii de stejar enologice.

Similar abordării chipsurilor de stejar, lăstarii de viță de vie sunt, de asemenea, materiale oenologice cu potențial ridicat datorită proprietăților lor antioxidante și anti microbiene ridicate. Această nouă alternativă a fost testată în vinuri. Raposo ș.a., (2016) a testat adăugarea extractului de lăstari de viță de vie care conține 29% (greutate/volum) stilben comparativ cu vinul din grupul de control (SO₂ adăugat) și a constatat că vinurile Syrah produse prin utilizarea extractului de lăstari de viță de vie au demonstrat scoruri mai mari în parametrii legați de culoare și scoruri senzoriale decât cele tratate cu SO₂. Cebrián-Tarancón ș.a., (2019) au testat lăstari de viță de vie de 12 g/L în vinurile proaspete și după 35 de zile de macerare, valorile acidului elagic, trans-resveratrol, vanilină și guaiacol au fost determinate ca fiind mai mari decât vinurile normale. Rezultatele au demonstrat că au o contribuție pozitivă la proprietățile funcționale ale vinurilor.

2.8 Glutation

Glutationul (GSH) este un alt compus natural important testat pentru efectele de protecție asupra vinurilor. GSH este o tripeptidă compusă din acid glutamic, cisteină și glicină și un antioxidant important care este prezent în mod natural în multe plante, animale, microorganisme și alimente. GSH este prezent în mod natural în vinuri în concentrații scăzute. GSH previne brunificarea vinului și protejează împotriva pierderilor de aromă care apar din cauza oxidării vinurilor albe (Fracassetti ș.a., 2016). Adăugarea de GSH în must și vin până la maximum 20 mg/L a fost inclusă recent între practicile oenologice recomandate de OIV în 2016 (OIV 2016).

Gambuti ș.a., (2015) au studiat vinurile Cabernet Sauvignon la o scară pilot pentru determinarea efectului protector al GSH și rezultatele au arătat că antocianii și antocianidinele au fost conservate în vinul roșu care conține niveluri ridicate de GSH. Cu toate acestea, se indică faptul că GSH nu a împiedicat stabilizarea culorii la vinurile roșii, în timp ce a determinat o creștere a degradării malvidinei 3-monoglucozide. S-a raportat, de asemenea, că GSH nu este suficient de eficient în prevenirea pierderii antocianilor în timpul maturării vinului roșu. Webber ș.a., (2017)

au evaluat efectul adăosului de GSH (10, 20 și 30 mg/L) în cazul vinurilor spumante. Rezultatele au indicat faptul că, deși concentrația totală de GSH a scăzut treptat în timpul depozitării, GSH a redus formarea acetaldehidă cu până la 12 luni. Cu toate acestea, prezența glutatationului a avut un efect redus sau deloc asupra concentrației de SO₂ liber, compuși fenolici totali, catehină, epicatechină, acizi cafeici și cumarici. Cercetătorii au studiat, de asemenea, efectul GSH și/sau elagitaninurilor adăugate la sticlă asupra stabilității calitative a unui vin alb cu conținut de SO₂. Panero ș.a., (2015) au observat că adăugarea de GSH și/sau elagitaninuri la o doză de 20 mg/L nu a limitat evoluția oxidativă a vinurilor îmbuteliate.

2.9 Specii fermentative/protective de tip *Pichia kluyveri*

Speciile de *Pichia* care au fost găsite în must în diverse faze de fermentare și sunt incluse în grupul non-*Saccharomyces*: *P. fermentans*, *P. membranifaciens*, *P. occidentalis*, *P. terricola*, *P. manshurica*, *P. kudriavzevii* și *P. kluyveri* 123. Frecvența izolării speciilor de *Pichia* din struguri este mai mică decât cea a *S. cerevisiae* (28%) și a altor specii non-*Saccharomyces* precum *Hanseniaspora uvarum* (44%). Frecvența variază de la 0.12% pentru *P. occidentalis* până la 4,7% pentru *P. anomala*. Alte specii de *Pichia* raportate în mod obișnuit izolate din struguri sunt *P. manshurica* (2.81%), *P. membranifaciens* (0.98%) și *P. kudriavzevii* (0.85%).

Dintre speciile de *Pichia* legate de vin, *P. kluyveri* este cea mai studiată și singura disponibilă comercial pe piața levurilor. *P. kluyveri* se caracterizează prin capacitatea sa de a îmbunătăți compoziția compușilor aromatici precum tiofenii, terpenele și esterii fructați. În prezent există doar două startere comerciale bazate pe *P. kluyveri*: WLP605 (Vintner's Harvest®, Yakima, WA, SUA), care este promovat ca fiind capabil să crească aromele florale, contribuind la îmbunătățirea buchetului general al vinului și FROOTZEN® (Hansen®, Hoersholm, Danemarca), care este promovat ca fiind capabil să crească aromele varietale și tiofenolice. Ambele sunt indicate pentru utilizare în fermentarea secvențială, mai întâi cu *P. kluyveri* și apoi cu o tulpină *S. cerevisiae*, care va încheia corespunzător fermentarea alcoolică. *Pichia* este un gen de levuri care se reproduc asexual prin butași multilaterali și sexual prin asci (celule specializate). Asci sunt celule care conțin spori și care se formează în timpul reproducerii sexuale. Acești spori sunt sferici sau în formă de pălărie și pot fi netezi sau aspri. Forma celulelor este sferică sau ovoidă și uneori poate apărea ca pseudohife. *Pichia spp.* poate fermenta glucoza dar rar alte molecule de zahăr. Genul asimilează unele zaharuri și nu poate asimila nitrat ca nutrient azotat. Genul produce coenzima Q-7. Ultima revizuire a genului a descris 20 de specii acceptate, printre care *Pichia membranifaciens* este considerată specie tip (Kurtzman ș.a., 2011).

În ceea ce privește *P. kluyveri*, celulele sunt ușor ovoidale și au aproximativ 2-10 μm, iar forma lor este foarte dificil de distins de forma celulelor *S. cerevisiae* sau *S. ellipsoideus*. Capacitatea sa de a produce un film în timpul dezvoltării sale în

must este foarte caracteristică și ne permite să distingem ușor specia printre alte levuri. Capacitatea de formare de filmelor este foarte utilă la scară industrială pentru a evalua rapid succesul implantării atunci când se utilizează produse comerciale care conțin *P. kluyveri*. Această specie poate produce pseudohife în culturile pe plăci, dar nu și în fermentarea lichidă. De asemenea, poate produce ascospori în formă de pălărie. Specia fermentează doar glucoza și prezintă creștere în medii lichide care conțin glucoză, etanol sau glicerol. Ca și alte specii *Pichia*, *P. kluyveri* rezistă la presiune osmotică ridicată, prezentând o creștere optimă în 10% NaCl sau 5% glucoză (Kurtzman ș.a., 2011).

A fost izolat de obicei din fructe rădăcinoase și părți verzi ale plantelor, fiind larg răspândit în toate tipurile de ecosisteme (Ciani ș.a., 2020). Această revizuire a adunat toate informațiile disponibile legate de *P. kluyveri* și influența sa asupra fermentației mustului, luând în considerare faptul că vinul este un produs obținut datorită metabolismului levurilor. Cu toate acestea, *P. kluyveri* prezintă un metabolism mai oxidativ decât *S. cerevisiae* I, fig. 2.1 arată cele mai comune căi metabolice din *P. kluyveri* în condiții de fermentare și influența sa senzorială asupra vinului. În plus, această revizuire a examinat și alte specii *Pichia* care atrag un interes oenologic tot mai mare.

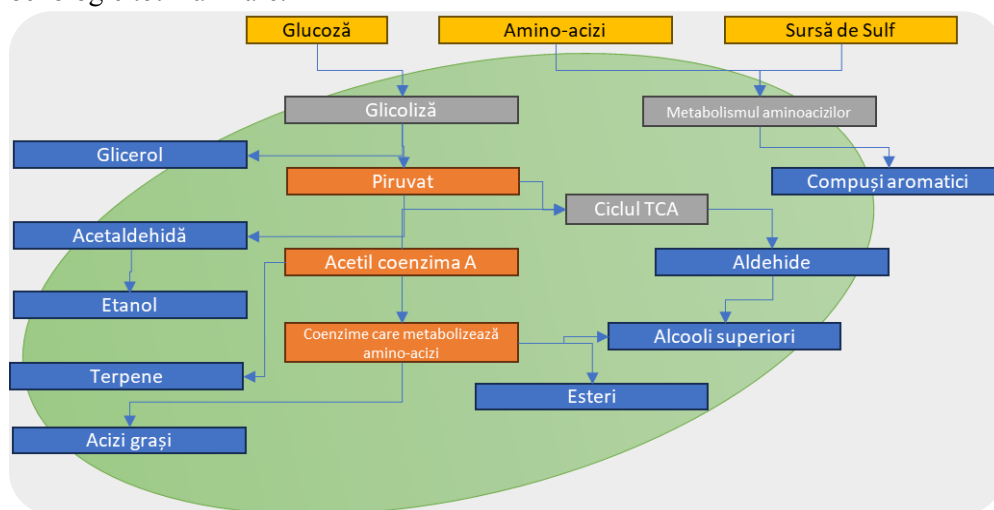


Figura 2.1. Diagrama principalelor procese metabolice în condiții de fermentație la *P. kluyveri*.

Figure 2.1. Diagram of the main metabolic processes under fermentation conditions in *P. kluyveri*.

2.10 Impactul levurilor de tip *P. kluyveri* asupra parametrilor de calitate ai vinului

2.10.1 Etanol

P. kluyveri poate fermenta doar până la 4-5% (v/v) în etanol, consumând doar glucoza și lăsând fructoza (Contreras ș.a., 2014). Această capacitate de fermentare

este insuficientă pentru a produce vinuri obișnuite sau vinuri de bază spumante, dar este suficientă pentru a produce alte băuturi precum berea de aproximativ 3.2% (v/v) (Gutiérrez ș.a., 2018).

Randamentul etanolului al *P. kluyveri* este cu 22% mai mic decât cel al *S. cerevisiae*, producând 0.36 g de etanol per gram de zahăr. Cele mai multe specii *Pichia* au randamente mai mici decât *P. kluyveri*, cum ar fi *P. fermentans* (0.04 g), *P. membranifaciens* (0.08 g), *P. terricola* (0.19 g) și *P. kudriavzevii* (0.33 g). Cu toate acestea, unele specii *Pichia* au fost demonstrate că au un randament mai mare de etanol; de exemplu, *P. holstii* produce în jur de 0.43 g de etanol per gram de zahăr (Contreras ș.a., 2015).

Deoarece *P. kluyveri* nu poate fermenta fructoza și nu poate consuma întreaga cantitate de glucoză prezentă în mustul de struguri, trebuie combinat cu drojdie fermentativă precum *S. cerevisiae* pentru a fermenta complet zaharurile și a obține parametrii de calitate doriți. Fermentarea secvențială care implică *P. kluyveri* și *S. cerevisiae* a dus la un conținut final mai mic de etanol decât controalele *S. cerevisiae*. Diferența s-a mărit în fermentațiile în care *P. kluyveri* a fost prezent pentru o perioadă mai lungă în timpul procesului de producere a vinului. Inocularea secvențială la 48 h a dus la un conținut mai mic de etanol de 0.16% (v/v), în timp ce o altă inoculare secvențială la 96 h a dus la 0.25% (v/v) (Dutraive ș.a., 2019).

2.10.2 Glicerol

Concentrația de glicerol este mai mare în fermentarea secvențială care implică *P. kluyveri* decât în controalele *S. cerevisiae*, iar efectul crește atunci când *P. kluyveri* fermentează mai mult. O inoculare secvențială de 48 h a dus la o creștere a glicerolului de 0.33 g/L, în timp ce o altă inoculare de 96 h a dus la o creștere mai mare de 1.3 g/L. Alte studii au raportat o scădere de aproximativ 48% în co-inoculare (Anfang ș.a., 2009). Această diferență poate fi explicată prin posibila variabilitate a tulpinii similare cu cea raportată pentru alte specii non-*Saccharomyces*. Deși unele studii au raportat creșteri semnificative pozitive ale concentrației finale de glicerol legate de performanța *P. kluyveri*, alți non-*Saccharomyces* precum *C. zemplinina* sunt mult mai eficienți în acest scop, capabili să producă o concentrație finală de glicerol de până la 15 g/L.

2.10.3 Acizii organici

P. kluyveri nu influențează notabil acizii organici ai vinului ca alte specii non-*Saccharomyces* specifice. Se raportează că consumă ușor acidul malic într-o concentrație de aproximativ 0.1 g/L (Dutraive ș.a., 2019). Cu toate acestea, acest lucru nu este suficient pentru a influența semnificativ pH-ul sau pentru a obține stabilitatea microbiologică a acidului malic. Toate studiile care implică *P. kluyveri* au raportat diferențe statistice ne semnificative în formarea de acid acetic între fermentarea

secvențială *P. kluyveri* și controlul *S. cerevisiae*. Un studiu a raportat creșteri ale unor acizi derivați din ciclul acidului tricarboxilic în fermentarea secvențială care implică *P. kluyveri*: acid-cetoglutamic (24%), acid oxalic (50%) și acid succinic (300%) (Lu ș.a., 2017). În acest studiu, controlul a fost o tulpină *T. delbrueckii*. Nu există date disponibile încă pentru vinul de struguri comparativ cu controlul *S. cerevisiae*, astfel încât trebuie efectuate studii suplimentare pe această temă, deoarece rezultate similare ar putea apărea cu fermentarea mustului de struguri.

Concentrația de acid succinic din vin variază de obicei de la 0.5 la 1.0 g/L (Waterhouse ș.a., 2016), astfel încât concentrațiile finale de până la 5 g/L prin inoculări secvențiale raportate pentru *P. kluyveri* ar putea fi o alternativă interesantă la acidifierea vinului. Deoarece aceste concentrații sunt peste valoarea medie pentru vin, este probabil că influențează semnificativ proprietățile sale senzoriale. În timp ce acidul citric, L-lactic, L-malic și L-tartric sunt descrise ca fiind acre și astringente din punct de vedere senzorial, acidul succinic este descris ca fiind acru, sărat și amar. Cu toate acestea, studiul nu include o analiză senzorială pentru a corobora posibila influență a acidului succinic asupra gustului final.

2.10.4 Compuși aromatici

Speciile *P. kluyveri* au arătat o capacitate remarcabilă de a elibera acetat de 3-sulfanilhexan-1-ol (3-SHA) în comparație cu alte specii *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* (Anfang ș.a., 2009). 3-SHA este o moleculă volatilă plăcută care produce arome dorite în vin descrise ca fiind fructul pasiunii. Un studiu a raportat că fermentația secvențială care implică *P. kluyveri* și *S. cerevisiae* a atins concentrații finale semnificativ mai mari de 3-SHA decât controlul fermentat doar de *S. cerevisiae*. Creșterile au variat între 10 și 72% în funcție de raportul inițial de inoculare dintre *S. cerevisiae* și *P. kluyveri*.

Raportul inițial optim raportat a fost 1:9, iar concentrația finală de 3-SHA a variat între 55 și 72% mai mare decât controlul *S. cerevisiae* în funcție de tulpina *P. kluyveri* care a efectuat fermentația. Creșterea sulfanilhexan-1-olului (3-SH) a fost de aproximativ 40% pentru inocularea cu raportul 1:9. Diferențe semnificative statistic în eliberarea tiolilor de către *P. kluyveri* au fost raportate să depindă de tulpina *S. cerevisiae* utilizată pentru a termina corespunzător fermentația alcoolică. Aceste rezultate sugerează că partenerul *S. cerevisiae* trebuie selectat cu atenție pentru a optimiza concentrația totală finală de tioli eliberată în timpul fermentației alcoolice atunci când lucrează împreună cu tulpina selectată *P. kluyveri*. Deoarece se raportează o variație semnificativă a tulpinii privind eliberarea tiolilor pentru *P. kluyveri*, selectarea tulpinilor de levuri cu activitate ridicată de liază, similar cu alte specii non-*Saccharomyces* cum ar fi *T. delbrueckii* sau *M. pulcherrima*, ar putea optimiza activitatea de eliberare a tiolilor *P. kluyveri* (Belda ș.a., 2016).

P. kluyveri reduce conținutul de alcooli superiori totali în fermentația secvențială cu aproximativ 15%, fiecare alcool superior fiind afectat într-un interval diferit (de exemplu, hexanol-50%; 2-fenil-etanol-1-ol: 20%; și butanol-1-ol: 20%). Alte studii au raportat aceleași rezultate, cu variații în diferite intervale ((*Z*)-4-decen-1-ol: 9%; (*E*)-4-decen-1-ol: 8%; 1-decanol: 4%; 1-hexanol: 28%; 1-nonanol: 12%; 2-hepten-1-ol: 32%; 2-metil-3-buten-1,2-diol: 14%; 3-octanol: 11%; 5-nonanol: 20%; și ciclooctanmetanol, α,α -dimetil: 12%). Un efect similar a fost observat anterior și la alte non-Saccharomyces cum ar fi *Torulasporea*, *Lacchancea* și *Metschnikowia* (Benito ș.a., 2019). Alte studii au observat o creștere a alcoolilor superiori de aproximativ 25% și o mare variație între aceștia (de exemplu, hexanol +12% și 2-fenil-etanol +25%). Cele mai recente tehnici biotehnologice pentru producerea vinurilor varietale tind să reducă cât mai mult posibil formarea de alcooli superiori la valori sub 350 mg/L deoarece maschează compușii de aromă varietală (Ruiz ș.a., 2019). Concentrația finală totală de alcool superior raportată pentru fermentația secvențială între *P. kluyveri* și *S. cerevisiae* a fost întotdeauna sub 350 mg/L, variind de la 176 mg/L la 254 mg/L.

Diferite studii raportează concentrații mai mari de esteri totali pentru fermentația secvențială care implică *P. kluyveri* decât probele de control ce conțin *S. cerevisiae*. Un studiu asupra prezenței diferitelor activități enzimatică cu impact oenologic a raportat că toate tulpinile studiate de *P. kluyveri* prezentau activitate de esterază, care catalizează formarea de esteri. Cea mai mare creștere a fost de 25% pentru acetatul de 2-fenil-etil și 50% pentru o inoculare secvențială mai lungă. Un alt studiu a raportat creșteri suplimentare de până la 60% în vin roșu (Whitener ș.a., 2017). Compușii 2-fenil-etil acetat sunt compuși aromatici care cresc percepția aromelor precum trandafirul sau floral, iar pragul de persistență este de la concentrații mai mari de 0,25 mg/L. Tulpinile de levuri utilizate pentru a fermenta soiuri neutre cum ar fi Airen și Ugni blanc, care au avut potențial de a produce niveluri ridicate pentru terpenă sau tioli, sunt selectate pentru a îmbunătăți concentrația finală de esteri fructați. În schimb, tulpinile utilizate pentru a fermenta soiuri cu caracteristici varietale puternice cum ar fi Verdejo, Sauvignon blanc și Muscat sunt selectate pentru a produce niveluri mai scăzute pentru acești esteri pentru a nu masca aromele varietale.

Mai multe studii nu au raportat efectul *P. kluyveri* asupra concentrației finale de terpenă totale în comparație cu controlul *S. cerevisiae*. Acest lucru se datorează în principal faptului că activitatea β -glucosidazei nu este comună în tulpinile *P. kluyveri* (Escribano ș.a., 2017). Alți factori care ar putea afecta acest fenomen sunt sterilizarea inițială a mustului și performanța soiurilor cu conținut scăzut de terpenă. Într-adevăr, sunt raportate diferențe în terpenă specifice. S-a raportat că fermentația secvențială *P. kluyveri* avea niveluri aproape duble pentru linalool și cu 40% mai mari pentru hotrienol în timp ce concentrația de nerol era mai mică cu aproximativ 10%.

Conținutul total de acizi grași nu a fost influențat de *P. kluyveri* sau chiar a scăzut, iar acidul decanoic a fost cel mai afectat, cu o concentrație scăzută cu aproximativ 18%. Aceste rezultate sunt în acord cu un raport care arată absența enzimelor lipazice în speciile *P. kluyveri*. Acizii grași specifici precum acidul izovaleric s-au evidențiat datorită unei creșteri de aproximativ 25% față de controlul *S. cerevisiae*. Formarea acidului izovaleric ar trebui luată în considerare pentru selecția tulpinii, deoarece concentrațiile peste 50 mg/L produc arome nedorite precum brânza râncedă. Acest fenomen a fost raportat anterior și pentru alte specii non-Saccharomyces cum ar fi *T. Delbrueckii*.

Tabelul 2.2 rezumă principalii compuși aromatizanți influențați de *P. kluyveri*. Unele studii au raportat compuși cu miros neplăcut în fermentația secvențială cu *P. kluyveri* în comparație cu controlul *S. cerevisiae*. Unele studii au raportat o creștere a conținutului de acizi grași, cum ar fi acidul 3-metil-butanoic (acid izovaleric) și fenilamina, care sunt legate de arome nedorite, cum ar fi brânza, picioarele transpirate sau aciditatea neplăcută. *P. kluyveri* a fost raportată că produce niveluri mai ridicate de hidrogen sulfurat cu aproximativ 50% în fermentația secvențială, deși valoarea finală era sub pragul defectului.

Grupă	Compus aromatic	Descriptori olfactivi	Prag de percepție (NG/L)
Alcoolii superiori	2-metil butanol	Aspru, lac de unghii	30.000
	3-metil butanol	Aspru, lac de unghii	10.000
	2-fenil-etanol	Trandafir	10.000
Esteri	2-fenil-etil-acetat	Trandafir, zmeură	250
	2-metil-butil acetat	Banana	5
Terpene	Linalool	Floral, fructat	6 pentru soiurile albe
			15 pentru soiurile roșii
Tioli	Hotrienol	Slab, floral, soc	110
	3-SHA	Fructul pasiunii, cimișir	4
	3-SH	Grapefruit, citrice	

Tabel 2.2. Principalii compuși de aromă influențați de *P. kluyveri*, descriptorul aromatic și pragul de percepție.

Table 2.2. Main aroma compounds influenced by *P. kluyveri*, aroma descriptor and perception threshold.

2.10.5 Aminoacizi

Doar un singur studiu a raportat conținutul final de aminoacizi în fermentația secvențială cu *P. kluyveri* în comparație cu fermentația convențională de *S. cerevisiae* (Benito ș.a., 2015). Fermentația secvențială cu *P. kluyveri* a produs aproximativ 10% mai puțin treonină decât fermentația pură cu *S. cerevisiae*. Nu au existat diferențe în ornitină, în timp ce concentrația altor aminoacizi studiați a fost întotdeauna mai mare pentru fermentația secvențială cu *P. kluyveri*. Creșteri ușoare variind de la 5% la 15% au fost raportate pentru asparagină, alanină, leucină și glicină, în timp ce creșteri mai mari de aproximativ 50% au fost raportate pentru acidul aspartic, arginina,

fenilalanina, izoleucina, lizina, serina și tirozina. Conținutul crescut final de aminoacizi este de obicei legat de consumul mai mic de azot nutrient sau de eliberarea celulară mai mare. Nu există rapoarte științifice despre *P. kluyveri* ca producător de amine biogene (Landete ș.a., 2007).

Creșterea concentrației finale de tirozină și lizină ar putea evolua către tiramină și cadaverină dacă ar fi decarboxilate de bacterii lactice în timpul fermentației malolactice sau a unui proces nedorit de contaminare. Concentrația finală cu 50% mai mare a fenilalaninei decât controlul *S. cerevisiae* ar putea explica formarea mai mare de acid izovaleric observată în alte studii (Whitener ș.a., 2016). Acidul izovaleric poate fi produs din alte aminoacizi datorită enzimei l-aminoacid-aromatic decarboxilază (AADC) (Whitener ș.a., 2016).

2.10.6 Impact senzorial în fermentarea vinurilor convenționale

Doar un singur studiu științific a efectuat o evaluare senzorială a fermentației *P. kluyveri*, analizând 17 parametri. Studiul a raportat că fermentația secvențială implicând *P. kluyveri* arată o impresie generală mai bună cu aproximativ 30% față de controlul *S. cerevisiae*. Calitatea aromatică mai bună a fost legată de un caracter fructat mai ridicat (Anfang ș.a., 2009), în principal percepții senzoriale din categoria fructelor de tip piersici, caise, citrice și grepfrut, care ar putea fi legate de o creștere a eliberării tiolilor (în principal 3-SHA) în timpul fermentației alcoolice.

Acel studiu raportează de asemenea o tipicitate mai mare a soiului de struguri Riesling, în mod obișnuit legată de acele descrieri. Alte studii nu au arătat creșteri din punct de vedere senzorial ale acestor descrieri în comparație cu controlul *S. cerevisiae* (Whitener ș.a., 2016). Diferențele pot fi legate de absența precursorilor tiolici sau de variabilitatea tulpinilor levuriene. Deși 3-SH apare în concentrații mai mari decât 3-SHA, pragul de percepție corespunzător este de 60 și 4 ng/L. Din acest motiv, 3-SHA are un impact de 15 ori mai mare asupra vinului decât 3-SH, justificând importanța sa mai mare. Descrierile specifice ale aromelor de tip 3-SHA sunt fructul pasiunii, care descriu tipicitatea unor vinuri precum Sauvignon blanc (Ruiz ș.a., 2019).

2.10.7 Factorul killer și influența sa asupra ecologiei vinului

Deteriorarea vinului asociată cu diferite tulpini non-*Saccharomyces* este o preocupare majoră pentru producătorii de vin. Prin urmare, este important să se dezvolte o procedură fiabilă și eficientă pentru a inhiba prezența acestor levuri. Pentru a atinge acest scop, dioxidul de sulf (SO₂) este utilizat pe scară largă, dar efectul antimicrobian al acestui compus este afectat de compoziția vinului și poate provoca reacții alergice la consumatorii de vin. Alternativa pentru controlul biologic al abundenței sale este căutată activ (Capece ș.a., 2020). Această secțiune a revizuirii se concentrează pe descrierea toxinelor ucigașe produse de *P. kluyveri*, care sunt

compuși antimicrobieni și care au arătat potențial pentru inhibarea diferitelor levuri care deteriorează vinul.

Mai multe genuri și specii de levuri pot produce și secreta proteine toxice care inhibă multe ciuperci filamentoase și levuri sensibile. Capacitatea de a produce toxine ucigașe este dependentă de tulpină, de obicei legată de infecția cu particule asemănătoare virusului din familia *Totiviridae*. Cu toate acestea, în genul *Pichia*, mai multe toxine au fost descrise ca fiind asociate cu elemente genetice citoplasmice, cum ar fi elementele asemănătoare virusului dsDNA sau codificate cromozomial (Belda ș.a., 2017).

Pichia este unul dintre cele mai prolifiche genuri de levuri în formarea de diferite tipuri de toxine ucigașe. *P. acaciae*, *P. inositovora*, *P. anomala*, *P. kluyveri* și *P. membranifaciens*, care sunt răspândite în natură și în medii legate de vin și au fost identificate ca levuri cu factor killer. Majoritatea acestor toxine, caracteristicile lor și aplicațiile potențiale au fost revizuite anterior.

În ceea ce privește *P. kluyveri*, două toxine au fost descrise. Prima toxină descrisă pentru *P. kluyveri* 1002 este o glicoproteină de 19,0 kDa care este moștenită cromozomial și își arată activitatea majoră la pH între 3.8 și 4.0. Mecanismul său de acțiune se bazează pe permeabilizarea membranei. A doua toxină, *Pkkp*, are o masă moleculară mai mare (54,0 kDa) și o valoare optimă mai mare a pH-ului (4.0-4.5), iar receptorul său primar se află în peretele celular; mecanismul său de acțiune nu a fost elucidat (Labbani ș.a., 2015).

Prima toxină ce aparține *P. kluyveri* are un efect antimicotic asupra celulelor sensibile. Este produs în faza de creștere exponențială și permite un avantaj în fermentarea mustului, cu toate că este asociat cu un cost. Costul vine dintr-o întârziere în atingerea fazei de creștere exponențială față de fenotipul non-killer,

Alte toxine *Pichia*, cum ar fi toxina killer *P. membranifaciens* (*PMKT*), prezintă o interacțiune sinergică atunci când sunt utilizate în combinație cu antimicrobiene alimentare, cum ar fi metabisulfitul de potasiu. Această caracteristică a fost propusă pentru a reduce concentrația de conservanți în alimente și băuturi; din păcate, aceasta pare să fie o caracteristică neobișnuită deoarece nu este observată pentru *Pkkp*.

Unul dintre principalele probleme în selectarea speciilor non-*Saccharomyces* pe baza aptitudinii lor oenologice este obținerea unei colecții reprezentative de tulpini levuriene ale unei specii specifice. Acest lucru se datorează prezenței mai mari a altor tulpini non-*Saccharomyces* în struguri, cum ar fi genul *Hanseniaspora*, care reprezintă aproximativ 50% din levurile din struguri și este genul predominant în fermentarea mustului atunci când etanolul depășește 4%. Studiile anterioare au rezolvat această problemă prin dezvoltarea de medii selective specifice, cum ar fi cele descrise pentru genul *Schizosaccharomyces* (Benito ș.a., 2020) sau incubarea la temperaturi mai ridicate, cum ar fi cazul lui *L. thermotolerans* (Benito, 2018).

Utilizând aceste metodologii, este relativ ușor să se obțină o colecție reprezentativă de tulpini fără un efort sau o investiție financiară mare. Până în prezent, nu a fost descris niciun mediu selectiv pentru *P. kluyveri*. Prin urmare, cel mai eficient mod de a găsi un număr mare de tulpini ale acestei specii se bazează pe căutarea substratului cel mai potrivit unde această specie este predominantă. *P. kluyveri* se numără printre speciile predominante la măslina și boabe de cafea, ajungând la o frecvență de izolare de aproximativ 17%, respectiv 80% (Domizio ș.a., 2017), în timp ce frecvența la struguri este sub 1%.

Deoarece *P. kluyveri* prezintă diferiți factori killer, tulpinile selectate nu pot avea un efect antagonist asupra tulpinii fermentative *S. cerevisiae*, deoarece această a doua specie este necesară pentru a încheia corespunzător orice proces de fermentare în combinație cu *P. kluyveri*. De aceea, orice efect negativ asupra *Saccharomyces* nu ar compensa alte îmbunătățiri ale calității.

Principala aplicație a *P. kluyveri* în vinificație se bazează pe capacitatea sa de a elibera tioli și de a produce esteri fructați sau florali. Din acest motiv, primul criteriu de selecție trebuie să fie prezența enzimelor precum liaza și glicozidaza, care îmbunătățesc aromele varietale pentru a crește calitatea varietăților terpenice la vinuri precum Muscat și varietăților tiolice la vinuri precum Sauvignon blanc, Riesling și Verdejo. Acest proces de selecție a avut succes anterior și pentru alte specii non-*Saccharomyces*, cum ar fi *T. Delbrueckii*, *M. Pulcherrima* și *L. thermotolerans*. În plus, selecția tulpinilor capabile să producă concentrații ridicate de esteri fructați, cum ar fi acetatul de izamil și octanoatul sau esterii florali, cum ar fi acetatul de 2-pentil-etil, ar fi de mare interes în producerea vinurilor din soiuri neutre de struguri precum Airén și Ugni blanc, unde aromele varietale au un impact redus asupra buchetului final (Benito ș.a., 2016).

Producția de alcooli superiori trebuie controlată pentru a fi cât mai mică posibil pentru a evita orice efect de mascare asupra aromelor varietale și pentru a crește impactul acestora cât mai mult posibil. Trebuie să existe același obiectiv și pentru acizii grași, în special acidul izovaleric, care este descris ca având niveluri mai mari în fermentațiile care implică *P. kluyveri*. În plus, deși *P. kluyveri* este descris ca producând mai puțin acetaldehidă decât alte non-*Saccharomyces*, parametrul trebuie verificat în timpul procesului de selecție pentru a evita aromele oxidante nedorite. Eliberarea de aminoacizi precum tirozina și lizina, care sunt capabili să evolueze în amine biogene precum tiramina și cadaverina, trebuie redusă cât mai mult posibil în timpul procesului de selecție .

2.11 Procese de tratare fizică - mecanică

2.11.1 Procese termice

Tratamentele termice precum pasteurizarea și sterilizarea sunt eficiente pentru a inactiva microorganismele nedorite și enzimele oxidative, sunt des utilizate

în industria alimentară. Tratamentele termice pentru procesele de vinificație sunt foarte importante pentru calitatea vinurilor. Chiar dacă nu pot să substituie toate funcțiile, pot fi complementare pentru a înlocui efectul SO₂ în combinație cu alte tehnici alternative. Aceste tehnologii considerate individual și în asocieri prezintă potențial nu doar pentru sterilizare dar și extragerea antocianilor și altor compuși polifenolici din struguri și transferul la vin în procesele de macerație – fermentație (El Darra ș.a., 2013)

Mediile criogenice sunt o altă alternativă pentru inactivarea enzimelor și inhibarea microorganismelor patogene. Imersarea rece (cold soak) și înghețarea masei de struguri s-au inclus în aceeași evaluare. Totodată s-a realizat contribuția metodei la extractabilitatea fenolilor și ruperea celulelor ce conțin tanin din semințe, în timp ce imersarea rece prezintă un efect mai slab în raport cu înghețarea. Această metodă s-a raportat ca fiind utilă în cedarea antocianilor datorită ruperii pereților bobitelor de strugure (Ševcech ș.a., 2015). Din aceste motive, aplicarea acestei tehnici pe struguri sau must ar putea elimina o anumită degradare microbiologică a vinurilor și astfel combinarea cu alte tehnici ajută la reducerea concentrației de SO₂ în vinificație.

2.11.2 Procese care nu implică tratamente termale.

Principala caracteristică a acestor tehnologii, este determinată de faptul că nu cauzează un efect asupra modificărilor de culoare, miros, gust și de calitate a vinurilor. În vinificație, procesele non-termice cum ar fi presiunea hidrostatică, câmpul electric pulsant, ultrasunete și iradierea UV sunt cele mai utilizate. Aceste tehnologii prezintă efecte pozitive asupra calității vinurilor

2.11.3 Presiune hidrostatică ridicată

Presiunea hidrostatică ridicată (PHR) este o metodă de inhibare a microorganismelor și inactivare a enzimelor prin aplicarea unor presiune cuprinse între 200-800 MPa. S-a demonstrat că tratamentele pe bază de presiune influențează proprietățile fizico-chimice și senzoriale ale vinului și mustului. Din acest motiv, metoda poate fi aplicată doar pentru vinurile tinere. Studiile curente au demonstrat efectul aplicării tehnicii și modul cum produce modificarea compușilor aromatici și a caracteristicilor de calitate și senzoriale ale vinurilor tinere. S-a considerat că presiuni mai mari de 650 mPa aplicate pentru perioade lungi de timp afectează culoarea vinului roșu și produce descreșterea conținutului fenolic.

Studiile actuale au demonstrat efectul aplicării PHR și modul în care aceasta modifică compușii de aromă, precum și caracteristicile senzoriale și calitative ale vinurilor tinere (Briones-Labarca ș.a., 2017).

În alt sens, Briones-Labarca ș.a., (2017) au arătat că tratamentul PHR nu a afectat parametrii fizico-chimici precum conținutul total de fenoli și flavonoizi ai

vinului alb. De asemenea, proprietățile senzoriale, cum ar fi gustul, mirosul și calitatea generală, nu au fost afectate de procesul PHR la 300 MPa. Există multe rapoarte care arată că aplicarea PHR poate fi utilizată pentru a inactiva microorganismele nedorite din vin și must, cum ar fi bacteriile acidului acetic, bacteriile lactice, mucegaiurile și drojdiile, oferind în același timp contribuții pozitive la calitatea vinului (Buzrul, 2012).

2.11.4 Ultrasunete de mare putere

Aplicarea ultrasunetelor este o metodă care inhibă microorganismele din produsele alimentare prin utilizarea undelor sonore (> 14-16 kHz). În prezent, există multe tipuri de cercetări privind potențialul de utilizare a tehnologiei UMP în vinificație. Ca alternativă la SO₂, UMP poate fi utilizat pentru a controla deteriorarea vinului. Tehnologia UMP a fost utilizată cu succes pentru inactivarea levurii *S. cerevisiae* în suc de struguri roșii (Barbosa-Cánovas, 2012). Rezultatele au indicat faptul că aplicarea UMP nu a provocat modificări în cantitatea de antociani din suc de struguri. Jiranek ș.a., (2008) au sugerat că tehnologia HPU ar putea fi utilizată pentru inactivarea microorganismelor nedorite fără a schimba culoarea și gustul vinului.

În unele studii s-a investigat că efectul UMP în tratamentul cu flux continuu are un efect asupra reducerii numărului de levuri *Brettanomyces* și bacterii lactice (LAB) în vinuri. Gracin ș.a., (2016) au examinat levurile și bacteriile lactice pentru susceptibilitate la aplicarea UMP utilizând un sistem cu ultrasunete (400 W, 24 kHz) la două temperaturi diferite ale vinului (30 și 40 ° C). Aplicarea UMP în flux continuu duce la reducerea satisfăcătoare a levurilor *Brettanomyces* (89.1-99.7%) și a bacteriilor lactice (71.8-99.3%).

2.11.5 Iradierea Ultra-violet

Iradierea UV este una dintre tehnicile de inactivare a microorganismelor din produsele alimentare lichide. Această practică poate fi aplicată pentru a reduce sau chiar a elimina utilizarea SO₂ ca și conservant în vinificație prin utilizarea radiațiilor cu o lungime de undă de 100-400 nm. Iradierea UV a inhibat cu succes microorganismele din suc de struguri roșu și alb. De asemenea, nu a provocat modificări semnificative în parametrii calității sucului de struguri (Pala și Toklucu, 2013).

A fost investigat efectul iradierii UV, ca o tehnologie alternativă pentru inactivarea microorganismelor în suc de struguri și vin. Fredericks și Krügel (2011) au studiat metoda pe vinuri albe și roșii produse din struguri Chardonnay și Pinotage, sucuri de struguri roșii și albe produse din struguri Shiraz și Savignon Blanc și au reușit să inhibe acidul lactic și bacteriile acidului acetic utilizând tehnologia UV la 254 nm.

2.11.6 Tehnologie de câmp electric pulsat

Câmpul electric pulsat este o altă metodă care inhibă microorganismele din produsele alimentare. În această metodă, impulsurile electrice sunt aplicate produsului pentru o perioadă scurtă de timp (μsec) plasată între o serie de electrozi (intensitatea efectului până la 70 kV/cm). CEP a fost testat pe scară largă în vinificație în comparație cu tehnologiile UMP și UV. Garde-Carden ș.a., (2008) au demonstrat că tehnologia CEP ar putea fi o alternativă pentru reducerea SO_2 în must și vin. De asemenea, Abca și Evrendilek (2015) demonstrează că CEP are potențial pentru procesarea vinului roșu fără a afecta negativ caracteristicile cheie ale vinurilor.

În ceea ce privește aplicarea CEP pentru inactivarea levurilor în vinul alb dulce, rezultatele au fost comparate cu datele obținute în cazul metodei ce utilizează descărcări electrice de înaltă tensiune (DEIT) (Delsart ș.a., 2015). Inactivările maxime obținute cu CEP și DEIT au fost de $\log 3$ și respectiv $\log 4$. Cu toate acestea, casarea vinului a fost mai puțin pronunțată pentru probele tratate cu CEP comparativ cu tratamentele DEIT și SO_2 . CEP pare a fi o tehnică alternativă mai adecvată pentru adăugarea de sulfuri.

Avantajele utilizării tehnologiei CEP în vinificație au fost raportate ca reducând timpul de macerare și crescând nivelele de compuși fenolici (Puertolas ș.a., 2011). Pe de altă parte, s-a observat intensitatea culorii la vinurile roze și s-a concluzionat că cantitatea de antociani și indicele total de polifenoli au fost mai mici decât în cazul vinurilor pentru care tehnica CEP nu s-a aplicat. Aplicarea CEP după fermentația vinului roșu a determinat caracteristici de culoare mai bune cu un conținut fenolic mai mare. S-a susținut, de asemenea, că CEP ar putea afecta maturarea vinurilor. În ceea ce privește efectele pozitive ale tratamentului cu PEF, studiile au arătat că acesta a cauzat o creștere a intensității culorii și nu a fost modificată calitatea vinului organoleptic.

3 CADRUL ORGANIZATORIC ȘI INSTITUȚIONAL

3. THE ORGANIZATIONAL AND INSTITUTIONAL FRAMEWORK

3.1 Descrierea Centrului de Cercetări pentru Oenologie "Valeriu D. Cotea"

Centrul de Cercetări pentru Oenologie "Valeriu D. Cotea" din Iași este o instituție de cercetare și dezvoltare în domeniul viticulturii și oenologiei, situată în orașul Iași, România. A fost numit în onoarea profesorului Valeriu D. Cotea, un eminent oenolog român, care a adus contribuții semnificative în dezvoltarea viticulturii și vinificației în țară.

Centrul de Cercetări pentru Oenologie "Valeriu D. Cotea" este afiliat Institutului Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație (ICDVV) și funcționează ca o entitate de cercetare separată în cadrul institutului. Are ca obiectiv principal realizarea de studii și cercetări în domeniul viticulturii și oenologiei, în vederea îmbunătățirii calității și eficienței vinificației.

Printre principalele activități desfășurate de Centrul de Cercetări pentru Oenologie se numără cercetarea asupra soiurilor de struguri autohtone și introducerea de soiuri noi, studiul tehnicilor de cultivare și îngrijire a viței-de-vie, optimizarea proceselor de vinificație, cercetare asupra factorilor care influențează calitatea și stabilitatea vinului, precum și dezvoltarea de metode și tehnologii inovatoare în industria vinicolă.

Centrul colaborează cu producători de vin din regiune și din întreaga țară, oferindu-le consultanță și sprijin în implementarea noilor tehnologii și bune practici în domeniul viticulturii și oenologiei. De asemenea, organizează evenimente și programe de formare profesională pentru specialiștii din industria vinicolă și participă activ la conferințe și expoziții naționale și internaționale în domeniu.

Prin activitățile sale de cercetare și transfer de cunoștințe, Centrul de Cercetări pentru Oenologie "Valeriu D. Cotea" contribuie la dezvoltarea și promovarea sectorului viti-vinicol din România, aducând beneficii atât producătorilor de vin, cât și consumatorilor.

La baza activității Centrului de Cercetări pentru Oenologie sunt evaluările și studiile pentru tehnologii caracteristice industriei vinicole; În acest context s-au dezvoltat și inclus metode noi de vinificație pentru dezvoltarea conceptelor de procesare a strugurilor, managementul mustului și tehnici de fermentație – macerație.

La nivelul monitorizării viei s-au dezvoltat proiecte pentru combaterea integrată a dăunătorilor viței de vie, în corelație cu studiul impactului pesticidelor asupra proceselor fiziologice și biochimice din plantă și a remanenței lor în produsele viti-vinicole.

Un alt capitol important este legat de cercetări biochimice și tehnologice pentru precizarea celor mai adecvate mijloace de maturare și stabilizare a vinurilor în urma aplicării unor tratamente de condiționare.

Dotarea Centrului de Cercetări pentru Oenologie "Valeriu D. Cotea" este dezvoltată pentru dezvoltarea tuturor tehnicilor și metodelor care elucidează complexitatea vinului.

În cadrul centrului s-au dezvoltat și validat metode spectrofotometrice, cromatografice pentru mai multe proiecte pentru determinarea compușilor activi în probe de vin în diverse faze tehnologice. În acest context s-a monitorizat comportamentul substanțelor cu caracter activ pe perioada de evoluției fizice și chimice.

Cele mai performante metode utilizate au folosit analize de spectrometrie de masă cu diferite tipuri de experimente (monitorizare cu un singur ion, reacție selectivă, scanare completă, excludere neutrilor). În evaluarea spectrelor s-au folosit mai multe experimente pentru a exclude aducții precum și optimizarea condițiilor de ionizare pentru a evita fragmentarea accidentală în sursele de ionizare, optimizarea parametrilor de fragmentare în celulele de coliziune și evaluarea spectrelor caracteristice.

Un capitol important este legat de cercetări asupra modificărilor profilului antocianilor din vinurile roșii.

Tehnicile de tip spectrometrie de masă de tip triplu-quadrupol cuplate cu cromatografie de lichide s-au aplicat cu precădere pentru compuși din vinuri de tip amino-acid și amine biogene. Tehnica cromatografică a permis separarea și identificarea a unui număr de 22 de amino-acizi prin analiză directă fără alte etape de pre-tratare a probelor. S-a realizat corelarea între diverse clase de compuși prin includerea în fluxuri de formare ca o consecință a tratamentelor și abordărilor propuse în design-ul studiilor specifice.

Utilizarea tehnicilor de tip gaz cromatografic cuplate cu detecție convențională de tip ionizare în flacără, sau spectrometrie de masă a permis determinarea de substanțe volatile din vinurile incluse în studiile de cercetare. S-au dezvoltat abordări pentru evaluarea compușilor de tip terpene, tioli, alcoolii superiori și acizi volatili și esteri aromatici.

Experiența în ceea ce reprezintă aplicarea analizelor instrumentale și spectrofotometrice a permis extinderea abordărilor în funcție de tipul de matrice analizată. În aceste situații s-au inclus metode alternative de pregătire a probelor prin tehnici de curățare online pe coloane cromatografice dispuse în configurații de tip mod focus și respectiv configurații de eluție rapidă. Alte abordări importante pentru analiza probelor analitice au constat în metode de curățare offline, concentrare și transfer în solvenți corespunzători tipului de analiză.

3.2 Cadru natural și particularități geologice ale Podgoriei Panciu

Podgoria Panciu este cea mai nordică dintre podgoriile regiunii geografice de la exteriorul curburii Carpato-Subcarpatilor, având ca și coordonate de localizare zona limitată de paralelele 45°50' și 46°06' lat. nordică și de meridianul de 27°10' long. estică. Ca și identificare a coordonatelor menționate, Podgoria Panciu este cuprinsă între văile Trotuș și Putna pe o distribuție N-S pe o suprafață de 30 km lungime și o lățime medie de 7.5 km. La evaluarea tipurilor de plantații, se remarcă faptul că plantațiile viticole reprezintă între 20 – 60% din toată suprafața agricolă.

În spațiul ei s-au conturat următoarele 3 centre viticole cu zonele proprii:

- *Panciu (Panciu, Crucea de Sus, Crucea de Jos, Străoani, Neicu, Văleni, Satu Nou, Dumbrava, Mănăstioara, Ciolănești, Fitionești, Răzoare ș.a.);*
- *Tițești (Oleșești, Tițești, Sârbi, Clipicești, Vitănești, Bătinești);*
- *Păunești (Movilița, Diocheți, Troțușanu, Păunești, Viișoara, Pufești, Ruginești).*

Substratul litologic din regiunea Panciu este compus în principal din formațiuni sedimentare, cu o varietate de tipuri de roci prezente. Printre cele mai importante tipuri de roci întâlnite se numără:

- Marne și șisturi argiloase formate din depuneri de argilă și materie organică cu un conținut ridicat de substanțe minerale și nutrienți, care pot influența fertilitatea solului și capacitatea acestuia de a susține creșterea sănătoasă a viței de vie.
- Calcare care prezintă variații în structură și compoziție, cu influență asupra pH-ului solului și capacitatea acestuia de a reține apa și substanțele nutritive.
- Nisipuri și gresii, roci care pot avea un impact asupra drenajului solului și pot contribui la crearea unui mediu mai permeabil pentru rădăcinile viței de vie.

Această diversitate litologică a regiunii Panciu reprezintă marele avantaj pentru dezvoltarea viticulturii, deoarece oferă o varietate de soluri și condiții favorabile dezvoltării strugurilor. Acest lucru poate contribui la obținerea de vinuri cu profil aromatic și gustativ distinct, reflectând caracteristicile unice ale terroir-ului.

Climatic, teritoriul se include în zonă temperată continentală, dar prezintă specificitate datorită influențelor est-europene cu temperaturi medii anuale de 9.5 °C. Valorile medii caracteristice lunare moderate ale acestui areal sunt de 24°C. Cantitatea de precipitații medie este cuprinsă între 500 – 600 L/m² sub valoarea evotranspirației solului, iar acest deficit de umiditate este corespunzător pentru vița de vie. În completare, nivelul mediu al radiației totale este de 120-125 kcal/cm², corespunzător unei durate de strălucire solară de 2100 ore fapt ceea ce constituie condiții favorabile pentru calitatea produselor acestei podgorii (Bucur, 2011).

3.3 Particularități ale soiurilor cultivate

Condițiile eco-climatice care prezintă un caracter variat puternic pronunțat a determinat diversificarea soiurilor cultivate în acest areal. În acest context soiurile care sunt cultivate sunt cele caracteristice vinurilor de calitate albe precum și celor destinate consumului curent. Conform Olteanu ș.a., 2002 sunt recomandate soiurile Fetească albă, Pinot gris, Sauvignon și recomandate Fetească regală și Riesling italian. În ceea ce privește categoria vinurilor roșii de calitate sunt recomandate Fetească neagră, Pinot noir și Merlot.

O evaluare actualizată este efectuată de Oficiul National al Vei și Produselor Vitivinicole care autorizează soiurile de struguri ce pot fi cultivate în Podgoria Panciu pentru a produce vinuri de origine controlată .

- Vinuri albe liniștite: Aligoté, Băbească gri, Chardonnay, Crâmpoșie, Crâmpoșie selecționată, Fetească albă, **Fetească regală**, Frâncușă, Mustoasă de Măderat, Pinot gris, Riesling de Rhin, Riesling Italian, Sauvignon, Galbenă de Odobești, Plăvaie, Traminer aromat, Traminer roz, Furmint;
- Vinuri roșii/roze liniștite: Fetească neagră, **Cabernet Sauvignon**, Merlot, Pinot noir, Băbească neagră, Burgund mare, Codană, Cadarcă, Negru aromat, Portugais bleu, Arcaș.
- Vinuri liniștite aromate: Șarba, Muscat ottonel, Tămâioasă românească;
- Vinuri spumante: Plăvaie, Aligoté, Muscat ottonel, Tămâioasă românească, Fetească albă, **Fetească regală**, Chardonnay, Sauvignon, Pinot gris, Riesling de Rhin, Riesling italian, Băbească neagră, Merlot, Fetească neagră, Pinot noir.

3.3.1 Fetească regală

Fetească regală este o varietate de struguri cultivată și în Podgoria Panciu, situată în regiunea viticolă Vrancea din România. Această regiune viticolă se remarcă prin particularități climatice și terroir distincte, care influențează caracteristicile vinurilor obținute din acest soi.

La nivel de aspect și compoziție, strugurii Fetească regală sunt de dimensiuni medii până la mari, având boabe rotunde și compacte. Aceștia prezintă o culoare galben-verzuie până la galben-aurie, iar coaja este subțire și ușor lucioasă. Strugurii pot avea o concentrație bună de zahăr, aciditate moderată și niveluri variabile de substanțe aromatice (Slave, 2021).

Aroma și gustul strugurilor de Feteasca regală se remarcă prin notele lor intense și complexe. Acestea includ note de flori albe, flori de tei, fructe exotice, mere verzi, pere și uneori nuanțe subtile de condimente. Gustul strugurilor poate fi caracterizat ca fiind proaspăt, echilibrat și uneori ușor muscat (Focea. ș.a., 2012).

Potențial de vinificare: Strugurii Fetească regală au un potențial ridicat în producția de vinuri de calitate. Datorită aromei lor expresive și a compoziției

echilibrate, aceștia pot fi utilizați pentru a obține vinuri seci, demiseci și chiar vinuri spumante. Vinurile Fetească regală pot dezvolta o bună structură, finețe și complexitate cu maturarea adecvată (Popescu ș.a., 2017).

Profilul aromatic pentru Feteasca regală evidențiază aromele sale florale și fructate, care includ note de flori albe, citrice, mere verzi, pere și piersici. Aceste caracteristici aromatice sunt asociate cu soiul Feteasca regală cultivat în diferite regiuni viticole, inclusiv în Podgoria Panciu. În ceea ce privește aciditatea și prospețimea, vinurile obținute din Feteasca regală cultivată în Podgoria Panciu se evidențiază prin aciditatea vioaie și prospețimea lor. Această aciditate bine echilibrată contribuie la structura și finețea vinului, oferindu-i o notă revigorantă și plăcută (Antoce și Cojocaru, 2021).

Potențial de maturare: Unele vinuri Feteasca Regală din Podgoria Panciu pot avea un potențial de maturare, dezvoltând complexitate și evoluând în timp. Cu maturizarea, aceste vinuri pot dezvolta arome mai bogate și un echilibru mai fin între arome și structura vinului. Din punct de vedere a terroir-ului și influența climatică, Podgoria Panciu oferă un terroir distinct, cu soluri variate și influențe climatice specifice. Acest terroir poate contribui la caracteristicile unice ale vinurilor Fetească regală din regiune. În particular, expunerea la soare, precipitațiile moderate și temperaturile favorabile din Podgoria Panciu pot influența dezvoltarea strugurilor și expresia lor în vin (Popa și Trutulescu, 2010).

Perla delicat și aspect vizual: Feteasca regală Frizzante din Podgoria Panciu se caracterizează prin prezența unui perla delicat, care constă într-un flux constant de bule fine și persistente în pahar. Acest aspect vizual adaugă un farmec și o vivacitate aparte vinului. Vinul Fetească regală Frizzante din Podgoria Panciu oferă arome fructate delicate și proaspete. Acestea pot include note de fructe roșii, cum ar fi căpșuni, zmeură și cireșe, însoțite de nuanțe florale subtile. Gustul este revigorant, cu o aciditate plăcută și un echilibru armonios între dulceață și prospețime (Ghita ș.a., 2013).

3.3.2 Cabernet Sauvignon

Strugurii Cabernet Sauvignon, ca aspect și compoziție, sunt de dimensiuni medii până mari, având boabe rotunde și dense. Aceștia prezintă o culoare închisă, de obicei violet sau purpuriu intens. Coaja strugurilor este groasă și rezistentă, contribuind la extracția compușilor de culoare și a taninurilor. Cabernet Sauvignon are de obicei concentrații ridicate de zahăr și taninuri, precum și o aciditate moderată. Din punct de vedere a aromelor și gustului, Cabernet Sauvignon se remarcă prin aromele sale complexe și intense. Acestea pot include note de fructe negre, cum ar fi coacăzele negre și cireșele negre, mure, prune și uneori nuanțe subtile de piper negru, mentă sau lemn de stejar. Gustul strugurilor este adesea caracterizat de o structură puternică, taninuri ferme și o notă ușor astringentă (Vișan ș.a., 2012).

Din punct de vedere a potențialului de vinificare, Cabernet Sauvignon este un soi recunoscut pentru potențialul său în producția de vinuri de calitate superioară. Strugurii Cabernet Sauvignon din Podgoria Panciu pot fi utilizați pentru a obține vinuri roșii seci, structurate și complexe. Aceste vinuri pot beneficia de maturare în sticle, dezvoltând arome mai bogate și taninuri mai moi cu timpul.

Profilul aromatic și gustativ pentru vinurile Cabernet Sauvignon din Podgoria Panciu se caracterizează prin arome intense și complexe. Acestea includ note de fructe negre, cum ar fi coacăzele negre, murele și cireșele negre, împreună cu nuanțe subtile de condimente, mentă, vanilie și lemn de stejar. Gustul vinului este adesea puternic, cu taninuri ferme și o structură robustă. Structura este puternică și sunt caracterizate și de un corp solid. Taninurile prezente în vin conferă textură și persistență, contribuind la potențialul de maturare și evoluție în sticlă. Această caracteristică permite vinului să dezvolte complexitate și armonie pe măsură ce se maturează.

Potențialul de maturare al vinurilor Cabernet Sauvignon din Podgoria Panciu este caracterizat de capacitatea de maturare în sticlă și baric. Cu timpul, acestea pot dezvolta arome și atribute mai complexe, iar taninurile se pot integra în mod armonios în structura vinului. Vinurile mature Cabernet Sauvignon pot oferi o experiență de degustare profundă și sofisticată (Popescu ș.a., 2014).

PARTEA A II A CONTRIBUȚII PERSONALE
PART II PERSONAL CONTRIBUTIONS

4 SCOPUL ȘI OBIECTIVELE CERCETĂRII, MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

4. RESEARCH PURPOSE AND OBJECTIVES, RESEARCH MATERIAL AND METHOD

Vinurile fără adaos de sulfiți (SO_2) au devenit o tendință din ce în ce mai populară în lumea vinificației, pe măsură ce consumatorii caută opțiuni mai naturale și mai sănătoase. Aceste vinuri sunt produse fără adăugarea sau utilizarea dioxidului de sulf în timpul procesului de vinificație.

Scopul studiului este producerea, monitorizarea evoluției și calității vinurilor Cabernet Sauvignon și Fetească regală fără conținut de dioxid de sulf adăugat și vinificate în diverse variante tehnologice specifice tipului de vin realizat. În acest context s-a urmărit adaptarea a 4 variante care acoperă cele mai importante categorii din punct de vedere a interesului și actualizărilor tehnologice și științifice în domeniul viticulturii și enologiei.

Alternativele tehnologice sunt adaptări ale tehnologiilor vinificație ale vinurilor roșii și roze aplicate pentru Cabernet Sauvignon. În ceea ce privește soiul Fetească regală, pentru dezvoltare, s-au urmărit variante tehnologice pentru vinurile seci liniștite și respectiv pentru vinurile frizzante cu a doua fermentație în sticlă sau prin metoda Charmat.

Punctele cheie ale studiului sunt concentrate pe etapele principale de vinificație adaptate la substituirea dioxidului de sulf ca antioxidant și conservant în etapele esențiale ale vinificației și maturării vinurilor. Astfel substituția cu specii non-*Saccharomyces* precum *Pichia Kluyvery* s-a dovedit a fi esențială pentru acest scop în faza inițială de tratare a strugurilor.

Un al doilea punct cheie în substituția SO_2 a fost desăvârșirea metodelor de protecție antioxidantă prin utilizarea produselor oenologice care s-au dovedit a avea un caracter protectiv la fel de eficient ca și SO_2 dar care prezintă trasabilitate și surse certificate pentru utilizare în vinuri fără adaos de sulfiți.

Pentru studierea influenței unor produse oenologice la calitatea vinurilor albe, rosé și roșii fără adaos de dioxid de sulf în comparație cu vinurile convenționale s-au fixat câteva obiective științifice:

- analiza principalilor parametri de compoziție fizico-chimică a vinurilor obținute din soiurile Cabernet Sauvignon și Fetească regală în timpul proceselor de vinificație dar și după definitivarea metodelor de vinificație;
- analiza unor compuși volatili de aromă din categoria alcoolilor superiori și esterilor cu un caracter important în desăvârșirea fermentației, evoluției și menținerea caracterului de tipicitate;

- identificarea, determinarea și cuantificarea aminoacizilor și aminelor biogene în vederea caracterizării vinurilor și stabilirii influenței pe care o au asupra vinurilor;
- analiza parametrilor cromatici ale vinurilor elaborate în vederea stabilirii influenței pe care o are etapa de maturare pe levuri.

5 TEHNOLOGIILE APLICATE PENTRU PRODUCEREA VINURILOR INCLUSE ÎN STUDIU

5. THE TECHNOLOGIES APPLIED FOR THE PRODUCTION OF THE WINES INCLUDED IN THE STUDY

Tehnologiile aplicate conțin o serie de etape care sunt comune ambelor metode propuse în cadrul studiului. Etapele s-au diferențiat pe zone de activitate diferită în funcție de scopul și de randamentele de lucru.

În sinteză, s-a propus vinificația după tehnologia clasică de vinificație a vinurilor seci albe, tehnologia de vinificație pentru vinuri frizzante cu a doua fermentație în sticlă sau după principiile metodei Charmat, tehnologia de producere a vinurilor roze și respectiv pentru vinuri roșii seci.

Pentru vinurile fără adaos de dioxid de sulf, tehnologiile de producere au implicat etape din tehnologiile clasice de vinificație, dar la care s-au adaptat tratamentele strugurilor, etapele de fermentație precum și modificări ale etapelor de tratament în vederea asigurării condițiilor de sterilitate și a condițiilor anti-oxidante.

5.1 Tehnologia de vinificație a vinurilor albe liniștite din soiul Fetească regală

S-au produs 2 tipuri de vin:

- Fetească regală fără adaos de dioxid de sulf (FR0)
- Fetească regală cu adaos de dioxid de sulf (FR1)

Procesul este prezentat în fig. 5.1 și debutează cu etapa de evaluare a strugurilor pentru cules care s-a realizat la maturitate deplină și a respectat regula pentru vinuri de origine controlată astfel că conținutul de zahăr a fost de 192 g/L. Transportul și transferul s-a efectuat cu respectarea regulilor de curățenie și sanitizare, astfel că următoarea etapă de tratament a strugurilor a constat în tratarea acestora utilizând specia *Pikia Kluyveri* în produsul comercial Frootzen® (Frootzen® – first ever *Pichia kluyveri* yeast (chr-hansen.com, 2019)) care s-a adăugat în doze de 1.3 kg/tona de struguri. În cazul vinurilor destinate producerii după metoda clasică, tratamentul a constat în utilizarea unui amestec format din metabisulfid de potasiu (6g/100kg struguri), acid ascorbic (3g/100kg struguri) și tanin galic (1g/100kg struguri).

Etapa de prelucrare preliminară a constat în desciorchinare și zdrobire a strugurilor cu separarea mustului ravac. Presarea boștinei s-a efectuat în prese discontinui pneumatice, iar mustul de presa I și mustul ravac au fost asamblate și s-au supus unui proces de deburbare la temperaturi de aproximativ 15°C, în prezența enzimelor pectolitice de tip Vinoxym® FCE G (2 g/hL) (Vinoxym® FCE G |

Novozymes, 2019). Flotația ulterioară s-a efectuat prin adaos de bentonită în doze de 40 g/hL, procesul fiind menținut într-un interval cuprins de până la 8 ore.

Etapa de fermentație alcoolică s-a produs în prezența de promotori de fermentație de tip Nutricel Start® (Nutricell® Start - Martin Vialatte, 2019) în doze de 25 g/hL, iar menținerea s-a efectuat utilizând Nutricel Initial® (Nutricell® Initial - Martin Vialatte, 2020) (25 g/hL) inoculat la 7 zile după începutul fermentației. Ambele produse conțin levuri autolizate, diferența dintre Nutricel Start® și Nutricel Initial® constând în difosfatul de diamoniu și conținutul suplimentar de tiamină. Tiamina este necesară pentru fazele de inițiere ale fermentației alcoolice pentru multiplicarea levurilor fermentative, în timp ce substraturile autolizate oferă necesarul de aminoacizi, vitamine pentru metabolismul levurian. Implicarea Nutricel Start® s-a dovedit importantă datorită conținutului ridicat de diamino-fosfat, levuri inactivate, autolizate și pereți levurieni care sunt surse importante pentru azotul disponibil pentru fermentație. Levurile autolizate și inactivate sunt în schimb surse de aminoacizi care sunt asimilați de levurile active. Sursa de aminoacizi este foarte importantă pentru menținerea fermentației alcoolice chiar în condițiile unor fluctuații de temperatură .

În cazul probelor Fetească regală fără adaos de dioxid de sulf (FR0), fermentația alcoolică s-a realizat în prezență de *S. Cerevisiae*, din produsul Bella - Renaissance Yeast (Bella - Renaissance Yeast, 2023) cu caracteristici speciale pentru vinurile albe. La inițierea fermentației, aciditatea a fost de 5.5 g/L acid tartric și zahăr rezidual de 191 g/L. Doza aplicată a fost de 20 g/L, iar fermentația s-a considerat finalizată într-un termen de aproximativ 40 de zile, moment în care s-a efectuat pritozul simplu. Caracteristicile fizico-chimice ale vinului au fost de 5.57 g/L acid tartric, corecția s-a efectuat în intervalul 6.1 – 6.3 g/L echivalent acid tartric, iar valoarea zahărului rezidual a fost de 1.5 g/L.

În etapa fermentativă, pentru eșantioanele fără dioxid de sulf adăugat s-a efectuat fermentație malolactică în prezență de bacterii lactice (*Oenococcus oeni*) cu rol în creșterea acidității totale, inocularea efectuându-se în condițiile în care pH > 3.2, alcool <16% și SO₂ lipsă.

Etapa de vinificație a continuat cu activități de îmbunătățire structură, dar și menținerea protecției antioxidante prin folosirea taninului galic în doze de 6.5 g/hL și corecția de aciditate cu acid lactic până la valori echivalente de 6.1 – 6.3 g/L acid tartric.

Înainte de îmbuteliere s-a efectuat un tratament aromatic și o protecție antioxidantă suplimentară utilizând un amestec de tanin galic și taninuri condensate cu rol și de eliminare a proteinelor instabile. Doza utilizată a fost de 4g/hL.

Stabilizarea tartrică a constat în utilizarea unui produs oenologic pe bază de poliaspartat de potasiu și polizaharide din plante, în doză de 20 ml/hL.

Fermentația pentru Fetească regală cu dioxid de sulf (FR1) s-a produs în aceleași condiții, dar în prezență de *S. Cerevisiae* din produsul Vivace® (Vivace - Renaissance Yeast, 2019), în aceleași doze. Aciditatea totală a apropiată ca în cazul probelor anterioare, în schimb zahărul rezidual a fost de 219 g/L. În urma finalizării fermentației alcoolice după un interval de aproximativ 20 de zile, aciditatea s-a corectat la valori de 6.3 g/L echivalent acid tartric, zahărul rezidual a fost de 2.3 g/L, iar tăria alcoolică de 13.5%.

Tratamentul vinului după fermentație a constat în primă fază într-o corecție a dioxidului de sulf prin adaos de soluție SO₂ până la valoarea de 40 mg/L, dar și suplimentare antioxidantă prin adaos de acid ascorbic de până la 20 mg/L dar și un amestec de taninuri de tip Querca-Tan MK® ce conține galotaninuri, elagitaninuri și compuși obținuți din degradarea termică a ligninei și a hemicelulozei care conferă notele organoleptice tipice derivate de obicei din maturarea în baric. (Querca-Tan MK – ATPGroup, 2023).

Corecția de aciditate s-a efectuat tot în intervalul 6.1 – 6.3 g/hL acid tartric, dar a fost necesară o reducere a conținutului de polifenoli prin utilizarea polivinilpolipirrolidonă (15 g/hL), iar stabilizarea tartrică a fost mai complexă prin utilizarea de carboximetil celuloză și guma arabică, ambele în doze de 100 g/hL.

Având în vedere valorile zahărului rezidual de 2.3 g/L, s-a efectuat o corecție de zahăr până la 10 g/L prin utilizarea de must concentrat rectificat, iar în final s-a efectuat protecția antioxidantă prin completarea conținutului de acid ascorbic 20 mg/L și respectiv soluție de SO₂ în doze de 40 mg/L, asocierea fiind în corelație cu practica curentă (Cotea ș.a., 2015). Sinteza este prezentată în fig. 5.1.

5.2 Tehnologia de vinificație a vinurilor albe frizzante din soiul Fetească regală

Fetească regală Frizzante a avut la bază metodele clasice de vinificație cu fermentație în sticlă cu cele 2 etape importante și anume producerea vinului de bază și etapa de producere a vinului frizzante propriu-zis.

S-au produs 2 tipuri de vin:

- Fetească regală frizzante fără adaos de dioxid de sulf (FRF0)
- Fetească regală frizzante cu adaos de dioxid de sulf (FRF1)

Pregătirea strugurilor s-a efectuat și cu respectarea condițiilor pentru producerea vinului de calitate superioară, tratamentul inițial în vederea protecției biologice și anti-oxidante a parcurs aceleași etape cu adaos de levuri non-saccharomyces de tip *Pichia Kluyveri* (1.3 kg/t struguri) la Fetească regală Frizzante fără adaos de dioxid de sulf (FRF0), iar pentru Fetească regală Frizzante cu adaos de dioxid de sulf (FRF1), s-a utilizat același amestec de metabisulfid de potasiu (6.0 g/100kg struguri), acid ascorbic (3.0 g/100 kg struguri) și tanin galic (1.0 g/100 kg

struguri). Etapa de pregătire a mustului în vederea fermentației alcoolice și respectiv malolactice pentru varianta fără SO₂ adăugat a fost similară cu Feteasca regală liniștit.

Prima diferență a constat în etapa fermentativă. De principiu, a urmat aceeași strategie de lucru constând în fermentație alcoolică pentru FRF1 și fermentație alcoolică și fermentație malolactică pentru FRF0.

Fermentația alcoolică s-a produs în prezență de Nutricel Start® (25g/hL), dar menținerea s-a efectuat în prezență de Optiesters® (OptiEsters®: Nutrients for your enological solutions | Lamothe-Abiet, 2020) un amestec cu rol de nutrient constând în levuri inactive bogate în aminoacizi și ergosteroli. În etapa de fermentație alcoolică s-a inclus un amestec de cipsuri Incanto Toffee (Incanto Toffee | Oak alternatives | Chips (enartis.com), 2020), de proveniență biologică, ce conține taninuri extrase din stejar, taninuri galice, taninuri condensate cu rol în creșterea capacității antioxidante, astfel că se realizează menținerea aromelor fructate proaspete, stabilizarea culorii și stabilizare proteică.

În cazul probelor care au fost destinate pentru vinificare fără SO₂ adăugat, nutrientul pentru menținerea fermentației a fost FreshArom® (Fresharom® - Produit de levure - Laffort®, 2019) în doze de 25 g/hL, un amestec levuri inactivate care joacă un rol important în biosinteză și cedarea substanțelor antioxidante, cum sunt aminoacizi și tripeptide cu sulf de tip glutation. Utilizarea în faza de fermentație permite levurilor să asimileze precursorii de glutation l-cisteina și N-acetil-cisteina, astfel că se produce creșterea conținutului de glutation din vin. Fermentația alcoolică a beneficiat de un conținut de zahăr rezidual de 190 g/L și aciditate de 5.6 g/L acid tartric. În cazul bazei pentru vinurile frizzante, perioada de fermentație a fost de 40 de zile pentru variantele fără SO₂ adăugat (FRF0) până când zahărul rezidual a avut valoarea de 1 g/L. Varianta de Fetească regală frizzante destinată corecției cu SO₂ a avut un timp de fermentație mai mic, de până la 30 de zile și un conținut de zaharuri final de 2.3 g/hL. Fermentația alcoolică s-a realizat cu levuri *S. cerevisiae* (Bella - Renaissance Yeast) în doze de 20 g/hL, iar la 2 zile după inițierea fermentației s-a făcut co-inocularea cu bacterii lactice (*O. oeni*), mediul având caracteristici similare pentru a asigura transformarea acidului malic în acid lactic.

Conform fig.5.2, pașii ulteriori sunt separarea de pe boștină prin pritic simplu, urmată de o etapă de îmbunătățire structură odată cu aplicare de agent antioxidant la FRF0, activitate efectuată prin utilizarea unui amestec de taninuri EnartisTan Citrus® (EnartisTan Citrus | Tannins | Blends, 2020) în doze de 4 g/hL, dar și EnartisTan Blanc® (EnartisTan Blanc | Tannins | Gallic tannins, 2023) în doze de 6.6 g/hL. Specific vinurilor convenționale, în urma definitivării fermentației alcoolice s-a realizat corecția de sulf (până la valori de 40 mg/L), dar și adaos de antioxidanți (acid ascorbic 20 mg/L).

În ambele cazuri s-a efectuat corecția de aciditate prin adaos de acid lactic până la valori echivalente cu 6.1 – 6.3 g/L acid tartric și tot comună ambelor variante

de vin au fost etapele de clarificare când s-a efectuat adaosul unui complex de compuși de tip PVPP polivinilpolipirolidonă pentru reducere conținut polifenoli (10 g/hL), bentonită cu rol în eliminare proteine insolubile și polifenolii care pot produce tulburarea vinului și formarea depozitelor solide (25 g/hL), amestec de soluție de silice coloidală și gelatină Vulcasol 30[®] (250 mL/hL). Cleiul de pește s-a utilizat în cazul probelor destinate vinurilor fără adaos de SO₂ pentru eficiența sa superioară în cazul probelor care au prezentat fermentație malolactică Hausengel (25 ml/hL) (Produkte - Max F. Keller GmbH (keller-mannheim.de, 2020)).

A doua etapă în procesul de vinificare a produselor a fost producerea propriu-zisă a vinului frizzante, când pentru Fetească regală Frizzante (FRF0) s-au constituit amestecuri de tiraj formate din must rectificat concentrat în doze de 10 g zahar/L, compoziția amestecului asigurând o presiune de 2.5 atm. Practic a doua fermentație s-a efectuat cu levuri fermentative de tip *Saccharomyces bayanus* care prezintă avantajele de a prezenta rezistență ridicată la alcool (>15% vol), conțin factor killer activ, producție ridicată de glicerol (6.0 g/L) și rezistență ridicată la prezența SO₂.

Feteasca regală Frizzante a beneficiat de a doua fermentație în sticlă, în timpul căreia levurile fermentative specifice au fost adăugate în doze de 20 g/hL, amestecul de tiraj având în compoziția sa must concentrat 10 g/L. Fermentația secundară are loc la 12-15°C pe parcursul a 6 până la 8 săptămâni.

Pentru maturare și autoliză, sticlele au fost depozitate într-un mediu răcoros și întunecat la temperaturi de până la 15°C, timp în care sunt supuse procesului de remuaj, prin care levurile autolizate sunt adunate în gâtul sticlei. Procedura a fost urmată de degorjare, iar pentru dozajul s-a determinat completarea cu bază de fermentație.

Pentru varianta cu dioxid de sulf adăugat, fermentația secundară s-a realizat prin adăugarea de levuri fermentative de tip *Saccharomyces bayanus*, must concentrat rectificat în doze echivalente de 10 g/L și bentonită în doze de 0.1 g/L într-un rezervor rezistent la presiune. Fermentația a avut loc la 12-15°C pe parcursul a aproximativ 10 zile. Vinul a fost filtrat la temperaturi scăzute și apoi transferat, sub presiune, într-un rezervor tampon, păstrând astfel dioxidul de carbon dizolvat.

Pentru variante fără dioxid de sulf, după degorjare, s-a adăugat licoare de expediție pentru a ajusta nivelul de zahăr și a echilibra gustul. Sticlele au fost sigilate cu dopuri și capace metalice, apoi pregătite pentru distribuție.

5.3 Tehnologia de vinificație a vinurilor rozé din soiul Cabernet Sauvignon

Producția de vinuri rozé implică utilizarea tehnologiilor specifice pentru a obține culoarea, aroma și gustul caracteristic. Diferența remarcabilă între vinurile roze și vinurile albe a constat în aplicarea unei etape de macerație scurtă înainte de presare și management al mustului.

S-au produs 2 tipuri de vin (fig. 5.3):

- Cabernet Sauvignon rozé fără adaos de dioxid de sulf (CSR0)
- Cabernet Sauvignon rozé cu adaos de dioxid de sulf (CSR1)

Conform fig. 5.3 procesele de vinificație au fost similare cu varietatea Fetească regală liniștit.

Etapele de tratament ale strugurilor au parcurs aceleași etape (adaos de levuri de tip *Pichia Klivery* (1.3 kg/t struguri)) pentru Cabernet Sauvignon fără adaos de sulfiți (CSR0), iar pentru Cabernet Sauvignon cu adaos de sulfiți (CSR1) s-a utilizat același amestec de metabisulfit de potasiu (6.0 g/100kg struguri), acid ascorbic (3.0 g/100 kg struguri) și tanin galic (1.0 g/100 kg struguri). În această etapă s-a efectuat și o macerație scurtă prin menținerea în contact a mustului ravaic cu boștina pentru extragerea compușilor de culoare. Strugurii au fost la maturitate deplină iar caracteristicile fizico-chimice esențiale ale mustului au fost de 181 g/L zahăr reziduali, aciditatea totală de 9.23 g/L acid tartric.

La vinurile care au fost destinate pentru producere fără SO₂ adăugat fermentația s-a produs în 2 etape cu fermentație alcoolică și concomitent cu fermentație malolactică. Fermentația alcoolică s-a efectuat în prezența de nutrienți de inițiere (Nutricel Inițial®) și respectiv de menținere (Nutricel start®), ambele produse fiind adăugate în doze de 25 g/hL, iar levurile pentru fermentație au fost Enartisferm ES181 (EnartisFerm ES181 | Yeast, 2020) de tip *S. cerevisiae* pregătite pentru vinuri cu expresii varietale puternice, cu disponibilitatea de fermentație la temperaturi scăzute și în medii hiper-reductive. Avantajul este susținut și de notele aromatice complexe, dar care nu se suprapun cu caracterul varietal. Fermentația malolactică a fost prezentă ulterior fermentației alcoolice, la câteva zile după inițierea acesteia, pe bază de bacterii ale acidului lactic de tip *O. oeni*, momentul ales a conferit randament în conversia acidului malic în acid lactic datorită conținutului scăzut de alcool etilic prezent < 16% (vol), pH > 3.2 și lipsa adaosului de SO₂.

La finalul perioadei de fermentație s-a efectuat pritolul simplu, iar cele 2 tipuri de vinuri au fost supuse tratamentelor specifice. CSR1 a avut o corecție de sulf prin ajustarea dozei la un conținut de 40 mg/L SO₂, în schimb CSR0 a beneficiat de adaos de levuri inactivate, ca precursori de glutatation. Având în vedere caracterul antioxidant al acestuia, doza administrată de 50 g/hL mai ridicată față de variantele FRF0 și FRF1 unde s-au utilizat doze în faza de fermentație de 25 g/hL. Levurile inactivate joacă rol și de batonaj, astfel că utilizarea Fresharom la CSR0 a vizat protecția caracterului aromatic al vinului și amânarea pe cât posibil a formării notelor oxidative.

Corecția de aciditate s-a efectuat cu același produs pe bază de acid lactic și s-a calculat pentru a fi echivalent de 6.1 – 6.3 g/L echilvanet acid tartric.

Îmbunătățirea structurii și a notelor aromatice s-a efectuat la CSR0 prin utilizare de tanin galic (6.5 g/hL) în schimb, pentru structură, la probele CSR1 s-a

folosit Enartistan Fruitan® (5 g/hL) (EnartisTan Fruitan | Tannins | Grape tannins, 2020) și Viazym Aroma® (10 g/hL) (Viazym® Aroma - Martin Vialatte, 2020). Dacă Fruitan este un amestec de tanin condensat extras din lemn din specii exotice, tanin din semințe de struguri și tanin de castan cu rol în stabilizarea intensității culorii, prospețime aromatică și cu un caracter antioxidant puternic, Viazym Aroma® este un amestec de enzime pectolitice cu rol de a conferi arome terpenice. Efectul se produce prin mecanismul de rupere a legăturilor dintre glucoză și compușii care sunt legați prin intermediul beta-glucozidazei a cărei activitate este realizată de către preparatul enzimatic pe bază de *Aspergillus niger*.

O reducere a conținutului de polifenoli la CSR0 s-a efectuat cu polivinilpirolidonă (15 g/hL) după stabilizare tartrică cu poliaspartat de potasiu (200 mL/hL), iar la probele CSR1 s-a efectuat stabilizarea prin utilizare carboximetil celuloză (CMC (100 g/hL) și gumă arabică (100 g/hL).

Tot în cazul probelor destinate sulfitării, s-a efectuat corecția de zahăr rezidual până la 10 g/L cu must concentrat rectificat și în final corecția de sulf la nivelul de 40 mg/L SO₂ liber.

Metodele pentru limpezire au fost similare cu cele utilizate la Fetească regală liniștit și a fost comună ambelor variante de vin destinate sulfitării și ne-sulfitării. Astfel că s-au folosit bentonita cu rol în eliminare proteine insolubile și polifenolii care pot produce tulburarea vinului și formarea depozitelor solide (25 g/hL), amestec de soluție de silice coloidă și gelatină Vulcasol 30 (250 mL/hL). Cleiul de pește s-a utilizat în cazul probelor destinate vinurilor fără adaos de SO₂ pentru eficiența sa superioară în cazul probelor care au prezentat fermentație malolactică (25 ml/hL).

5.4 Tehnologia de vinificație a vinurilor roșii din soiul Cabernet Sauvignon

Tehnologia de producere a vinurilor roșii implică o serie de etape tehnologice specifice, care încep în cu monitorizarea și evaluarea strugurilor și continuă în cadrul procesului de vinificație. Așa cum s-a folosit și până acum particularitățile specifice ale celor 2 tipuri de vinificații au fost aplicate individual tipului de vin, astfel că s-au vinificat 2 varietăți de Cabernet Sauvignon, considerând principiile tehnologiei de vinificație a vinurilor roșii de calitate, cu potențial de învechire (fig. 5.4):

- Cabernet Sauvignon fără adaos de dioxid de sulf (CR0)
- Cabernet Sauvignon cu adaos de dioxid de sulf (CS1)

Pe scurt, monitorizarea strugurilor s-a efectuat cu evaluarea calitativă și cantitativă a gradului de sanitizare și la maturitate deplină. Tratamentul a fost similar ca și în cazul varietăților menționate mai sus, adică adaos de *Pichia Kluyveri* (1.3 kg/tstruguri) pentru varianta fără adaos de SO₂ (CS0), iar pentru Cabernet Sauvignon cu adaos de SO₂ (CS1) s-a utilizat același amestec de metabisulfid de potasiu (6.

g/100kg struguri), acid ascorbic (3.0 g/100 kg struguri) și tanin galic (1.0 g/100 kg struguri).

După etapa de desciorchinare și zdrobire s-au efectuat cele 3 operațiuni caracteristice vinului roșu, operațiuni care s-au realizat concomitent. Valorile parametrilor fizico-chimici ai mustului ravac au fost pH - 3.35; aciditatea totală de 5.27 g/L acid tartric, zahăr rezidual 234 g/L și densitatea de 1100 g/L.

Macerația – fermentația s-a realizat în cisterne prevăzute cu sistem de remontare și sistem de spălare a căciulii formate din părțile solide ale mustuielii. Numărul de remontări de a fost de trei sau patru, cantitatea de must care s-a recirculat a fost cuprinsă între 30 și 50%. Macerația s-a efectuat în prezența de enzime de macerație cu doze de aproximativ 2.0 g/hL Viazym Aroma® ce conține amestec de enzime pectolitice pentru a conferi arome terpenice cu rol de îmbunătățire aromatică precum și enzime realizate pentru faza de macerație de tip Viazym Extract® (2.0 g/hL) (viazym® Extract - Martin Vialatte, 2020) și Nutricel Start® (25 g/hL).

Tot în etapa de macerație, concomitentă fermentației, pentru asigurarea capacității anti-oxidante, s-au adăugat taninuri de tip Tanin VR Supra® (Tanin VR Supra® - oenological tannin for vinification - Laffort®, 2020) și Tanin VR Color® (Tanin VR Color® - oenological tannin for vinification - LAFFORT®, 2020) ce combină efectele diferitelor taninuri selectate, fără a adăuga senzații de amar suplimentare. Rolul este completat de capacitatea de precipitare a proteinelor insolubile, precum și inhibarea enzimelor naturale de oxidare (lacază, polifenol oxidază). Pe de altă parte, au rol și în stabilizarea culorii în cazul în care sunt prezenți struguri cu deficiență de maturitate fenolică.

Fermentația alcoolică s-a produs în 2 etape. Prima etapă s-a produs cu procesul de macerație concomitent, utilizând levuri fermentative de tip Enartisferm ES488®, 20 g/hL (EnartisFerm ES488 | Yeast, 2021) ce conține o tulpină de *S. cerevisiae* recomandată pentru producerea vinurilor destinate maturării ce îmbunătățește și intensifică caracteristicile varietale ale strugurilor roșii foarte copti. Pe de altă parte, produce intensificarea aromelor de fructele roșii (zmeură, merișoare, coacăze roșii și cireșe) și crește complexitatea prin adăugarea de minerale, picante (lemn dulce) și note florale. Fermentația alcoolică a durat în primă fază 30 de zile și s-a produs la o temperatură de 20°C. După câteva zile s-a efectuat co-inocularea cu *O. oeni* pentru fermentația malolactică. Primele faze ale procesului de macerare fermentare s-au finalizat cu separarea de pe boștină, presare discontinuă și adaos de Nutricel Inițial (25 g/hL) pentru finalizarea fermentației. Această etapă de finalizare a fermentației a fost definitivată în termen de 45 de zile când s-au efectuat tratamentele anti-oxidante. Tratamentul anti-oxidant și protectiv s-a efectuat diferențiat pentru ambele tipuri de vin. Cele care nu erau destinate sulfitării (CS0) au beneficiat de adaos de tanin galic (6.5 g/hL), iar pentru varianta destinată sulfitării s-a efectuat și corecția de dioxid de sulf la doza de 40 mg/L (SO₂ liber).

Etapa de corecție de aciditate s-a efectuat pe baza acidului lactic care a fost adăugat în doze echivalente de 6.1 – 6.3 g/L acid tartric pentru ambele variante. Caracteristic vinului roșu s-a efectuat adaos de cipsuri de tip Incanto Natural (7.0 g/hL) (Incanto Natural | Oak alternatives | Chips (enartis.com), 2020) ale căror compoziție este stejar francez, neprăjit. Notele aromatice au rolul de a intensifica prospețimea, senzația fructată precum și senzațiile de vanilie, nucă de cocos și cedru.

În continuare s-a efectuat stabilizare tartrică utilizând Antartika, soluție cu implicații în reducerea turburelii dar și pentru impactul asupra profilului aromatic al vinurilor. Prezintă rol de stabilizare în ceea ce privește precipitarea bitartratului de potasiu și sporește caracterul proaspăt, fructat, al vinurilor fără a crește rigiditatea structurii taninului.

Înainte de filtrare, s-a efectuat un tratament de menținere și asigurarea complexității aromatice pe bază de diverse produse enologice de origine certificată: Similoak Toasted (10 g/hL) (Similioak® Toasted - Martin Vialatte, 2020), manoproteine (3 g/hL) și Enastistan Fruitan (5 g/hL). În acest context se amplifică notele picante, maschează notele vegetale, crește corpolența vinurilor, se reduce astringența și crește caracterul catifelat al vinurilor.

Conform tehnologiilor de producere produse în cadrul studiului, s-au preparat o serie de 8 variante tehnologice. Conform obiectivelor propuse, pentru fiecare soi Fetească regală și Cabernet Sauvignon s-au preparat câte două variante destinate adaosului de dioxid de sulf și respectiv nesulfitării, ambele proceduri urmează metodele clasice de vinificație pentru vinuri de calitate de tip albe liniștite, roze, albe frizzante precum și vinuri roșii.

Datorită unei condiții esențiale în procesele de vinificație, toate vinurile care au fost destinate metodelor alternative fără adaos de dioxid de sulf s-au vinificat după procedurile de producere în sec cu un conținut de zaharuri reducătoare de până la 4 g/L, iar monitorizarea s-a efectuat pentru un interval de 4 ani de zile. În fiecare an, s-au aplicat aceleași tehnici respectându-se dozele recomandate, iar finalizarea fiecărei etape s-a efectuat cu evaluarea parametrilor de calitate corespunzători. Conform graficului de monitorizare s-au creat și evaluat următoarele serii de evaluări. Codificare probe (CS- Cabernet Sauvignon, CSR – Cabernet Sauvignon rose, FR – Feteasca regala, FRF – Feteasca regala Frizzante, 0 - (probe -SO₂), 1- (probe +SO₂), an – (18-21) → (2018, 2021) (tabel 5.1.).

An	Cabernet Sauvignon		Cabernet Sauvignon rose		Fetească regală		Fetească regală frizzante	
	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂
2018	CS118	CS018	CSR118	CSR018	FR118	FR018	FRF118	FRF018
2019	CS119	CS019	CSR119	CSR019	FR119	FR019	FRF119	FRF019
2020	CS120	CS020	CSR120	CSR020	FR120	FR020	FRF120	FRF020
2021	CS121	CS021	CSR121	CSR021	FR121	FR021	FRF121	FRF021

Table 5.1. Codificarea probelor incluse în studiu
Table 5.1. Coding of samples included in the study

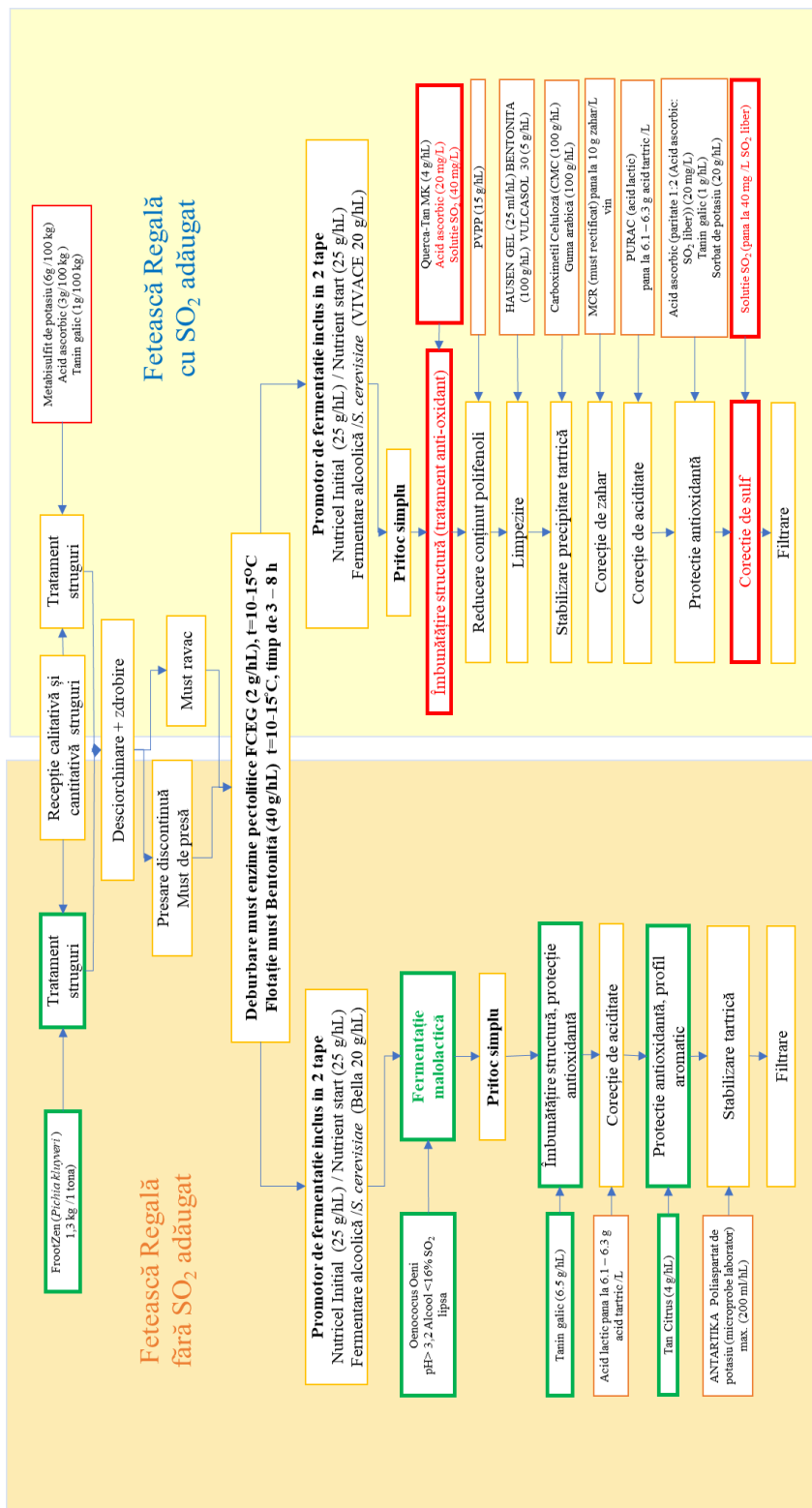


Figura 5.1. Schemele tehnologice pentru vinurile Fetească regală liniștit a) Fetească regală fără adaos de dioxid de sulf (FR0); b) Fetească regală cu adaos de dioxid de sulf (FR1).

Figure 5.1. Technological schemes for Fetească regală wines a) Fetească regală without added sulfur dioxide (FR0); b) Fetească Regală with added sulfur dioxide (FR1).

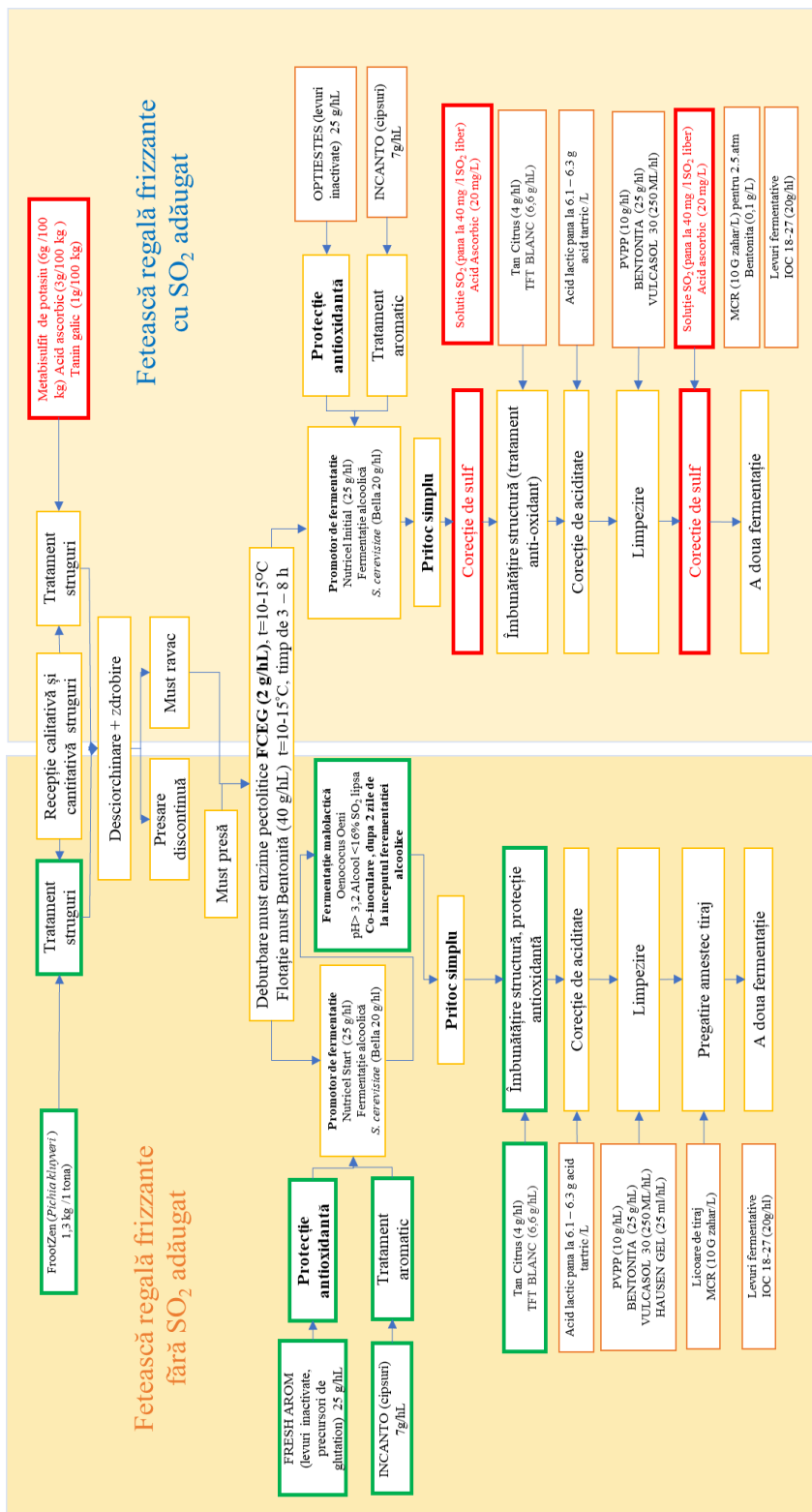


Figura 5.2. Schemele tehnologice pentru vinurile Fetească regală frizzante a) Fetească regală frizzante fără adaos de dioxid de sulf (FRF0); b) Fetească regală Frizzante cu adaos de dioxid de sulf (FRF1).

Figure 5.2. Technological schemes for Fetească regală Frizzante wines a) Fetească regală Frizzante without added sulfur dioxide (FRF0); b) Fetească regală Frizzante with added sulfur dioxide (FRF1).

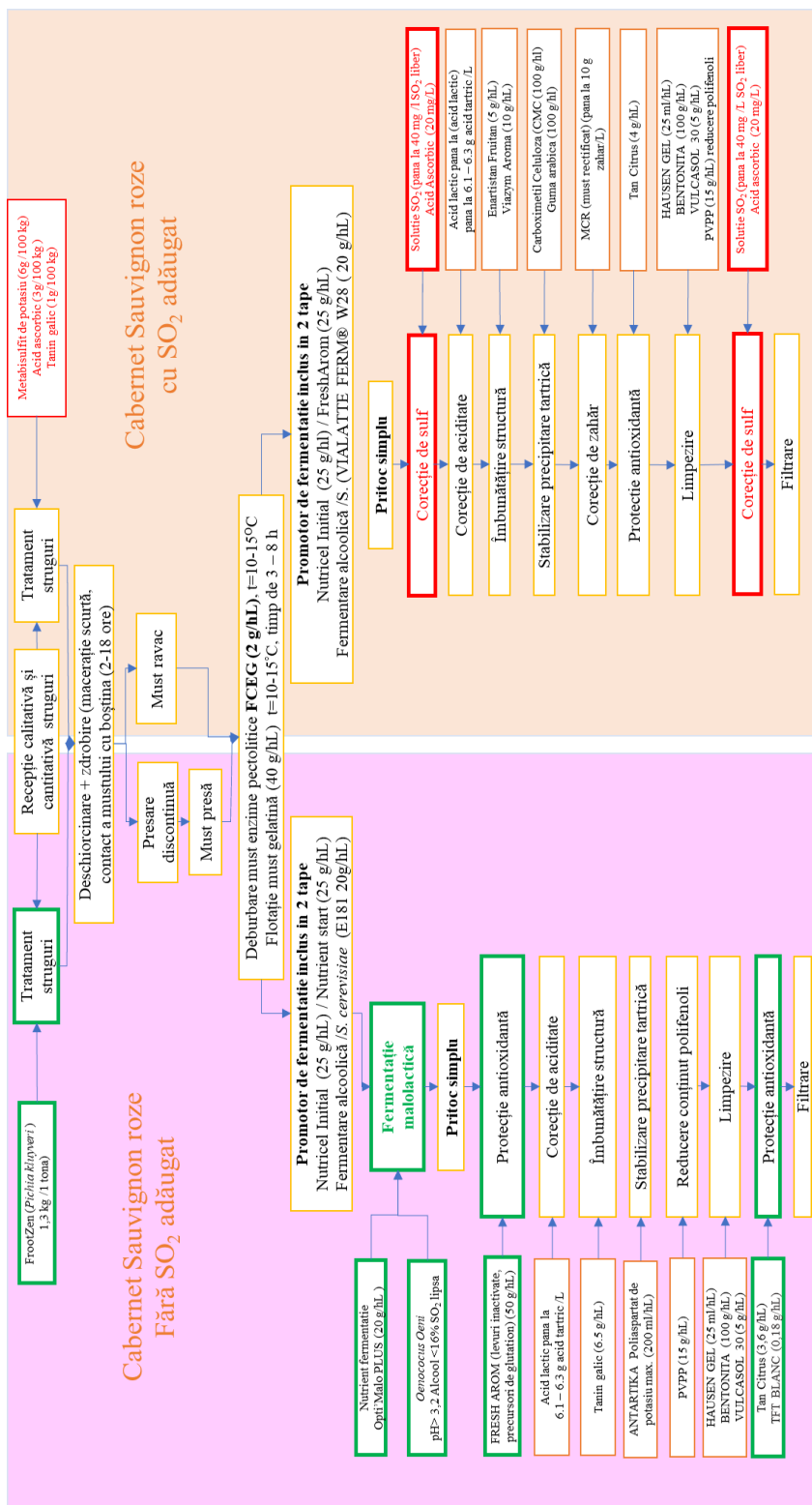


Figure 5.3. Schemele tehnologice pentru vinurile Cabernet Sauvignon roze a) Cabernet Sauvignon rosé fără adaos de dioxid de sulf (CSR0); b) Cabernet Sauvignon rosé cu adaos de dioxid de sulf (CSR1).
 Figure 5.3. Technological schemes for Cabernet Sauvignon rosé wines a) Cabernet Sauvignon rosé without added sulfur dioxide (CSR0); b) Pink Cabernet Sauvignon with added sulfur dioxide (CSR1).

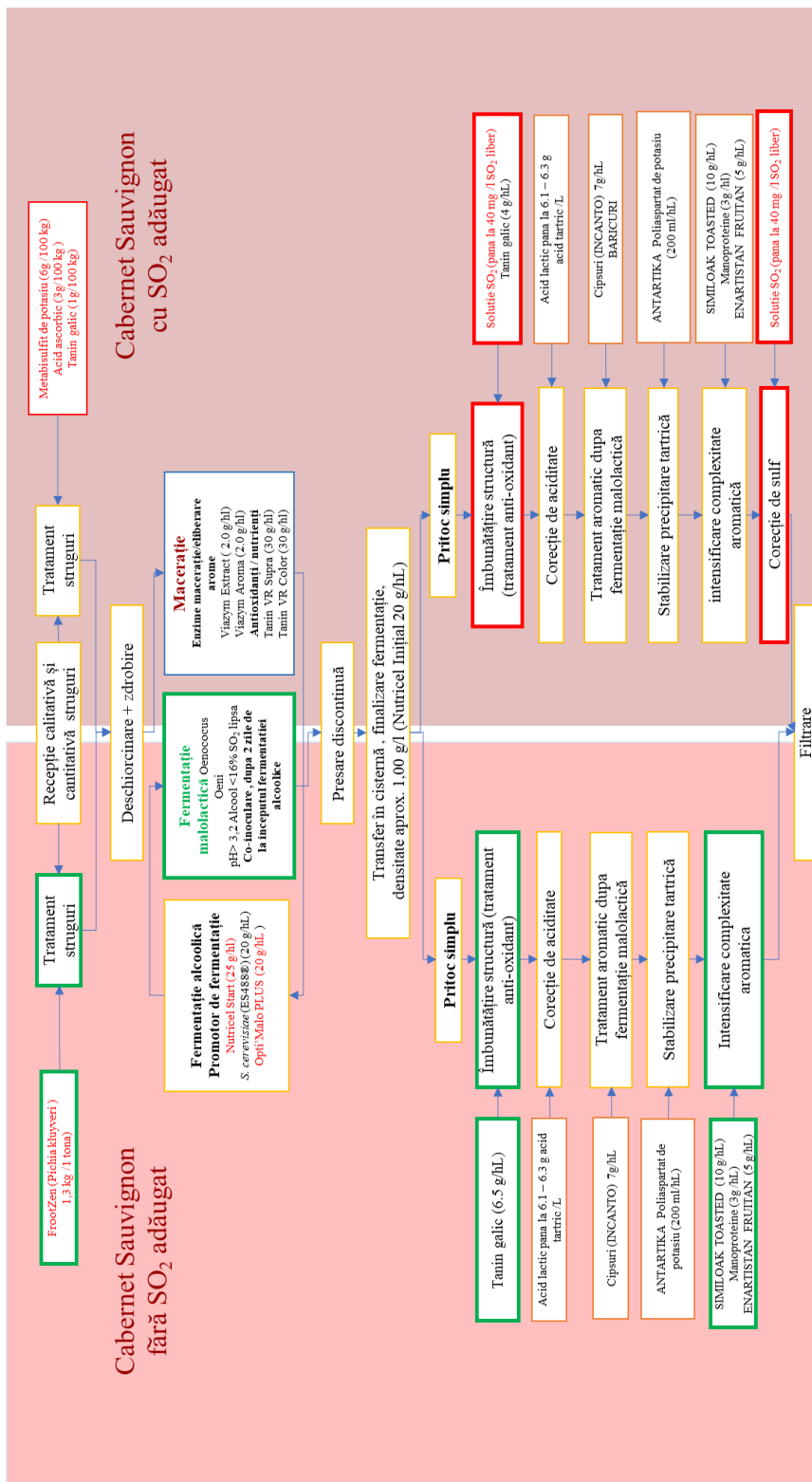


Figura 5.4. Schemele tehnologice pentru vinurile Cabernet Sauvignon: a) Cabernet Sauvignon fără adaos de dioxid de sulf (CS0); b) Cabernet Sauvignon cu adaos de dioxid de sulf (CS1).

Figure 5.4. Technological schemes for Cabernet Sauvignon wines: a) Cabernet Sauvignon without added sulfur dioxide (CS0); b) Cabernet Sauvignon with added sulfur dioxide (CS1).

6 EVALUAREA FIZICO-CHIMICĂ A VINURILOR INCLUSE ÎN STUDIU DE DEZVOLTARE TEHNOLOGICĂ

6. PHYSICAL-CHEMICAL EVALUATION OF THE WINES INCLUDED IN THE TECHNOLOGICAL DEVELOPMENT STUDY

6.1 Context

Spectroscopia IR este împărțită în două tipuri: MIR și FIR, iar spectrul infraroșu este denumit spectrul vibrațional molecular. Spectrul obținut în spectroscopia MIR se bazează pe modurile de vibrație fundamentale, care sunt legate de grupurile funcționale specifice existente în probă, iar spectrele în acest caz sunt obținute în intervalul de frecvență de la 400 la 4000 cm^{-1} , în timp ce spectrul obținut în NIR este datorat absorbției moleculare și vibrațiilor combinate ale modurilor de vibrație fundamentale în intervalul de frecvență de la 4000 la 10000 cm^{-1} .

Componentele funcționale ale compușilor pot fi grupate în proteine, carbohidrați, grăsimi, vitamine, minerale și apă, pe baza nu numai a funcției pe care o îndeplinesc în organism, ci și pe baza prezenței majorității legăturilor chimice (cu excepția mineralelor) care sunt prezente în aceste clase:

- Alcool: O–H; C–O;
- Amină: N–H; C–N; N–H;
- Aromatic: C–H; C=C;
- Carbohidrați: C–H; C–O;
- Carbonil: C=O;
- Eter: C–O;
- Grăsimi: C–H; C=O; C=C–H;
- Proteine: Amidă I, C=O; Amidă II, N–H, C–N;
- Apă: O–H; H–O–H.

Bauer ș.a., 2008 au utilizat FTIR pentru analizarea parametrilor compoziționali și fizici ai vinului, cum ar fi densitatea relativă, alcoolul, extractul, extractul fără zahăr, conductivitatea, refracția, glicerolul, fenolii totali, glucoza, fructoza, zaharurile reduse, zaharoza, aciditatea totală, pH-ul, acizii organici individuali și SO_2 liber și total.

6.2 Material și metode

Analiza spectrală s-a efectuat cu FT-MIR WineScan FT120 (FOSS Electric) analitic multi-component. WineScan este dotat cu un detector IR pirometric cu sulfat de triglicină deuterat și software-ul său de calibrare, care se bazează pe PCA și PLSR. Măsurările sunt efectuate în celule în flux pentru lichide echipate cu două ferestre CaF_2 montate ușor neparalele pentru a minimiza reflexiile interne. Fiecare fereastră

prezintă o fantă cu diametrul de 10 mm și grosimea de 2 mm, oferind o deschidere optică de 88.54 mm² și un volum al celulei de 3.27 μL.

Un separator de tereftalat de polietilenă oferă o lungime optică a traseului de 37 μm. Interferograma este înregistrată cu o rezoluție optică de 14 × 2000 cm⁻¹ și se face o medie pe baza a 12 scanări. Instrumentul este dotat cu un laser HeNe (632 nm) și un detector de siliciu pentru a urmări poziția oglinzii mobile în interferometru. Acest laser determină nu numai rezoluția, ci și viteza interferometrului.

6.3 Pregătirea probelor

Mostrele comerciale de vin au fost scanate fără pregătire prealabilă a probei, doar o etapă de filtrare pentru îndepărtarea particulelor s-a realizat în prealabil. Mostrele care conțin CO₂ au fost dezaerate.

6.4 Calibrare și validare a metodelor

În timpul calibrării, s-a ajustat modelul spectral la datele disponibile. Validarea a stabilit acuratețea și precizia care asigură funcționarea pentru viitoarele mostre prelevate din aceeași populație ca și mostrele de calibrare. Pentru a determina mai multe componente chimice, calibrarea a urmărit selectarea celor mai relevante lungimi de undă spectrale, urmată de utilizarea urmată de optimizarea ecuațiilor de calibrare pentru fiecare dintre diferiții parametri.

Pentru calibrare s-au utilizat opt mostre în kitul de referință iar parametrii certificați au fost alcool, glucoză-fructoză, aciditate totală, aciditate volatilă, pH, acid acetic, acid L-malic, densitate (tabel 6.1.).

<i>Parametri certificați</i>	<i>Domeniu</i>
<i>Alcool</i>	8.0 - 16 %
<i>Glucoză - fructoză</i>	0.7 - 8,0 g/L
<i>Aciditate totală</i>	2 - 6 g/L
<i>Aciditate volatilă</i>	0.2 - 1.0 g/L
<i>pH</i>	2.8 - 4.0
<i>Acid Acetic</i>	0.2 - 1.3 g/l
<i>Acid L-malic</i>	0.1 - 3.0 g/l
<i>Densitate</i>	0.99 - 1.01 g/mL

Tabel 6.1. Parametrii de calibrare pentru sistemul de analiza parametri de calitate vinuri.

Table 6.1. Calibration parameters for the wine quality parameters analysis system.

6.5 Rezultate și discuții

Conform principiului monitorizării în timpul fermentațiilor și până la evaluarea finalizării proceselor, monitorizarea a relevat următoarele evoluții ale parametrilor de testare.

6.5.1 Fetească regală liniștit

Fetească regală a fost vinificat conform principiilor prezentate în fig. 5.1 și tabelul 6.2. Activitatea A1 a inclus managementul strugurilor și respectiv a mustului. În aceste condiții, s-a efectuat adaos de enzime pectolitice pentru deburbare și bentonită pentru flotație must. Printre parametrii de evoluție s-a considerat aciditatea totală care a prezentat mici variații de la 5.55 ± 0.12 mg/L echivalenți acid tartric la 5.62 ± 0.11 mg/L (A2-1). În comparație probele de tip FR0, FR1 a prezentat valori ușor ridicate ale acidității totale 6.02 ± 0.12 mg/L și $6.10 \pm 0,08$ mg/L datorită amestecului pentru tratament al strugurilor ce conține metabisulfid de sodiu, compus care ionizează ușor la ionul bisulfid și produce creșterea ușoară a acidității totale.

În schimb, valorile pH au prezentat același tip de variație, ele fiind de 3.52 ± 0.02 (FR0) și respectiv 3.35 ± 0.07 (FR1) în debutul etapei de fermentație alcoolică. Nivele de dioxid de sulf produse sunt concordantă cu valorile raportate în literatură, chiar mai mici, datorită proprietăților tipurilor de levuri implicate Bella® (Renaissance Yeast. Bella, 2019) pentru FR0 și respectiv Vivace® (Renaissance Yeast. Vivace, 2019) pentru FR1 care prezintă caracteristica principală de a avea abilitatea de a produce nivele scăzute de sulfiți în urma proceselor fermentative. S-au înregistrat concentrații de 7.95 ± 0.10 mg/L (FR0) și respectiv 8.95 ± 0.06 mg/L (FR1) (A2-1). Până la etapa A2-2, în care s-a efectuat corecția SO₂ pentru FR1, nivelul înregistrat pentru SO₂ a fost similar cu FR0. Pentru variantele destinate nesulfitării (FR0) conținutul de SO₂ liber s-a menținut relativ constant. După finalizarea tuturor etapelor, înainte de îmbuteliere, valorile aflate la limita de sensibilitate a metodelor a fost de aproximativ 5.5 ± 0.04 mg/L, iar conținutul total a fost de 15.00 ± 0.15 mg/L. Pentru varianta de vin la care s-a efectuat tratamentul antioxidant după metodele clasice, etapa A3, ulterioară finalizării fermentației alcoolice, a conținut printre altele și corecția de aciditate cu acid lactic astfel că valorile s-au raportat ca fiind de aproximativ 7.08 ± 0.12 mg/L echivalent acid tartric. La finalul perioadei, valoarea acidității s-a echilibrat în intervalul dorit și datorită etapei care a cuprins și stabilizarea tartrică.

Prima corecție de SO₂ a produs nivele de 22.00 ± 0.12 mg/L SO₂, iar în etapa A4, care a fost premergătoare îmbutelierii valorile au fost de 43.00 ± 1.35 mg/L pentru SO₂ liber și 105 ± 2.52 mg/L SO₂ total.

Nivelele de zaharuri reducătoare au fost specifice vinurilor albe de calitate, nivelul de la care s-a pornit fermentația a fost de 191 ± 1.25 g/L pentru FR0 și respectiv 219 ± 0.85 g/L în cazul probelor FR1.

Rata de conversie a zaharurilor reducătoare a fost diferită la probele fără SO₂ adăugat, față de probele care nu sunt destinate sulfitării. În acest condiții într-un interval de 10 zile de la inițierea fermentației alcoolice, conținutul de zaharuri reducătoare a fost de 1.55 ± 0.86 g/L (FR0), iar în cazul probelor FR1 s-a constatat atingerea unui conținut de zaharuri reducătoare de 1.8 ± 0.28 g/L. Așa după cum s-a

specificat și pe schema tehnologică, s-a efectuat o corecție de zahăr în etapa A4, premergătoare îmbutelierii până la 10.0 g/L, astfel că valoarea obținută a fost de 7.14 g/L. Extractul sec a avut o dinamică constantă până la finalizarea extracției, o diferență de 0.02 g/L a fost înregistrată între valorile de 19.20±0.09 g/L la finalul fermentației, înainte de tratamentele de condiționare precum și înainte de îmbuteliere. Valorile au fost comparabile între probele care au fost destinate sulfitării și respectiv fără sulfitare suplimentară.

6.5.2 Fetească regală Frizzante

Culesul și presarea strugurilor s-a efectuat la maturitate tehnologică, fiind corespunzător din punct de vedere a conținutului de zaharuri reducătoare și respectiv a acidității astfel că asamblajul format din mustul presat și mustul de primă presă a avut un conținut de zaharuri de 175 ± 1.25 g/L și aciditate 6.52 ± 0.051 g/L echivalent acid tartaric pentru FRF(0) și respectiv 219 ± 0.85 g/L zaharuri reducătoare și 6.50 ± 0.06 g/L echivalent acid tartaric pentru aciditatea totală.

Procesul tehnologic a urmat aceeași pași și a respectat evoluția deja confirmată de metoda de vinificație la Fetească regală liniștit. Astfel că nivelele de SO₂ prezente doar din fermentație la nivelul concentrațiilor medii au fost de până la 10 mg/L, respectiv pentru FRF0 s-au înregistrat concentrații de 8.00 ± 0.07 mg/L (A2-1) și respectiv 9.00 ± 0.05 mg/L SO₂ liber. Tot la nivelul monitorizării SO₂ liber și respectiv SO₂ pentru FRF0, nivelele au rămas constante înainte de îmbuteliere; 5.00 ± 0.1 mg/L pentru SO₂ liber ceea ce reprezintă aproximativ 38% din nivelul de 13.00± 0.09 mg/L SO₂ total. Fermentația primară: debutează cu adaosul de levuri și inițiatori de fermentație și este menținută pentru un interval de aproximativ 25 de zile, fapt confirmat de conținutul de zaharuri reziduale de 1.78 ± 0.28 mg/L FRF0 și respectiv 1.81 ± 0.28 g/L FRF1. Acest proces transformă zaharurile din must în alcool și dioxid de carbon, nivelele de etanol care s-au atins în corelație cu variația zaharurilor reducătoare a fost de 20.00 ± 2.40 % vol. pentru FRF0 și respectiv 21.00 ± 1.65% vol. pentru FRF1 (tabel 6.3).

Aciditatea totală confirmă caracterul sec al vinului și atingerea obiectivelor propuse prin metoda de vinificație astfel că aciditatea este de 6.10 ± 0.06 g/L pentru FRF0 și respectiv 6.22 ± 0.4 g/L pentru FRF1. Fermentația alcoolică și respectiv fermentația malolactică pentru vinurile fără SO₂ suplimentar au determinat valori admisibile pentru aciditatea volatilă, care s-a încadrat în domeniul de 0.37 ± 0.06 g/L echivalenți acid acetic și respectiv 0.45 ± 0.07 g/L echivalenți acid acetic. Corelat cu aciditatea totală, a fost pH-ul care s-a menținut în ambele cazuri în valori ce nu au permis favorizarea creșterii încărcăturii microbiene sau evoluțiilor nedorite ale calității vinurilor.

Corecțiile de sulf s-au produs în 2 etape la finalul fermentației după protocoal efectuat când nivelele de SO₂ liber au fost de 22.00 ± 0.12 mg/L, iar a doua corecție a determinat valori de 43.00 ± 1.35 mg/L SO₂ liber.

În aceste condiții aciditatea totală a fost de 6.30 ± 0.21 g/L echivalenți acid tartric la FRF1 și respectiv 6.10 ± 0.05 g/L echivalenți acid tartric la FRF0. Zaharurile reducătoare, reziduul uscat și pH s-au menținut apropiate de valorile determinate la inițierea fermentației secundare, variațiile fiind de maxim 0.03 unități pentru pH (FRF1) și respectiv 0.05 (FRF0).

6.5.3 Cabernet Sauvignon vinificat roze

Cabernet Sauvignon a respectat regulile metodelor de vinificație pentru vinurile roze. Condiția primară pentru obținerea vinurilor de origine controlată a fost culesul strugurilor la maturitate deplină când conținutul de zaharuri reziduale a fost de minimum 187 g/L. În aceste condiții, parametrii de calitate fizico-chimici pentru must au indicat o aciditate totală de 6.45 ± 0.07 g/L echivalent acid tartric, respectiv conținut de zaharuri reducătoare de 201 ± 0.85 g/L, extract reducător 10.00 ± 0.12 g/L și pH 3.37 ± 0.05 la probele care au fost destinate metodei de vinificație fără adaos de sulfiți. Valori apropiate s-au înregistrat pentru probele vinificate clasic astfel că în etapa A1 valorile de început pentru aciditatea totală au fost de 5.55 ± 0.07 mg/L echivalent acid tartric, respectiv conținut în zaharuri reducătoare de 201 ± 0.85 mg/L, densitatea mai mare față de variantele anterior prezentate de aproximativ 1.09 ± 0.06 g/L, iar extractul uscat de 9.52 ± 0.12 g/L (CSR1).

Așa cum s-a prezentat în tabelul 6.4, o macerație scurtă s-a realizat în prezența bacilor de struguri, iar într-un termen de 1 – 2 zile s-au inițiat etapele de fermentație alcoolică astfel că s-a înregistrat variația parametrilor de monitorizare. În intervalul de maximum 45 de zile, care cuprinde toate etapele fermentative, conținutul de zahăr rezidual a fost de 1.56 ± 0.10 g/L (CSR0) și respectiv 1.60 ± 0.10 g/L (CSR1).

Procesul concomitent de fermentație alcoolică malolactică prin inoculare succesivă cu bacterii lactice a fost menținut pentru un interval mai lung de 45 de zile care să acopere și procesul mai avansat de transformare a acidului malic în acid lactic. Pe acest interval s-a realizat și evaluarea extractului sec care a prezentat creșteri de până la 17.80 ± 0.07 g/L pentru CSR0 și respectiv 16.50 ± 0.08 g/L, dar valorile finale au fost de 18.50 ± 0.06 g/L și respectiv 19.70 ± 0.07 g/L.

Odată cu creșterea extractului sec s-a produs și scăderea zahărului rezidual și respectiv creșterea acidității totale, parametru care a înregistrat valori de 7.34 ± 1.62 g/L echivalent acid tartric (CSR1) și respectiv 7.75 ± 2.36 g/L echivalent acid tartric pentru CSR0, în condițiile în care dozele calculate de acid lactic au vizat atingerea intervalului 6.10 – 6.30 g/L acid tartric. În același context, fermentațiile secundare au fost evitate, astfel că nu a existat diferență semnificativă între aciditatea volatilă a probelor care nu au avut tratament de sulfurare CSR0 ($A_v = 0.54 \pm 0.03$ g/L echivalent

acid acetic) și respectiv probele care au beneficiat de corecție de dioxid de sulf ($0.33 \pm 0,02$ g/L echivalent acid acetic).

Tăria alcoolică a atins nivelele recomandate, fiind de 13.30 ± 0.12 %vol pentru CSR1 și respectiv 13.71 ± 0.10 %vol pentru CSR0. S-a păstrat caracterul sec al vinului fără adaos de sulfiți (CSR0) astfel că restul de zahăr a fost de 0.60 ± 0.1 g/L, iar pentru varianta cu adaos de sulfiți zahărul a fost ajustat, iar conținutul la nivelul fermentației a fost de 9.70 ± 0.08 g/L.

6.5.4 Cabernet Sauvignon vinificat roșu

Tehnologia de vinificație pentru Cabernet Sauvignon a prezentat similaritate în toți pașii de aplicare, ambele variante de vin beneficiind de proces concomitent fermentație – macerație pe boștină. După cum se observă și în tabelul 6.5, pentru fiecare varietate de vin s-au respectat termenii privind etapele succesive de vinificație.

Nivelul zaharurilor totale au fost de 231 ± 4.95 g/L pentru CS0 și respectiv 225 ± 2.12 g/L pentru CS1, în condițiile în care s-au corelat cu densitatea și respectiv valoarea extractului sec de 14.83 ± 6.75 pentru CS0 și respectiv 12.50 ± 1.25 pentru CS1.

Valorile de pH cu care mustul a fost introdus în etapele de vinificație s-a menținut la valori optime pentru un proces de fermentație macerație predictiv și constant, astfel că s-au situat la valori de 3.38 ± 0.04 (CS0) și respectiv 3.39 ± 0.20 pentru CS1. Nivelele acidității totale s-au situat la valori de 5.33 ± 0.08 g/L echivalent acid tartric și respectiv 5.50 ± 0.07 g/L acid tartric.

Evoluția fermentației alcoolice însoțită și de fermentația malolactică s-a monitorizat prin variația nivelelor de zahăr rezidual, astfel că în perioada celor 45 de zile acestea au ajuns la valori de 4.03 ± 0.12 g/L pentru CS1 și respectiv 3.90 ± 0.14 g/L pentru CS0. Gradul de conversie a zaharurilor totale în alcool s-a situat la nivel susținut care a determinat atingerea unei tării alcoolice de 13.50 ± 0.28 %vol pentru CS1 și respectiv 13.45 ± 0.07 %vol.

Corecțiile de aciditate au produs o creștere a parametrului privind aciditatea totală în etapa de fermentație alcoolică - malolactică la valori de $6.72 \pm 0,45$ g/L echivalent acid tartric (CS1) și respectiv 6.75 ± 1.11 g/L echivalent acid tartric pentru CS0, ulterior la etapa A4 valorile s-au normalizat în intervalul $6.1 - 6.3$ g/L echivalent acid tartric.

Concentrațiile de dioxid de sulf liber s-au situat în nivelele acceptate sub 10 mg/L SO₂ pentru vinurile fără conservant adăugat. Pentru probele din categoria celor destinate tratamentului cu dioxid de sulf pentru conservare, corecțiile s-au efectuat în 2 etape, astfel la finalul etapei A2-2 nivelul de SO₂ liber a fost de 20.80 ± 0.05 mg/L, pe când etapa finală a constat într-o stabilire a dozei de 33.00 ± 0.08 mg/L.

Valorile nivelelor de pH au fost corelate cu nivelele acidității, respectiv s-au situat la sfârșitul perioadei de vinificație la nivele de 3.36 ± 0.03 pentru Cabernet Sauvignon fără adaos de sulfiți (CS0) și respectiv 3.50 ± 0.06 pentru Cabernet Sauvignon convențional.

6.6 Concluzii

Diferențele fizico-chimice între vinurile cu și fără SO₂ sunt prezentate în tabelele următoare. În timp ce conținutul de etanol era mai ridicat în vinurile în vinurile cu SO₂ suplimentar, valorile acidității totale, acidității volatile acetice, zaharurilor reduse, densității relative, extractului uscat total au fost comparabile la nivelul finalizării perioadelor de vinificație. Valorile de SO₂ liber și total sunt legate de practicile de adăugare a sulfitei și au prezentat valori superioare conform regulilor de adăugare. Astfel, în cazul vinurilor fără sulfiți adăugați, nivelele SO₂ au fost de până la 5.0 mg/L, valori care au fost produse în urma proceselor de fermentație, în schimb pentru vinurile care au fost realizate prin conservare cu SO₂, nivelele au fost de maxim 50 mg/L SO₂ liber, o valoare mai scăzută a fost înregistrată pentru CSR1, care a prezentat o valoare medie de 33 ± 0.12 mg/L.

De asemenea, conținutul de etanol depinde de câțiva factori care sunt legați de procesul de vinificație, inclusiv temperatura de fermentație, conținutul de zahăr al mustului sau unii compuși care afectează activitatea levurilor. SO₂ poate avea un impact asupra levurilor indigene din must și vin. Având în vedere corecția de sulf la nivelul strugurilor, acesta poate suprima levurile indigene, permițând levurilor selecționate să domine fermentația. În acest context, tăria alcoolică la nivelul vinurilor fără SO₂ adăugat s-a așteptat să fie superioară la vinurile fără SO₂ adăugat, valori care, într-adevăr au fost ușor superioare. Acest aspect este menționat în literatură cu privire la diferențele de conținut de etanol între vinuri considerând comportamente cu privire la activitatea levurilor în prezența SO₂ (Divol ș.a., 2012).

Conținutul mai scăzut de zaharuri reducătoare găsit în vinurile studiate a fost determinat de strategia de vinificație care a impus menținerea vinurilor la nivelul scăzut. O corecție suplimentară s-a realizat la vinurile cu SO₂ adăugat, corecția suplimentară fiind pentru Fetească regală Frizzante unde nivelele au fost de până la 20 mg/L. În orice caz, concentrația absolută sau zaharurile reziduale găsite în vinurile studiate aici, precum și diferențele dintre ele, sunt puțin probabil să fie de importanță senzorială.

Variația tăriei alcoolice s-a efectuat după mecanisme similare și cu randamente similare indiferent de natura vinurilor. Datele sunt prezentate în fig. 6.1.

Astfel nivele de 9.5 % s-au produs cu un consum de zaharuri de până la 1.78/1.81 g/L pentru probele de FRF. Corelația a fost direct proporțională cu conținutul de zaharuri reducătoare a căror valori au prezentat aceeași rata de descreștere. Pentru fiecare tip de soi, indiferent de natura și tipul de compuși care s-au inclus în etapa de

fermentație, procesele de fermentație au fost similare, neexistând diferențe semnificative.

Pentru probele de tip FR1 coeficienții de corelație au fost de -0.98 (FR0) și respectiv -0.98 (FR1), aceeași corelație s-a raportat pentru FRF la care valoarea corelației a fost de -0.97 (FRF0) și respectiv -0.98 (FRF1), ceea ce indică o corelație similară în intervalul de timp necesar pentru prima fermentație.

În cazul probelor de tip Cabernet Sauvignon roze s-a produs o dependență care nu a fost liniară după o corelație de ordin 2, astfel că obținerea conținutului total alcool etilic s-a produs după 2 tipuri de dependențe; în prima fază o descreștere ușoară a zaharurilor reducătoare de la 233 ± 1.23 g/L la 202 ± 0.98 g/L pentru CSR0 și respectiv 201 ± 0.85 g/L la 178 ± 0.5 g/L CSR1, ulterior ambele faze s-au produs cu o variație de până la 1.56 ± 0.1 g/L pentru CSR0 și respectiv 1.6 ± 0.1 g/L într-un interval de 45 de zile, respectiv de 35 de zile. Aciditatea mai scăzută găsită în vinurile cu SO₂ ar putea fi datorată metabolismului parțial al acidului malic în întreaga perioadă de fermentație alcoolică (Flanzy, 2003). În ciuda diferenței găsite pentru aciditate și în ciuda faptului că vinurile fără SO₂ au fost raportate ca având un pH comparabil (fig. 6.1(f)), nu s-au găsit diferențe în acest studiu, poate datorită fermentației malolactice ce a avut rolul de a evita fermentațiile suplimentare.

Aciditatea acetică volatilă ar putea fi influențată în mare măsură de mai mulți factori, inclusiv practicile de vinificație, expunerea vinului la aer și speciile de levuri. În contextul prezentului studiu este cu atât mai importantă cu cât lipsa unui conservant eficient și activarea bacteriilor acidului lactic pot produce efecte nedorite. Rezultatele privind comparația acidității volatile în vinurile cu și fără SO₂ adăugat au relevat o stabilitate superioară, neexistând riscul de avea valori ridicate ale acidității volatile (Lasik-Kurdyś ș.a., 2018). În acest studiu, un efect de interacțiune pentru aciditatea acetică volatilă în funcție de procesul de vinificație și stabilitatea vinurilor, nu a arătat corelația acestui parametru pentru diferențierea între vinurile cu și fără SO₂ adăugat la nici o varietate (fig. 6.2(c)).

Valorile extractelor seci totale au fost direct proporționale cu perioadele de fermentație și respectiv procesele concomitente care au însoțit fermentațiile alcoolice și malolactice. S-a constatat că la vinurile de tip CS, unde procesele de macerație au fost concomitente, nivelele extractului sec reducător a prezentat valori cele mai ridicate de 25.0 ± 3.54 % (m/V) pentru CS0 și respectiv 23.73 ± 6.4 % (m/V) pentru CS1. În schimb, la celelalte tipuri de vin, valorile pentru extractul sec au fost comparabile, chiar cu valori ușor mai scăzute pentru vinurile fără SO₂ adăugat (fig. 6.1(e)).

Perioadele pentru definitivarea fermentațiilor s-au finalizat în termenul de maxim 120 de zile. Pentru Cabernet Sauvignon roșu și respectiv Cabernet Sauvignon perioadele de monitorizare ale fermentațiilor s-au prelungit la perioade de până la 130 de zile. Perioada corespunzătoare pentru CS și respectiv CSR au fost extinse datorită

introducerii etapelor de macerație fermentație care au presupus utilizarea unor condiții diferite de temperatură. În acest context, adaosul de inițiatori de fermentație s-a efectuat după un interval de 2 zile pentru CSR și respectiv 5 zile pentru CS. Evoluția acidității totale s-a produs după o tendință constantă neexistând diferențe semnificative. Acest aspect a fost favorizat și de corecțiile de aciditate care s-au produs în etapele de fermentație macerație, tendințele fiind inițiate de la nivele de 5.55 g/L echivalent acid tartric și fiind finalizate la valori de aproximativ 6.25/6.30 și respectiv 6.36/6.25 g/L echivalent acid tartric pentru CSR și respectiv CS. Valori comparabile au fost pentru FR și respectiv FRF.

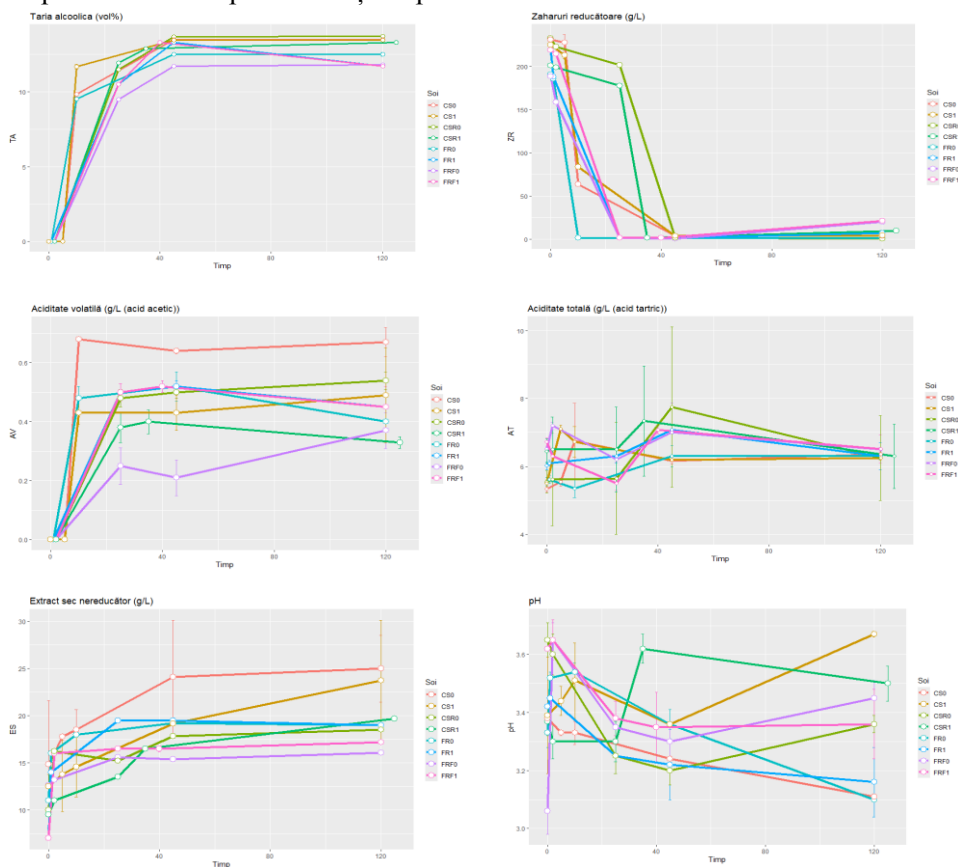


Figura 6.1. Evoluția parametrilor fizico-chimici pe perioada fermentației alcoolice/malolactice.

Figure 6.1. Evolution of physico-chemical parameters during alcoholic/malolactic fermentation

FETEASCA REGALA FARA SO₂ ADAUGAT

FRI	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH		
	Act.	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
zile																			
0	A1			5.55	0.12							191	1.25	1.085	0.12	11.0	0.12	3.33	0.05
1.0 ± 0.5	A2-1		5.62	0.11		4.50	0.10	10.0	0.21	186	1.27	1.083	0.11	16.0	0.05	3.52	0.02		
10 ± 1.2	A2-2	9.52	0.12	5.35	0.26	0.48	0.04	6.50	0.02	16.0	0.30	1.55	0.86	1.048	0.08	18.0	0.08	3.54	0.03
45 ± 3.2	A3	12.5	0.06	6.30	0.31	0.52	0.05	5.00	0.08	17.0	0.85	1.40	0.84	1.067	0.12	19.2	0.09	3.36	0.05
120 ± 4.5	A4	12.5	0.12	6.30	0.09	0.40	0.03	5.50	0.04	18.0	0.15	1.50	0.05	0.990	0.06	19.0	0.04	3.10	0.06

FETEASCA REGALA CU SO₂ ADAUGAT

FRI	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH		
	Act.	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
zile																			
0	A1			6.02	0.12							219	0.85	1.095	0.11	7.00	0.05	3.42	0.03
1.0 ± 0.4	A2-1		6.10	0.08		8.95	0.06	18.0	0.05	188	0.79	1.085	0.09	14.0	0.27	3.45	0.07		
25 ± 5.2	A2-2	10.5	0.11	6.30	0.20	0.50	0.03	22.0	0.12	74.0	0.25	1.8	0.28	1.079	0.13	19.5	0.23	3.25	0.06
45 ± 6.2	A3	13.3	0.12	7.08	0.12	0.52	0.02	33.0	0.52	72.0	0.85	1.6	0.05	0.998	0.12	19.5	0.32	3.22	0.12
120 ± 3.5	A4	11.7	0.08	6.30	0.40	0.45	0.07	43.0	1.35	105	2.52	7.1	0.20	0.993	0.07	19.0	0.07	3.16	0.12

Tabel 6.2. Parametrii de calitate pentru varietatea Fetească regală (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire – debarbare – flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – intervenție pe perioada de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbuteliere; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărâie alcoolică (vol%); AT – aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D – densitate specifică (g/mL); ES – Extract sec nereducător (g/L).

Table 6.2. Quality parameters for the Fetească regală variety (Act. – name of the activity where the physico-chemical parameters were assessed: A1 – crushing – debarburing – must flotation; A2-1 – Alcoholic / malolactic fermentation; A2-2 – intervention during the fermentation period; A3 – treatment after fermentation (antioxidant, tartaric stabilization); days – number of days recorded between essential stages; AT – total acidity (g/L tartaric acid); AV - reducing sugars (g/L); ES - non-reducing dry extract (g/L).

FETEASCA REGALA FRIZZANTE FĂRĂ SO₂ ADAUGAT

FRF0	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH		
	Act.	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
Zile																			
0	A1			6.52	0.05							189	1.25	1.078	0.08	12.6	0.05	3.06	0.08
2.0 ± 0.25	A2-1		7.20	0.10		8.00	0.07	20.0	0.08	159	1.36	1.072	0.07	13.2	0.03	3.65	0.06		
25 ± 1.24	A2-2	9.50	0.04	6.20	0.08	0.25	0.06	10.0	0.12	1.8	0.05	1.079	0.06	15.6	0.09	3.35	0.09		
45 ± 2.12	A3	11.7	0.04	7.00	0.86	0.21	0.06	6.00	0.05	0.8	0.03	0.998	0.07	15.4	0.10	3.30	0.05		
120 ± 5.25	A4	11.8	0.06	6.50	0.06	0.37	0.06	5.00	0.10	13.0	0.09	20	2.40	1.003	0.08	16.1	0.09	3.45	0.06

FETEASCA REGALA FRIZZANTE CU SO₂ ADAUGAT

FRF1	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH		
	Act.	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
Zile																			
0	A1			6.72	0.12							219	0.85	1.095	0.11	7.00	0.05	3.62	0.03
2.0 ± 3.25	A2-1		6.31	0.08		9.0	0.05	24.0	0.1	215	0.79	1.090	0.09	16.0	0.27	3.65	0.07		
25 ± 2.57	A2-2	10.5	0.11	5.50	0.2	0.50	0.03	22	0.12	74.0	0.25	1.8	0.28	1.079	0.13	16.5	0.23	3.38	0.06
40 ± 1.50	A3	13.3	0.12	7.08	0.12	0.52	0.02	33	0.52	72.0	0.85	1.7	0.05	0.998	0.12	16.5	0.32	3.35	0.12
120 ± 6.25	A4	11.7	0.08	6.52	0.42	0.45	0.07	43	1.35	105	2.52	21	1.65	1.002	0.07	17.2	0.07	3.36	0.12

Tabel 6.3. Parametrii de calitate pentru varietatea Fetească regală frizzante (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici; A1 – zdrobire – deburbare – flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – finalizare etapă de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – transfer pentru fermentație secundară; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărnie alcoolică (vol%); AT - aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L).

Table 6.3. Quality parameters for the Feteasca regală frizzante variety (Act. – name of the activity where the physico-chemical parameters were assessed; A1 – crushing – deburring – must flotation; A2-1 – Alcoholic / malolactic fermentation; A2-2 – completion of the fermentation stage ; A3 – treatment after fermentation (antioxidant, acidity correction) A4 – transfer for secondary fermentation; TA – total acidity (g/%); L (tartaric acid)); AV - reducing sugars (g/L); ES - non-reducing dry extract (g/L).

CABERNET SAUVIGNON ROZE FARA SO₂ ADAÛGAT

CSRO	Zile	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH	
		M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
0				5.55	0.32							233	1.23	1.100	0.04	10.0	0.20	3.65	0.06
2.0±0.12	A2-1			5.62	1.36			5.02	0.25	21.0	0.15	223	1.21	1.100	0.06	16.2	0.12	3.60	0.07
25±1.32	A2-2	11.5	0.08	5.65	1.65	0.48	0.03	5.20	0.36	20.0	0.12	202	0.98	1.090	0.05	15.2	0.05	3.25	0.06
45±2.86	A3	13.7	0.09	7.75	2.36	0.50	0.02	5.20	0.31	22.0	0.08	1.6	0.10	1.040	0.07	17.8	0.07	3.20	0.05
120±7.50	A4	13.7	0.10	6.25	1.25	0.54	0.03	5.00	0.36	20.0	0.09	0.6	0.10	1.030	0.03	18.5	0.06	3.36	0.03

CABERNET SAUVIGNON ROZE CU SO₂ ADAÛGAT

CSRI	Zile	TA		AT		AV		SO ₂ liber		SO ₂ total		ZR		D		ES		pH	
		M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD
0				6.45	0.36							201	0.85	1.090	0.06	9.5	0.12	3.37	0.05
2.0±0.10	A2-1			6.50	0.96			8.50	0.03	24.8	0.09	199	0.78	1.080	0.07	11.0	0.11	3.30	0.06
25±0.52	A2-2	12.0	0.08	6.50	1.25	0.38	0.05	21.0	0.02	68.0	0.10	178	0.50	1.080	0.05	13.5	0.05	3.30	0.07
35±3.25	A3	12.9	0.08	7.34	1.62	0.40	0.04	20.8	0.05	69.5	0.11	1.6	0.10	1.030	0.04	16.5	0.08	3.62	0.05
125±8.15	A4	13.3	0.12	6.30	0.95	0.33	0.02	33.0	0.08	72.0	0.18	9.7	0.08	0.990	0.08	19.7	0.07	3.50	0.06

Tabel 6.4. Parametrii de calitate pentru varietatea Cabernet Sauvignon roze (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici; A1 – zdrobire – deburbare – flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – finalizare etapă de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbutelire; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT – aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D – densitate specifică (g/mL); ES – Extract sec nereducător (g/L).

Table 6.4. Quality parameters for the rose Cabernet Sauvignon variety (Act. – name of the activity where the physico-chemical parameters were assessed; A1 – crushing – deburring – must flotation; A2-1 – Alcoholic fermentation; A2-2 – completion of the fermentation stage; A3 – treatment after fermentation (antioxidant, tartaric stabilization); days – number of days recorded between essential stages; AT – total acidity (g/L tartaric acid); AV - reducing sugars (g/L); ES - non-reducing dry extract (g/L).

CABERNET SAUVIGNON FARA SO₂ ADAUGAT

CSO	Zile	TA	AT	AV	SO ₂ liber	SO ₂ total	ZR	D	ES	pH							
		M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD						
0	A1		5.33	0.08			231	4.95	1.099	0.00	14.8	6.75	3.38	0.04			
5.0 ± 0.5	A2-1		5.54	0.12	5.88	0.45	228	9.19	1.098	0.00	17.8	0.35	3.33	0.01			
10 ± 1.2	A2-2	9.85	0.00	6.75	1.11	0.68	0.00	22.8	0.35	2.12	1.048	0.01	18.5	2.12	3.33	0.04	
45 ± 2.3	A3	13.5	0.25	6.17	0.09	0.64	0.01	36.0	15.56	3.9	0.14	0.997	0.00	24.1	6.01	3.24	0.01
120 ± 6.5	A4	13.5	0.28	6.36	0.06	0.67	0.05	37.1	15.41	3.7	0.14	0.994	0.00	25.0	3.54	3.11	0.01

CABERNET SAUVIGNON CU SO₂ ADAUGAT

CSO	Zile	TA	AT	AV	SO ₂ liber	SO ₂ total	ZR	D	ES	pH							
		M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD	M	±SD						
0	A1		5.5	0.00			225	2.12	1.096	0.00	12.5	1.25	3.39	0.20			
5.0 ± 0.7	A2-1		7.1	0.00	5.54	0.11	24.5	0.71	2.13	3.54	1.091	0.01	13.8	3.89	3.44	0.05	
25 ± 3.2	A2-2	11.7	0.17	6.72	0.45	0.43	0.04	25.4	1.20	84.0	2.83	1.493	0.65	14.6	3.18	3.51	0.13
45 ± 6.2	A3	13.5	0.07	6.19	0.02	0.43	0.06	67.0	1.41	4.03	0.00	0.992	0.00	19.1	0.00	3.36	0.00
130 ± 4.8	A4	13.5	0.07	6.25	0.07	0.49	0.16	85.0	1.41	4.56	0.72	0.992	0.00	23.7	6.40	3.67	0.01

Tabel 6.5. Parametrii de calitate pentru varietatea Cabernet Sauvignon (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire - inițiere etapă de macerație; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – transfer în altă cisternă după presare; finalizare etapă de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbuteliere; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT – aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L).

Table 6.5. Quality parameters for the Cabernet Sauvignon variety (Act. – name of the activity at which the assessment of the physico-chemical parameters was carried out: A1 – crushing - initiation of the maceration stage; A2-1 – Alcoholic / malolactic fermentation; A2-2 – transfer to another tank after pressing; fermentation stage (antioxidant, tartaric stabilization); days - number of days recorded between essential stages; AT - acidity total (g/L) - volatile acidity (g/L) - reducing sugars (g/L); ES - non-reducing dry extract (g/L).

7 CORELAȚIA DINTRE AMINOACIZII DETERMINAȚI ȘI AMINE BIOGENE ÎN CONDIȚIILE FERMENTAȚIEI MALOLACTICE SUPLIMENTARE

6. CORRELATION BETWEEN DETERMINED AMINO ACIDS AND BIOGENEOUS AMINES UNDER ADDITIONAL MALOLACTIC FERMENTATION CONDITIONS

7.1 Context

Aminoacizii joacă un rol important ca și sursă de azot pentru mustul produs din struguri la conversia zaharurilor în alcool etilic. Aminoacizii sunt implicați în activitatea metabolică a levurilor în timpul fazelor de fermentație, cea mai importantă fiind fermentația alcoolică. Un nivel scăzut al acestor aminoacizi afectează fermentația prin faptul că există posibilitatea de a rămâne incompletă sau prin obținerea unor compuși nedoriți, pe de altă parte concentrații ridicate ale aminoacizilor produc riscul formării de vinuri cu instabilitate microbiologică ridicată cu impact negativ asupra calității (Zamora ș.a., 2009).

Aminoacizii sunt importanți pentru procedurile de vinificație deoarece sunt prezenți în procesele fermentative la un nivel important, astfel că rolul lor este de a susține arome caracteristice și specifice tipului de vin implicat. Nivelele de aminoacizi variază atunci când sunt implicate proceduri precum fermentația malolactică, stabilizare tartrică, tratamente antioxidare, deproteinizare și limpezire (Cosme ș.a., 2021). Odată ce aminoacizii sunt prezenți încă din primele etape de vinificație, ei sunt implicați în mai multe reacții dinamice pentru a produce compuși cu structură derivată precum acizi carboxilici, cetoacizi, alcooli superiori și amine biogene (López-Rituerto ș.a., 2010). Toți acești compuși chimici prezintă o influență directă sau indirectă asupra aromei vinurilor. În acest context se consideră l-valina care reprezintă sursa de formare a l-metil-1-propan-ol, l-leucina produce 3-metil-1-butan-ol, l-izoleucina produce l-metil-1-butanol, acidul L-aspartic este la originea formării l-heptan-ol și l-tirosina produce hidro-4-fenil-etanol (Lilly ș.a., 2006).

Aminele biogene reprezintă substanțe de tip basic care, de obicei, se formează și prezintă o creștere a concentrației în anumite domenii de pH, existența lor fiind determinată și de co-factori precum alterarea vinului, bacterii de tip *Lactobacillus* and *Pediococcus*, temperatura sau prezența bioxidului de sulf (García-Ruiz ș.a., 2020). Dioxidul de sulf prezintă o fracție care are ca proveniență naturală, fiind produs în urma proceselor de fermentație. Nivele la care poate să ajungă dioxidul de sulf este cuprins între 10 – 20 mg/L. În schimb, o eficiență satisfăcătoare în etapele tehnologice de vinificație este atinsă la concentrații de până la 200 mg/L (Santos ș.a., 2012).

Utilizarea unei concentrații prea ridicate de dioxid de sulf pentru a asigura minimizarea reacțiilor nedorite prezintă un impact deosebit asupra consumatorilor prin influența asupra stării de sănătate dar și prin conferirea unui caracter aparte, puternic, agresiv al vinului. Impactul asupra sănătății umane este caracterizat prin reacțiile adverse produse la nivelul organismului uman cauzate de efecte de tip intoleranță sau răspuns biologic advers. Aceste răspunsuri adeseori au fost raportate ca având legătură semnificativă cu reacții astmatice ce reprezintă răspunsuri alergice la consum susținut de vinuri cu conținut ridicat de dioxid de sulf. Pe de altă parte, reacțiile biologice adverse cel mai des raportate au fost asociate cu dureri de cap sau migrene. Prezența dioxidului de sulf, așa cum s-a menționat și anterior, poate fi perceptibilă la nivel olfactiv prin intermediul descriptorilor specifici și care influențează și maschează pregnant caracteristicile de soi ale vinului. Pe de altă parte, aminele biogene prezintă un potențial mai ridicat de a influența starea de sănătate umană prin faptul că prezintă o toxicitate mai ridicată. Astfel, nivele mult mai scăzute produc reacții biologice importante (Guo ș.a., 2015). În acest context, nivele de concentrații cuprinse între 50 – 100 mg/L pentru oricare din acești compuși pot produce alterarea aromei specifice a vinului prin introducerea unor senzații metalice, putrede, cărnoase la nivelul aromelor și caracteristicilor varietale (Stojanović ș.a., 2020). Cu toate că nivelele aminelor biogene la care își fac simțită prezența este de până la 100 mg/L, pragul de concentrații la care reacțiile biologice se produc este peste acest prag. De obicei interacțiunile cu efect asupra sănătății se transpun în instalarea unor afecțiuni precum cele respiratorii, palpitații cardiace, hiper sau hipotensiune și alte reacții de tip alergic (Lonvaud-Funel, 2001).

Noile tendințe în tehnologiile de vinificație implică utilizarea de compuși alternativi care substituie rolul dioxidului de sulf. Din perspectiva reacțiilor de oxidare, s-a constatat că utilizarea unor substanțe de proveniență biologică precum sorturi de levuri non-*Saccharomyces* de tip *Pichia kluyveri* oferă posibilitatea creării unor condiții favorabile de a bloca reacțiile de oxidare (Casas-Godoy ș.a., 2021). Din perspectiva abordărilor tehnologice s-au studiat și s-au testat metode precum tratamente termice, presiune hidrostatică ridicată, ultra-sunete, iradiere de tip ultraviolet sau aplicarea unor curenți de descărcare de intensitate scăzută (Morata ș.a., 2017).

Fermentația malolactică (ML) este caracteristică pentru vinurile roșii dar și pentru vinurile albe. Rezultatul principal este transformarea acidului malic în acid lactic prin decarboxilare și prin metabolism bacterian secundar. Alegerea fermentației malolactice este facilitată de posibilitatea de a da caracteristici senzoriale superioare. Dar, folosind decarboxilarea, bacteriile lactice de tip *O. oeni* pot extinde procesul nu numai la acidul malic, ci și la aminoacizii prezenți în vin și pot crește concentrațiile de amine biogene (Mendes Ferreira ș.a., 2020).

Tehnica de vinificație în sec a vinurilor poate limita formarea de amine biogene la niveluri scăzute încadrate în limite normale ce nu prezintă implicații supra sănătății umane, dar nici nu le face perceptibile la nivelul descriptorilor olfactivi. pH-ul caracteristic vinurilor seci este unul dintre mediile favorabile care inhibă parțial activitatea compoziției mediului biologic și stabilitatea sigură a vinului (Perestrelo R. ș.a., 2020).

Scopul prezentului studiu a fost evaluarea aminelor biogene specifice pentru vinuri în relație cu aminoacizii prin determinarea corelațiilor dintre creșterea aminelor biogene și scăderea aminoacizilor corespunzători în perioada de învechire a vinului și evaluarea rolului mai multor proceduri de vinificare pentru vinuri. produs cu dioxid de sulf și fără dioxid de sulf adăugat.

7.2 Materiale și metode

7.2.1 Reactivi și materiale de referință

Pentru cuantificarea aminoacizilor s-au folosit o serie de standarde de lucru și anume: etanolamină (ETH), putrescină (PUT), tiramină (TIRM), cadaverină (CAD), histamină (HISM), feniletilamină (FEM), triptamină (TRPM) și spermidină (SPMD), l-serină (SER), l-glutamină (GLU), l-fenilalanină (FE), l-triptofan (TRP), l-tirozină (TIR), l-lizină (LIS) , l-arginină (ARG), l-histidină (HIS) și au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, puritate de 98%. Acidul heptafluorobutiric și metanolul au fost furnizate de Merck KGaA -Germania și au avut puritate LC-MS. Apa de tip I a fost produsă de un Thermo Scientific GenPure UV-TOC.

7.2.2 Condiții cromatografice

Pentru separare s-a folosit o fază mobilă constând în soluție apoasă cu 0.1% acid heptafluorobutiric în apă (FMA) și 0.1% acid heptafluorobutiric în metanol (FMB). Eluția a folosit mai multe faze de tip gradient dar și eluții izocratice. Pe scurt, eluția a început cu un amestec de fază mobilă A (FMA) și fază mobilă B (FMB) de 85:15 % (V/V) timp de 2 minute, apoi pentru încă 3 minute compoziția a fost schimbată la 73% FMA și apoi la 50% FMB în alte 4 minute. Timp de 2 minute eluția a fost izocratică și reechilibrată în 3.5 minute.

Pentru spectrometrul de masă, a fost utilizată o sursă heated electrospray (HESI) pentru ionizare în mod pozitiv. S-a utilizat o celulă de coliziune de tip quadrupol Q2 pentru producerea fragmentelor specifice în vederea identificarea precisă a compușilor din studiu. Pentru operare optimă s-a utilizat un potențial de ionizare de 3 kV, temperatura sursei de ionizare a fost de 350°C, ca și gaz de ionizare s-a utilizat azot la presiunea de 35 psi iar gazul auxiliar a avut presiunea de 10 psi. Tubul capilar a avut o temperatură de 350°C. În aceste condiții, tranzițiile aminelor și aminoacizilor biogene au fost conform tabelului 7.1.

	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-N]^+$ (m/z)	CE (V)
<i>L-serina (SER)</i>	106.10	60.18	10
<i>L-glutamina (GLU)</i>	147.21	84.11	7
<i>L-fenilalanina (FE)</i>	166.10	120.16	10
<i>L-triptofan (TRP)</i>	205.10	146.02	10
<i>L-tirozina (TIR)</i>	182.19	91.05	27
<i>L-lizina (LIS)</i>	147.19	84.11	15
<i>L-arginina (ARG)</i>	174.20	128.13	11
<i>L-histidina (HIS)</i>	156.10	110.5	10
<i>Feniletilamină (FEM)</i>	122.10	105.06	14
<i>Triptamina (TRPM)</i>	161.30	144.07	10
<i>Serotonina (SER)</i>	177.25	160.05	8
<i>Tiramina (TIRM)</i>	138.10	121.12	8
<i>Histamina (HISM)</i>	112.10	95.10	12
<i>Putrescina (PUT)</i>	89.15	72.21	8
<i>Cadaverina (CAD)</i>	103.10	86.14	7
<i>Spermidina (SPMD)</i>	203.20	112.12	10

Tabel 7.1. Condiții de spectrometrie de masă pentru determinarea aminoacizilor și aminelor biogene. Ion molecular $[M+H]^+$ (m/z), $[M-N]^+$ fragment caracteristic (m/z), energia de coliziune optimizată CE (V) în Q2.

Table 7.1. Mass spectrometry conditions for the determination of amino acids and biogenic amines. Molecular ion $[M+H]^+$ (m/z), $[M-N]^+$ characteristic fragment (m/z), CE optimized collision energy (V) in Q2.

7.2.3 Prepararea probelor standard.

Pentru prepararea probelor în vederea calificării metodei de analiză cromatografică s-a utilizat soluții amestecuri primare pentru amine biogene și pentru aminoacizi.

Soluția primară pentru amine biogene s-a preparat prin utilizarea de diverse volume de soluții individuale a căror concentrații au fost cuprinse între 2.34 g/L pentru etilamina (ETI) și 604 mg/L pentru (3 metilbutil)-amina (3-MBU). Într-un flacon de 5.0 ml s-au diluat volume cuprinse între 0.04 ml și 0.17 ml, s-au amestecat și respectiv s-au diluat la semn cu soluție acid clorhidric 0.1M. Pentru concentrațiile de lucru C1 → C6 s-au utilizat diluții de 1.0; 0.75, 0.5, 0.25, 0.1 și 0.05 ml la 1.0 ml cu soluție acid clorhidric 0.1M și s-au preparat soluții de cuprinse între 20 și respectiv 1.0 mg/L.

În cazul soluțiilor de aminoacizi, domeniile de concentrații din probele standard individuale au fost cuprinse între 1489 mg/L pentru l-alanină (ALA) și 504 mg/L pentru l-cistină (CIS2). S-au preluat volume corespunzătoare între 0.07 ml și respectiv 0.2 ml pentru a prepara soluții de 20 mg/L din care s-au efectuat diluții succesive de la 15.0 la 1.00 mg/L.

Pentru probele de vin, s-a efectuat prepararea unor probe fortificate în care s-a efectuat introducerea unor volume de soluție stoc (coloana 2) și a unor volume de

Iml de vin. Probele de vin s-au ales din cele 4 soiuri studiate (Cabernet Sauvignon, Cabernet Sauvignon roze, Fetească regală și Fetească regală Frizzante) (tabel 7.2.).

Compus	Ecuatie	Corel	CONC	%Diff	RT
<i>Etanolamina (ETH)</i>	$\log(Y) = 4.71237+0.704922*\log(X)$	0.9968	21.26	6.3	3.57
<i>Putrescina (PUT)</i>	$Y = 76718.6+5275.28*X$	0.9894	21.71	8.53	3.71
<i>Tiramina (TIRM)</i>	$\log(Y) = 5.20677+0.650555*\log(X)$	0.979	22.76	13.79	3.85
<i>Cadaverina (CAD)</i>	$\log(Y) = 4.96178+0.633591*\log(X)$	0.9771	20.94	4.71	3.99
<i>Histamina (HISM)</i>	$\log(Y) = 5.35605+0.57225*\log(X)$	0.9565	18.66	-6.7	4.55
<i>Feniletilamină (FEM)</i>	$Y = 496564+16364.7*X$ R ² =	0.9912	19.43	-2.85	4.41
<i>Serotonina (SER)</i>	$\log(Y) = 5.03781+0.663919*\log(X)$	0.9895	18.71	-6.45	7.9
<i>Triptamina (TRPM)</i>	$\log(Y) = 5.13577+0.677528*\log(X)$	0.9971	19.35	-3.24	8.1
<i>Spermidina (SPMD)</i>	$\log(Y) = 5.46784+0.758135*\log(X)$	0.9991	19.25	-3.75	1.58
<i>L-glutamina (GLU)</i>	$Y = 2435.63+18446.4*X$	0.9914	18.26	-8.7	1.62
<i>L-serina (ser)</i>	$Y = 82226.9+45832.8*x$	0.9744	16.99	-15	2.33
<i>L-histidina (his)</i>	$Y = 202495-2784.47*x$	0.9081	18.56	-7.2	2.75
<i>L-lizina (lis)</i>	$Y = -161050+202534*x$	0.9939	22.23	11.15	3.13
<i>L-arginina (arg)</i>	$Y = 347097+284507*x$	0.995	24.26	21.3	3.92
<i>L-tirozina (tir)</i>	$Y = -119.305+132914*x$	0.995	18.56	-7.2	6.58
<i>L-fenilalanina (fe)</i>	$Y = -906332+807683*x$	0.9658	20.3	1.5	8.21
<i>L-triptofan (trp)</i>	$Y = -44618.4+77138.7*x$	0.9932	19.06	-4.7	1.78
<i>Etanolamina (ETL)</i>	$\log(Y) = 4.71237+0.704922*\log(X)$	0.9968	21.26	6.3	3.57
<i>Putrescina (PUT)</i>	$Y = 76718.6+5275.28*X$	0.9894	21.26	6.3	3.57

Tabel 7.2. Distribuția aminelor biogene și a aminoacizilor pe durata cromatogramei în condițiile de eluție (compus, calibrare- curba de calibrare și coeficient de corelație, conținut regăsit în probe fortificate; DIFF-eroare procentuală; TR- timp de retenție).

Table 7.2. Distribution of biogenic amines and amino acids during the chromatogram under the elution conditions (compound, calibration- calibration curve and correlation coefficient, content found in fortified samples; DIFF-percentage error; RT- retention time).

7.2.4 Analiza statistică

Toate analizele statistice au fost efectuate folosind StatSoft Tibco Statistica, versiunea 14.0. Analiza univariată a varianței a fost aplicată pentru a compara nivelurile de amine biogene în cazul diferitelor soiuri de vin (Cabernet Sauvignon, Cabernet Sauvignon roze, Fetească regală, Fetească regală Frizzante), precum și între vinurile tratate cu și fără dioxid de sulf. Când au fost înregistrate valori diferite ale concentrațiilor, testul diferenței semnificative minime (LSD) a fost aplicat pentru a determina care valori medii aveau diferențe semnificative. Ca surse de amine biogene, au fost considerate procesele de decarboxilare și dezaminare ale aminoacizilor. Factorul de corelație pentru relația directă de formare a aminelor biogene din aminoacidul corespunzător a fost evaluat prin monitorizarea variației nivelurilor aminoacidului respectiv și aminei biogene respective din probe. Variația

concentrației în funcție de an, soi și tratament a fost luată în considerare. Analiza componentelor principale a fost aplicată pentru a evalua distribuția variabilelor continue (amine biogene și aminoacizi) în cazul existenței mai multor variabile de grupare puternic corelate (fermentație, soi, an de vinificație, SO₂).

7.3 Rezultate și discuții

În ceea ce privește spectrele aminelor biogene doar etanolamină (ETH), putrescină (PUT), tiramină (TIRM), cadaverină (CAD), histamină (HIS), feniletilamină (FEM), triptamină (TRPM) și spermidină (SPMD) au fost găsite în concentrații detectabile. Alte amine analizate nu au fost găsite sau concentrația detectată a variat între limita de cuantificare și limita de detecție (Vanda ș.a., 2017). Cromatograma reprezentativă este reprezentată în fig. 7.1.

7.3.1 Concentrația de aminoacizi în relație cu aminele biogene

În diversele etape de vinificație a vinului, faza principală este fermentația alcoolică folosind *Saccharomyces cerevisiae* și promotori de fermentație. Producerea vinurilor cu conținut scăzut de dioxid de sulf este o provocare deoarece facilitează creșterea bacteriilor și procesele de oxidare (Tedesco ș.a., 2022).

Aminele biogene au o sursă directă de aminoacizi prin decarboxilare care se formează în timpul fermentației alcoolice sau provin din struguri și musturi. Mai multe tulpini de fermentație facilitează formarea de aminoacizi, dar caracteristicile fizico-chimice ale vinului induc decarboxilarea și formarea de amine biogene. Fermentația malolactică cu ajutorul bacteriilor acidului lactic amplifică procesul de formare a aminelor biogene (Herbert ș.a., 2005).

A fost monitorizată corelația dintre aminele biogene și aminoacizi ca produși de decarboxilare. Monitorizarea a fost diferențiată și comparată între probele cu SO₂ și fără SO₂.

Conținutul de amine biogene corelate cu aminoacizii din vinuri este sintetizat în tabelul 7.3 și prezentat în funcție de soi, origine și tip de vin în fig. 7.1.

Aminele biogene sunt furnizate de aminoacizi prin reacții de decarboxilare și dezaminare. Fermentația malolactică folosind bacterii lactice amplifică procesul de formare a aminelor biogene. Decarboxilarea este produsă sub activitatea enzimelor, care sunt responsabile de procesele biochimice.

Aceste enzime de decarboxilare sunt specifice substratului reacției și aminoacizilor corespunzători. Majoritatea aminelor biogene au o singură cale de formare, astfel că HISM (histamina) poate fi formată prin conversia HIS (histidină) prin histidină decarboxilază (HDC), LIS (lisina) poate fi convertită în CAD (cadaverină) prin lizin decarboxilază (LDC), iar tirozina decarboxilază (TDC) poate transforma tirozina (TIR) și fenilalanina (FE) în tiramină (TIRM) și feniletilamină (FEM). (Costantini A. ș.a., 2013).

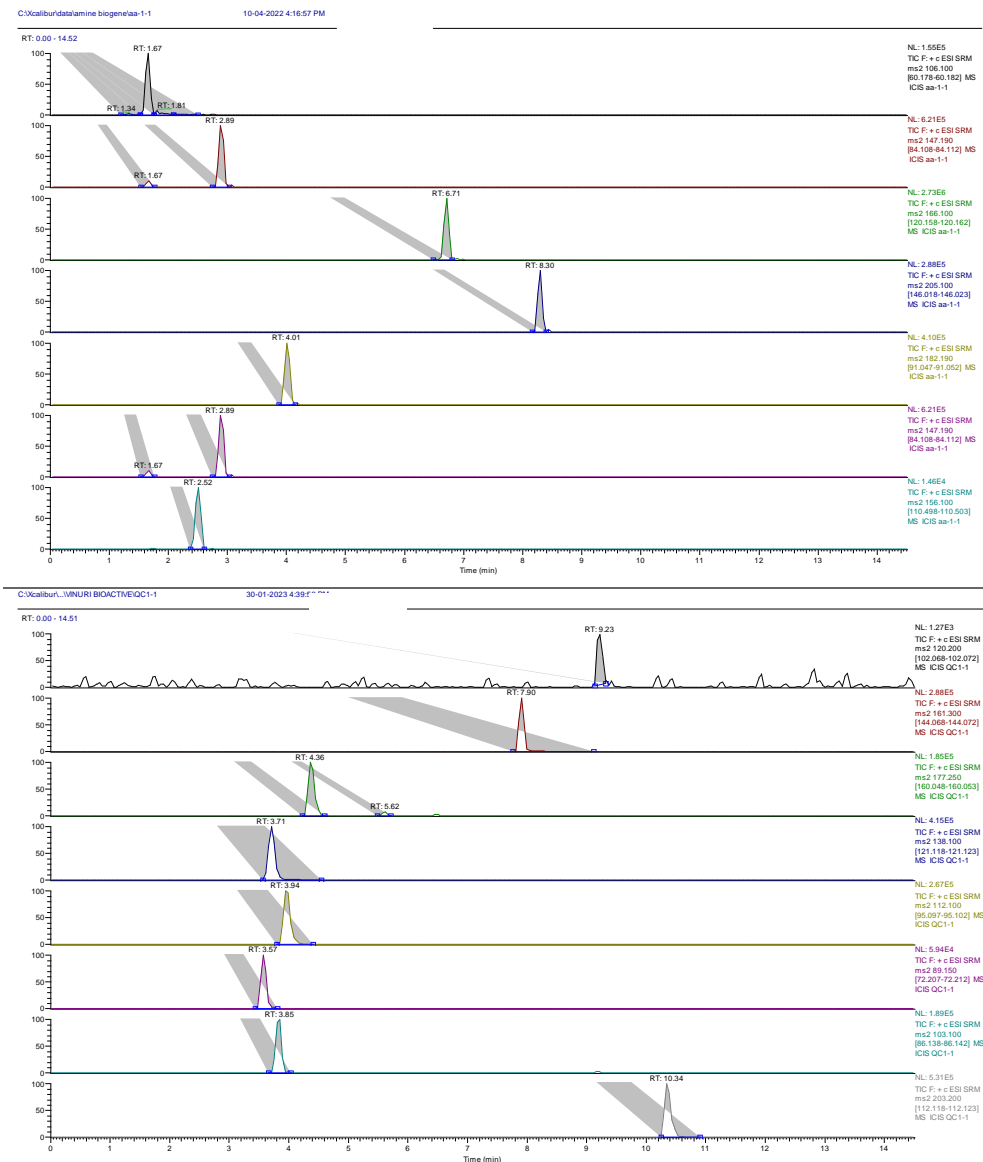


Figura 7.1. Soluție standard 20 mg/L (distribuția aminelor biogene și a amino-acizilor în cadrul metodei de determinare).

Figure 7.1. Standard solution 20 ppm (distribution of biogenic amines and amino acids within the determination method).

Nivelurile de TIRM (tiramină) au fost mai mici decât datele raportate în literatura de specialitate, cu niveluri de 110.8 mg/L pentru vinurile albe și 38.8 mg/L pentru vinurile roșii (Vidal-Carou ș.a., 1990). În determinările noastre, valorile de 4.85 ± 3.2 mg/L (CS-SO₂) și 14.62 ± 1.5 mg/L (CS + SO₂) au fost cele mai mari, în contrast cu FR, care a avut 0.12 ± 0.04 mg/L (FR + SO₂) și 0.25 ± 0.1 mg/L (FRF + SO₂). TIR (tirozina) a avut un comportament diferit; CS + SO₂, FR + SO₂ și FRF + SO₂ au scăzut pe parcursul perioadei de maturare, dar pentru probele fără SO₂,

evoluția a fost diferită și a arătat o creștere a TIRM, în timp ce TIR a avut o scădere continuă pentru CSR + SO₂ ($r = 0.91$, $p < 0.1$) (Mandla K. ș.a., 2017).

<i>T</i>	<i>V</i>	<i>ETH</i>	<i>SER</i>	<i>PUT</i>	<i>GLU</i>	<i>TIRM</i>	<i>TIR</i>
<i>MF</i>	CS1	12.31 ± 1.8	20.18 ± 2.9	35.91 ± 2.3	14.29 ± 12.9	14.6 ± 1.5	1.19 ± 0.8
<i>AF</i>	CSR1	9.51 ± 1.9	10.02 ± 1.5	17.01 ± 2.4	13.67 ± 10.9	1.97 ± 1.5	2.87 ± 1.3
<i>AF</i>	FR1	10.03 ± 2.9	10.13 ± 4.2	23.77 ± 5.5	4.38 ± 2.3	0.12 ± 0.04	3.86 ± 1.6
<i>AF</i>	FRF1	12.78 ± 2.3	7.13 ± 1.8	20.78 ± 3.2	2.22 ± 1.0	0.43 ± 0.3	4.48 ± 1.3
<i>MF</i>	CS0	13.18 ± 2.6	11.73 ± 1.9	31.25 ± 2.9	32.19 ± 17.1	4.85 ± 3.2	2.52 ± 0.6
<i>MF</i>	CSR0	6.06 ± 2.3	5.25 ± 0.6	23.72 ± 4.8	15.63 ± 14.2	0.59 ± 0.2	4.53 ± 1.2
<i>MF</i>	FR0	11.93 ± 1.3	13.67 ± 2.3	26.26 ± 7.0	8.94 ± 6.5	0.06 ± 0.06	5.79 ± 2.1
<i>MF</i>	FRF0	14.58 ± 1.3	6.85 ± 3.6	15.86 ± 4.7	1.32 ± 0.3	0.25 ± 0.1	3.77 ± 1.0
<i>T</i>	<i>V</i>	<i>CAD</i>	<i>LIS</i>	<i>HISM</i>	<i>HIS</i>	<i>FEM</i>	<i>FE</i>
<i>MF</i>	CS1	4.44 ± 1.0	22.61 ± 2.9	0.63 ± 0.0	67.66 ± 0.6	0.12 ± 0.02	13.82 ± 1.0
<i>AF</i>	CSR1	1.44 ± 0.6	41.54 ± 9.0	2.00 ± 1.6	67.60 ± 0.5	0.15 ± 0.1	18.65 ± 3.9
<i>AF</i>	FR1	0.55 ± 0.2	26.85 ± 7.5	2.67 ± 2.2	68.64 ± 2.3	0.17 ± 0.1	12.04 ± 3.4
<i>AF</i>	FRF1	0.28 ± 0.0	24.13 ± 6.5	0.44 ± 0.1	66.79 ± 1.1	0.15 ± 0.1	12.43 ± 2.8
<i>MF</i>	CS0	4.36 ± 1.2	23.15 ± 8.0	0.85 ± 0.1	68.03 ± 1.0	0.09 ± 0.01	13.28 ± 2.9
<i>MF</i>	CSR0	0.92 ± 0.3	24.06 ± 4.0	1.08 ± 0.6	64.83 ± 4.1	0.09 ± 0.02	11.03 ± 2.1
<i>MF</i>	FR0	1.28 ± 0.5	41.87 ± 5.3	2.33 ± 2.0	66.96 ± 1.4	0.14 ± 0.01	18.20 ± 2.7
<i>MF</i>	FRF0	1.48 ± 0.8	13.21 ± 2.6	0.17 ± 0.0	70.97 ± 0.6	0.21 ± 0.10	9.79 ± 3.2
<i>T</i>	<i>V</i>	<i>TRPM</i>	<i>TRP</i>	<i>SPD</i>	<i>ARG</i>		
<i>MF</i>	CS1	0.06 ± 0.02	4.42 ± 0.4	7.27 ± 0.1	9.42 ± 7.4		
<i>AF</i>	CSR1	0.06 ± 0.02	2.73 ± 0.7	5.49 ± 1.4	12.40 ± 9.2		
<i>AF</i>	FR1	0.04 ± 0.0	2.88 ± 1.3	9.79 ± 7.2	5.37 ± 1.8		
<i>AF</i>	FRF1	0.03 ± 0.01	1.98 ± 0.8	2.56 ± 1.2	10.40 ± 5.8		
<i>MF</i>	CS0	0.06 ± 0.01	2.83 ± 0.8	8.09 ± 0.7	15.16 ± 8.0		
<i>MF</i>	CSR0	0.04 ± 0.01	1.37 ± 0.8	4.05 ± 1.7	8.14 ± 7.7		
<i>MF</i>	FR0	0.05 ± 0.0	2.24 ± 0.7	2.94 ± 0.9	8.03 ± 4.2		
<i>MF</i>	FRF0	0.05 ± 0.02	0.85 ± 0.1	0.99 ± 0.2	13.13 ± 5.4		

Tabel 7.3. Distribuția aminelor biogenice și aminoacizilor în funcție de tip de vin (CS, CSR, FR și FRF) în funcție de tratament cu dioxid de sulf (*T* – tip de fermentație; *V* – varietate de vin).

Table 7.3. Distribution of biogenic amines and amino acids according to wine type (CS, CSR, FR and FRF) according to sulfur dioxide treatment (*T* – fermentation type; *V* – wine variety).

LIS (lisina) a fost unul dintre cei mai abundenți aminoacizi din probele analizate, 13.0 ± 2.6 mg/L pentru FRF-SO₂ și 41.54 ± 9.0 mg/L pentru CSR + SO₂. Diferențe semnificative au fost observate pentru FR, 26.85 ± 7.5 mg/L (FR + SO₂) și 41.87 ± 5.3 mg/L (FR-SO₂). De asemenea, pentru probele +SO₂, a avut loc o ușoară scădere a LIS de la 30.0 ± 8.2 mg/L (2021) la 28.53 ± 3.9 mg/L (2018) (Henríquez-Aedo ș.a., 2018). Decarboxilarea în CAD (cadaverină) este favorizată de una dintre cele mai mari valori ale pH-ului din seria de amine biogene. Studiile au arătat că reacția este favorizată de valori ale pH-ului de până la 8.0 și de temperaturi ridicate de 50 °C (Costantini ș.a., 2013). Corelații directe ale CAD și LIS au fost înregistrate pentru FRF-SO₂ cu o scădere a LIS și o creștere a CAD, $r = -0.998$ ($p < 0.05$), dar

pentru FR + SO₂, ambele substanțe au arătat o corelație mai mică (tabel 7.4). CS a avut o creștere directă a LIS și CAD ($r = 0.918$, $p < 0,1$) pentru probele +SO₂, în timp ce în cazul probelor -SO₂, a produs o creștere a LIS, în timp ce CAD a scăzut pe parcursul perioadei de învechire de la 1.41 ± 0.7 mg/L (2021) la 2.47 ± 0.7 mg/L (2019) și 1.92 ± 0.6 mg/L (CS018) (tabel 7.4).

S-au găsit corelații semnificative pentru FRF-SO₂, care au arătat o scădere a HIS (histidinei), în timp ce HISM (histamina) a crescut, la fel ca pentru CSR-SO₂, $r = -0.98$ ($p < 0.05$), dar variația a arătat o creștere a HIS și o scădere a HISM (tabel 7.4) În unele studii, l-histidina a fost raportată a fi între 19.0 mg/L și 1.8 mg/L pentru soiurile roșii (Jayarajah ș.a., 2007), în timp ce alte studii (Martín-Álvarez ș.a., 2006) au raportat valori între 10 mg/L și 16 mg/L. În studiile noastre, doar vinurile roze au dat valori mai mari pentru HIS.

Unele evoluții au fost înregistrate pentru CS+SO₂: valorile FE (fenilalanina) s-au menținut de la 15.25 ± 3.3 mg/L (2021) la 14.49 ± 1.8 mg/L (2018), în timp ce FEM (feniletilamina) a avut aceeași tendință de la 0.15 ± 0.03 mg/L la 0.14 ± 0.03 mg/L, deși unele corelații au fost găsite doar pentru FRF-SO₂ ($r = 0.91$ ($p < 0,1$)) și FRF + SO₂ ($r = -0.99$; $p < 0.05$) (tabel 7.5) (Vinci ș.a., 2021).

Două situații diferite au produs o variație în creșterea TRPM (triptaminei) corelând cu o scădere a TRP (triptofan) pentru CSR + SO₂ ($r = -0.99$; $p < 0.05$), dar variația inversă a corelat cu degradarea ambilor compuși (CS-SO₂) ($r = 0.95$, ($p < 0.05$)), (FR-SO₂) ($r = 0.99$; $p < 0.05$) (Fracassetti ș.a., 2019).

Evaluând la nivel de varietate, au fost înregistrate proporții diferite, cu valori mai mari de GLU (glutamina) (14.29 ± 12.9 mg/L (CS + SO₂) și 32.19 ± 17.1 mg/L (CS-SO₂)) pentru probele CS, în timp ce valorile pentru ARG (arginină) au fost (9.42 ± 7.4 mg/L (CS + SO₂) și 15.6 ± 0.5 mg/L (CS-SO₂)) (tabel 7.3). Într-un raport diferit, nivelurile de GLU și ARG au fost găsite în FRF + SO₂ la 2.22 ± 1.0 mg/L (GLU) și 10.40 ± 5.8 mg/L (ARG), similar cu nivelurile pentru FRF-SO₂ (1.32 ± 0.3 mg/L (GLU) și 13.3 ± 5.4 mg/L (ARG)). Concentrațiile mai mici ale GLU în vinurile albe este atribuită proporției mai mici de acid glutamic utilizat în timpul fermentației cu levuri (1.32 ± 0.3 mg/L (FRF-SO₂)) și 2.22 ± 1.0 mg/L (FRF + SO₂)), în timp ce pentru probele CS, acidul glutamic a fost folosit în principal. Corelațiile între acidul glutamic și glutamină au arătat variații invers proporționale cu un grad ridicat de corelație, în special în cazul FRF + SO₂ ($r = -0.94$, $p < 0.05$) și FR + SO₂ ($r = -0.99$, $p < 0.05$). În ceea ce privește variația și stabilitatea GLU în cadrul aceleiași serii, acesta servește drept donor de azot în calea metabolică a levurilor și a suferit diverse modificări, valorile variind de la 33.47 ± 9.0 mg/L pentru probele din 2021 la $1.21 \pm 0,1$ mg/L pentru probele din 2018 (tabel 7.4). Totuși, diferențele au fost evidente între probele cu și fără SO₂, cu niveluri ușor mai mici pentru toate varietățile din studiu. Absența SO₂ a dus la creșterea activității bacteriilor lactice, a enzimelor de tip pirolina-5-carboxilat sintetază (P5CS), a enzimelor hidrolitice, a levurilor precum și

a compușilor citoplasmatici cum ar fi peptidele, acizii grași și nucleotidele prezente în probele de vin (Huang ș.a., 1991).

AN	ETH	SER	PUT	GLU	TIRM	TIR
2018	9.05 ± 1.70	11.38 ± 2.4	27.78 ± 4.5	1.21 ± 0.1	3.39 ± 2.1	3.35 ± 0.8
2019	12.42 ± 1.4	11.34 ± 1.4	26.77 ± 2.2	2.09 ± 0.5	2.18 ± 1.5	2.77 ± 0.5
2020	10.43 ± 1.4	10.68 ± 2.9	22.35 ± 2.9	9.54 ± 6.9	2.42 ± 1.9	3.27 ± 0.7
2021	13.30 ± 1.5	9.07 ± 2.3	20.37 ± 4.0	33.47 ± 9.0	3.46 ± 2.2	5.11 ± 1.4
AN	CAD	LIS	HISM	HIS	FEM	FE
2018	1.92 ± 0.6	28.53 ± 3.9	2.51 ± 1.3	69.00 ± 0.8	0.14 ± 0.03	14.49 ± 1.8
2019	2.47 ± 0.7	26.55 ± 3.0	0.47 ± 0.1	68.37 ± 0.5	0.13 ± 0.03	13.11 ± 1.1
2020	1.57 ± 0.7	23.62 ± 4.1	0.51 ± 0.1	67.97 ± 1.1	0.13 ± 0.02	11.77 ± 1.6
2021	1.41 ± 0.7	30.00 ± 8.2	1.59 ± 0.7	65.39 ± 2.0	0.15 ± 0.03	15.25 ± 3.3
AN	CAD	LIS	HISM	HIS		
2018	1.92 ± 0.6	28.53 ± 3.9	2.51 ± 1.3	69.00 ± 0.8		
2019	2.47 ± 0.7	26.55 ± 3.0	0.47 ± 0.1	68.37 ± 0.5		
2020	1.57 ± 0.7	23.62 ± 4.1	0.51 ± 0.1	67.97 ± 1.1		
2021	1.41 ± 0.7	30.00 ± 8.2	1.59 ± 0.7	65.39 ± 2.0		

Tabel 7.4. Valorile medii pentru aminele biogene și aminoacizii în funcție de variația în timpul perioadei de maturare a vinului.

Table 7.4. Mean values for biogenic amines and amino acids as a function of variation during wine aging.

Cabernet Sauvignon (CS, CSR) a prezentat niveluri superioare de GLU comparativ cu vinurile FR (FR și FRF), variind de la 14.29 ± 12.9 mg/L pentru CS + SO₂ la 32.19 ± 17.1 mg/L pentru CS-SO₂, comparativ cu 1.32 ± 0.3 mg/L pentru FRF-SO₂ și 2.22 ± 1.0 mg/L pentru FRF + SO₂. Din distribuția valorilor pe perioada de monitorizare, evoluțiile au fost similare în nivelul tuturor vinurilor roșii (CS0, CS1, CSR0 și CSR1), dar a fost observată o instabilitate mai mare în cazul vinurilor albe.

Ca și în cazul altor aminoacizi, nivelurile de ARG (arginină) au fost mai ridicate pentru vinurile roșii și rozé. Pentru CS + SO₂ și CS-SO₂, valorile inițiale au fost de 9.42 ± 7.4 mg/L și respectiv 15.16 ± 8.0 mg/L. O variație comparativă a fost înregistrată pentru ARG, dar la sfârșitul evoluției, nivelurile au fost de 23.04 ± 4.5 mg/L (2021) și 4.13 ± 3.1 mg/L (2018); valori similare au fost înregistrate pentru GLU, arătând o tendință similară în ceea ce privește degradarea. Niveluri mai mici au fost găsite pentru FR, cu valori medii de 5.37 ± 1.8 mg/L (FR + SO₂) și 8.03 ± 4.2 mg/L (FR-SO₂). SPD (spermidină) a prezentat niveluri superioare pentru vinurile roșii (CS) ($r = -1.00$, $p < 0.05$) (fig. 7.2(a)) și vinurile rozé (CSR) și, de asemenea, a arătat o tendință de creștere de la 3.42 ± 1.1 mg/L (2021) la 4.84 ± 1.1 mg/L (CSR018) (CS-SO₂) ($r = -0.96$, $p < 0.05$) (fig. 7.2(c)). În cazul a patru probe, s-au găsit corelații directe între scăderea ARG și creșterea SPD. Fetească regală Frizzante FRF + SO₂ a înregistrat un coeficient de corelație $r = -0.98$ ($p < 0.05$) (fig. 7.2(b)), în timp ce corelația ARG cu PUT (putrescină) a arătat o variație pentru CSR-SO₂ ($r = -0.96$, $p < 0.05$) (fig. 7.2(d)).

	CS		CSR		FR		FRF	
(R/P)	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂	-SO ₂	+SO ₂
SPD:ARG	-0.991 *	0.300	0.561	-0.915	-0.991 *	0.363	0.201	-0.980 *
	0.01	0.70	0.44	0.09	0.01	0.64	0.80	0.02
TRPM:TRP	0.956 *	-0.814	-0.763	-0.995 *	0.999 *	0.909	0.903	-0.736
	0.04	0.19	0.24	0.01	0.00	0.09	0.10	0.26
PHEM:PHE	0.862	-0.408	0.694	0.682	-0.189	0.601	0.998 *	0.912
	0.14	0.59	0.31	0.32	0.81	0.40	0.00	0.09
HYSM:HYS	-0.376	-0.632	-0.987 *	-0.247	0.390	0.563	-0.857	0.453
	0.62	0.37	0.01	0.75	0.61	0.44	0.14	0.55
CAD:LYS	-0.786	0.919	-0.508	0.499	-0.906	0.964 *	0.998 *	-0.593
	0.21	0.08	0.49	0.50	0.09	0.04	0.00	0.41
TYRM:TYR	0.742	0.768	0.915	-0.652	-0.859	0.861	0.176	0.493
	0.26	0.23	0.08	0.35	0.14	0.14	0.82	0.51
ETH:SER	0.703	-0.047	0.625	-0.403	0.385	0.939	0.823	0.919
	0.30	0.95	0.38	0.60	0.62	0.06	0.18	0.08
PUT:GLU	-0.052	-0.747	-0.883	-0.256	0.555	-0.757	0.767	-0.909
	0.95	0.25	0.12	0.74	0.45	0.24	0.23	0.09

Tabel 7.5. Valorile medii pentru aminele biogene și aminoacizii în funcție de variația în timpul perioadei de învechire a vinului ($p < 0.05$).*

Table 7.5. Mean values for biogenic amines and amino acids as a function of variation during the wine aging period ($p < 0.05$).*

Nivelurile de PUT (putrescină) au fost cele mai ridicate, cu concentrații variind de la 35.91 ± 2.3 mg/L (CS + SO₂) la 15.86 ± 4.7 mg/L (FRF-SO₂). De fapt, a existat o corelație directă între PUT și SPD (spermidină), cu concentrații variind de la 2.56 ± 1.2 mg/L (FRF + SO₂) la 9.79 ± 7.2 mg/L (FR + SO₂). Valorile înregistrate ale PUT au fost cele mai ridicate în seria de amine biogene și au fost legate de efectul acizilor dl-lactic, l-malic, dl-malic, tartric și citric asupra reacției de formare a PUT, care se consideră că are o influență semnificativă. Rezultatele au indicat că doar acizii lactic și tartric au modificat sinteza putrescinei, prezentând un efect stimulat, care s-a corelat liniar cu concentrația de acid organic în intervalul de 1.0 până la 10 g/L (Anl ș.a., 2009). Corecțiile de aciditate au fost efectuate pentru toate vinurile din studiu în diverse momente înainte de îmbuteliere cu doze de acid lactic de 6.0 ± 0.3 g/L echivalent în acid tartric.

Compoziția drojdiei de vin (sau sedimentul de vin) după fermentație constă în celule de levuri inactivate, bacterii, pereți celulari, carbohidrați, proteine și diverse materiale fenolice, toate acestea servind drept surse de aminoacizi. Au fost calculate diferite niveluri de aminoacizi individual între vinurile stabilizate final (RS) și probele de vin brute (RW) care erau încă în contact cu drojdia de vin.

Eliminarea sedimentelor de drojdie prin decantare a redus conținutul de componente ale mediului de vin care eliberează cantități suplimentare de aminoacizi și amine biogene. Agenții de clarificare utilizați în procesul de limpezire a vinului, cum ar fi bentonita și gelatina, au un impact asupra nivelurilor de aminoacizi în vin. Acești agenți de clarificare pot lega anumite compuși din vin, inclusiv aminoacizi, în timpul procesului de clarificare.

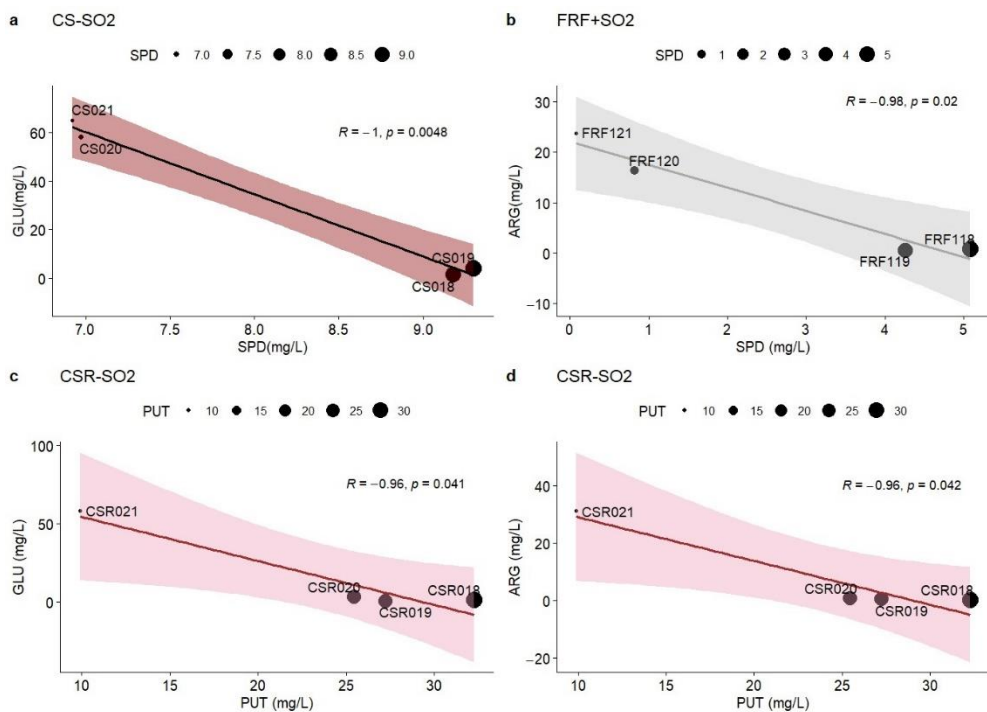


Figura 7.2. Coeficienții de corelație pentru multiple evaluări ale evoluției continue a concentrațiilor de amine biogene (BAs) în raport cu aminoacizii corespunzători (AAs). (a) CS, Pres: -SO₂ GLU:SPD: $r = -0.99$; $p < 0.05$; (b) FRF, Pres: +SO₂ ARG:SPD: $r = 0.98$; $p < 0.05$; (c) CSR, Pres: -SO₂ PUT:GLU: $r = -0.95$; $p < 0.05$; (d) CSR, Pres: -SO₂ PUT:SPD: $r = -0.96$; $p < 0.05$.

Figure 7.2. Correlation coefficients for multiple assessments of the continuous evolution of concentrations of biogenic amines (BAs) relative to the corresponding amino acids (AAs). (a) CS, Pres: -SO₂ GLU:SPD: $r = -0.99$; $p < 0.05$; (b) FRF, Pres: +SO₂ ARG:SPD: $r = 0.98$; $p < 0.05$; (c) CSR, Pres: -SO₂ PUT:GLU: $r = -0.95$; $p < 0.05$; (d) CSR, Pres: -SO₂ PUT:SPD: $r = -0.96$; $p < 0.05$.

Pentru unii aminoacizi și amine biogene, s-a confirmat complexarea cu componentele agenților de clarificare: GLU (22.90 ± 12.1 mg/L (RS) \rightarrow 0.87 ± 0.28 mg/L (RW)) (CSR), TRP (2.92 ± 0.6 mg/L (RS) \rightarrow 0.60 ± 0.005 mg/L (RW)) (CS), și ARG (16.19 ± 0.40 mg/L (RS) \rightarrow 0.40 ± 0.09 mg/L (RW)) (CSR). În alte cazuri, valorile au fost superioare pentru vinurile care au fost filtrate și stabilizate, confirmate de valorile SER (11.88 ± 3.37 mg/L (RS) \rightarrow 11.90 ± 3.75 mg/L (RW)) (FR), HIS (64.48 ± 2.96 mg/L (RS) \rightarrow 69.10 ± 0.96 mg/L (RW)) (CSR), LIS (21.98 ± 5.23 mg/L (RS) \rightarrow 23.77 ± 6.67 mg/L (RW)) (CS), și FE (13.38 ± 1.02 mg/L (RS) \rightarrow 13.71 ± 2.89 mg/L (RW)) (CS) (fig. 7.3). Conform procentului de concentrații rămase în probele stabilizate, valorile au fost menținute în următoarele proporții procentuale: SER (45:55), GLU (59:41), TIR (54:46), LIS (49:51), HIS (51:49), PHE (48:52), TRP (44:56), ARG (41:59), și amine biogene (ETH (45:55), PUT (58:42), TIRM (66:34), CAD (47:53), HISM (16:84), FEM (36:61), TRPM (56:44), și SPD (46:34) (%: %)).

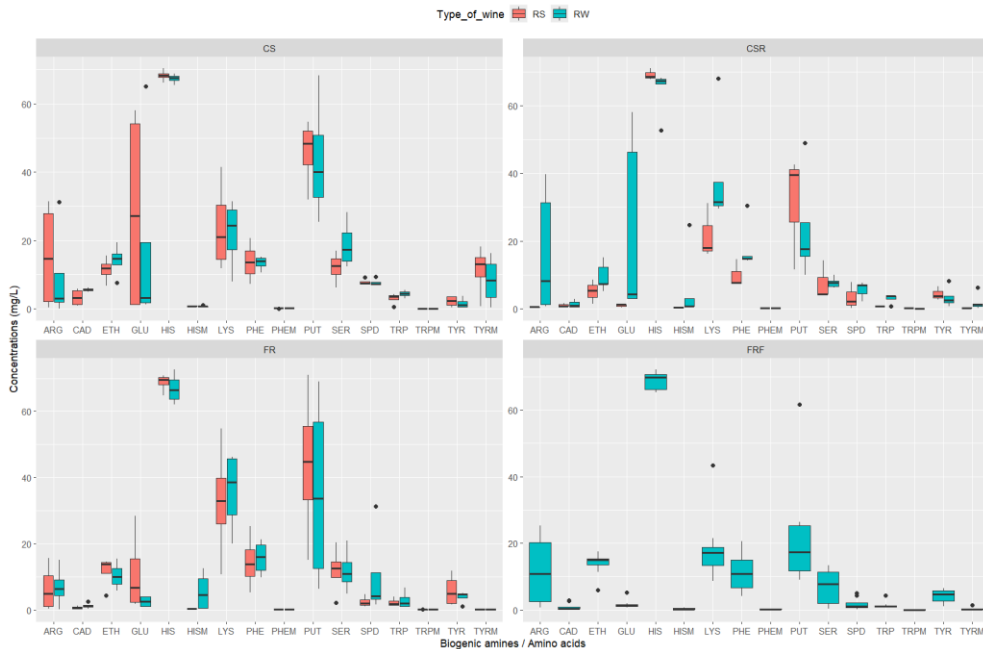


Figura 7.3. Raportul concentrațiilor (mg/L) pentru AA în vinurile brute (RW) și în vinurile stabilizate (RS).

Figure 7.3. Concentration ratio (mg/L) for AA in raw wines (RW) and stabilized wines (RS).

Fermentația malolactică a avut o influență semnificativă asupra aminelor biogene, cu cele mai ridicate niveluri înregistrate pentru FRF-SO₂, care a prezentat valori superioare pentru toate aminele biogene în contrast cu aminoacizii corespunzători. Maturarea a fost identificată ca un posibil co-factor, în special pentru FRF, unde drojdia a rămas în contact cu vinul (Smit ș.a., 2008). Comparând probele cu stabilizare, diferențele cele mai importante în raport cu vinurile brute au fost observate pentru PUT (+4.92 mg/L), ETH (+1.80 mg/L), CAD (+1.20 mg/L), iar SPD a avut o reducere de -1.57 mg/L, în timp ce alți aminoacizi au avut și ei valori superioare, dar cu modificări mai mici. Au existat corelații directe între SER, LYS, HIS, PHE și ARG. Pentru fermentația malolactică s-a utilizat *Oenococcus oeni* în doze de 25 g/hL. Pentru CS, s-au obținut nivele superioare ale unor amine biogene datorită macerației, care a permis transferul acestora din struguri. PUT cu concentrații de 35.90 ± 2.3 mg/L pentru CS1, 26.26 ± 6.99 mg/L pentru FR0 și 20.77 ± 3.16 mg/L pentru FRF1 sunt reprezentative (Paramithiotis ș.a., 2022).

Aciditatea volatilă pentru probele -SO₂ a fost similară cu cea a probelor +SO₂. Aceste valori au fost între intervalul optim de 0.12 și 0.45 g acid acetic/L, indicând că vinurile nu au prezentat probleme legate de conservare sau alte proprietăți organoleptice. Acest lucru a fost confirmat și de nivelurile de prolină, care au arătat o bună stabilitate. Zaharurile reduse ale vinurilor recent finisate au fost mai mici de 5.0 g/L, indicând că fermentația a ajuns la sec. Scăderea zaharurilor reduse după

stabilizare și maturarea vinurilor ar putea influența activitatea microbiană, probabil datorită prezenței de bacterii lactice și acetice (Tabelul 7.6).

	TA	AT	AV	SO ₂ liber	SO ₂ total	ZR	PH
CSI	13.4±0.071	6.7±1.011	0.43±0.064	20.3±0.283	49.2±1.061	4.5±0.735	3.6±0.007
CS0	13.4±0.208	6.6±0.321	0.66±0.036	4.9±0.115	10.1±0.295	2.9±0.900	3.1±0.025
CSr1	12.3±0.954	6.9±0.896	0.47±0.076	41.0±1.732	50.6±11.547	9.0±0.603	3.1±0.060
CSR0	13.6±0.035	6.1±0.071	0.63±0.078	4.7±0.354	10.2±0.354	0.7±0.014	3.1±0.035
FR1	12.1±0.566	6.1±0.035	0.48±0.042	38.5±0.707	50.5±4.950	8.0±1.315	3.1±0.049
FR0	12.2±0.071	6.1±0.106	0.34±0.014	7.5±3.536	12.0±2.828	1.6±0.035	3.2±0.071
FRF1	12.9±0.424	6.0±0.742	0.37±0.184	36.0±1.799	56.5±9.192	1.8±0.049	3.2±0.057
FRF0	11.3±0.707	6.1±0.035	0.34±0.049	4.9±0.212	10.5±0.707	0.7±0.354	3.2±0.071

Tabel 7.6. Valori medii pentru AT - aciditate totală (g acid tartric/L), TA – conținut de alcool (g/L), VA – aciditate volatilă (g acid acetic/L), SO₂ liber – conținut de dioxid de sulf liber (mg /L); SO₂ total - conținut de dioxid de sulf total (mg/L); RS – zahăr rezidual (g/L).

Table 7.6. Average values for AT - total acidity (g tartaric acid/L), TA - alcohol content (g/L), VA - volatile acidity (g acetic acid/L), free SO₂ - free sulfur dioxide content (mg / IT); Total SO₂ - total sulfur dioxide content (mg/L); RS – residual sugar (g/L).

7.3.2 Analiza componentelor principale

Categorizarea eșantioanelor cu variabile grupate corelat a permis evaluarea existenței diferenței clare între aminoacizi și amine biogene în ambele clase de vinuri. Eșantioanele cu fermentație malolactică au fost asociate cu absența dioxidului de sulf. Din datele anterioare, absența SO₂ nu a influențat stabilitatea eșantioanelor, astfel că s-a realizat o clasificare a distribuției din perspectiva fermentației malolactice și alcoolice folosind analiza componentelor principale.

Figura 7.4 prezintă cele două dimensiuni ale modelului componentelor principale aplicat fiecărei varietăți de vin pentru identificarea clusterelor specifice, fiecare identificând contribuția variabilelor modelului la caracterizările vinului. În cazul fiecărei varietăți, distribuția clasificării componentelor a fost diferită. Prima componentă principală (PC1) poate fi asociată cu varietatea, respectiv CS, CSR, FR și FRF, având o contribuție de 26.1%, iar PC2, care caracteriza tipul de fermentație (fermentație malolactică și fermentație alcoolică) a avut o contribuție de 17.1%.

Prezența dioxidului de sulf nu a fost un factor care să influențeze componentele principale și, prin urmare, nu a fost considerat un criteriu de diferențiere. Au fost aplicate valori semnificative pentru ANOVA pe un singur factor (varietăți), iar variabilele care au fost statistic diferite au fost SER, LIS, CAD și TIRM. În acest context, observațiile din analiza testului mult variat folosind testul post hoc Tukey au arătat că rezultatele nu au fost diferite statistic atunci când a fost aplicat criteriul dioxidului de sulf. Analiza a confirmat comportamentul aminoacizilor și a aminelor biogene pe factorii de încărcare cu influență asupra variabilelor în proiecția datelor. Cu excepția TIR, HIS și SPD (fig. 7.7(a)), aminele biogene și aminoacizii rămași au fost corelați pozitiv de-a lungul primei componente principale (PC1), care diferențiază varietățile de vin incluse în studiu. Conform celei de-a doua

componente principale (PC2), contribuțiile cele mai mari au fost determinate de aminele biogene produse prin reacții de decarboxilare. Aminele biogene produse în urma reacțiilor de decarboxilare și dezaminare, cum ar fi SPD și PUT, au fost corelate negativ cu PC2 și nu au avut o contribuție semnificativă, indicând o probabilitate de formare în condiții mixte.

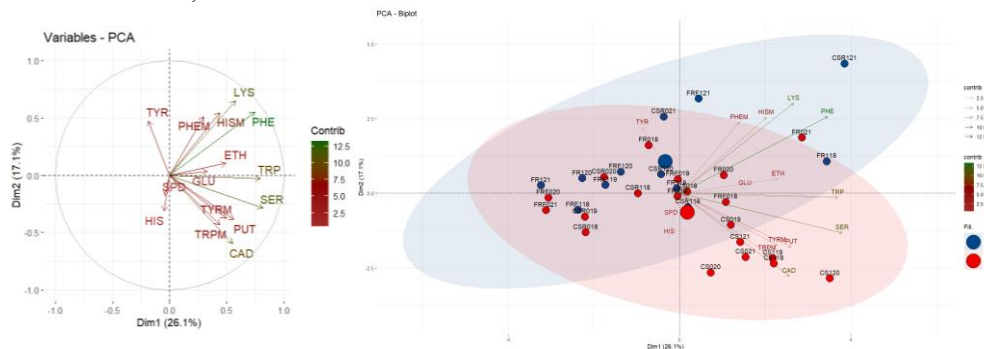


Figura 7.4. Analiza componentelor principale. (a) Corelația dintre variabile și componentele principale (PC) PC1 (26,1%) vs. PC2 (17,1%). (b) Biplot al distribuției eșantioanelor pe harta factorilor de variație.

Figure 7.4. Principal component analysis. (a) Correlation between variables and principal components (PC) PC1 (26.1%) vs. PC2 (17.1%). (b) Biplot of sampling distribution on variance factor map.

Datele sunt în acord cu valorile găsite anterior, unde s-au identificat tendințe finite pentru aminele biogene și aminoacizi (Héberger ș.a., 2003). Din punct de vedere al aminelor biogene, FEM, HISM și ETH au fost excepții, prezentând o corelație pozitivă cu PC1. Acest lucru sugerează că alte amine biogene au fost responsabile pentru diferențierea între anii de vinificație. Pe de altă parte, variabilele corelate negativ conform PC2 au inclus valorile pentru mostrele CS și CSR, rezultând într-un cluster relativ separat, dar fără variații semnificative.

7.4 Discuții privind variația aminoacizilor în corelație cu aminele biogene

7.4.1 Mecanisme propuse de amine biogene în eșantioanele de vin

Au fost monitorizate mai multe corelații pentru a verifica relația directă dintre formarea aminelor biogene din aminoacizi. Aminoacizii ca precursori pentru aminele biogene suferă reacții de decarboxilare sau dezaminare în care un grup carboxilic este înlocuit cu un grup hidroxil. În aceste condiții, HISM este produs din HIS, TIRM din TIR, iar PUT din GLU, iar ARG este precursorul SPD. PUT și SPD pot fi formate prin două căi diferite. Prima, sub acțiunea ornitin decarboxilazei (ODC), ornitina poate fi convertită în PUT. A doua cale este formarea PUT după deaminarea agmatinei folosind agmatinaza (AGM). SPM și SPD sunt poliamine derivate din PUT. Sistemul agmatinei constă din trei enzime: agmatină deiminază, putrescină carbamoiltransferază și carbamat kinază. Relația între sursele de aminoacizi este

determinată de GLU și ARG deoarece ambele sunt implicate în formarea de intermediari agmatină și ornitină (Molderings ș.a., 2012).

Produsele metabolismului GLU au fost demonstrate în principal a fi glutamat și amoniac, cu cantități relativ mici de ornitină formată. Formarea glutamatului și a amoniacului din glutamină urmează reacții precum dehidrogenarea oxidativă. Sinteza ornitinei din GLU este considerată să se producă prin acțiunea unei enzime de reglare în sinteza ornitinei din GLU, respectiv P5C sintază P5CS28. Există o relație între SPD și SPM (spermină). SPM este transformată în SPD folosind propilamină ca intermediar. Deoarece propilamina este consumată în reacție, aceasta nu a fost găsită în vinuri. Corelația dintre SPD și ARG este legată de formarea agmatinei și PUT ca intermediari. În plus, PUT este produsă de GLU prin reacția dublă de dezaminare și decarboxilare folosind ornitina ca intermediar. Ornitina derivată din GLU ar putea fi ulterior convertită din ARG, deoarece nivelurile de ARG au fost comparabile cu cele de GLU. Un mecanism nou posibil este considerat pentru formarea agmatinei, care este sintetizată după decarboxilarea ARG de către arginin decarboxilaza (ADC). Biosinteza agmatinei depinde de disponibilitatea ARG. Arginaza convertește ARG în ornitină, care intră în ciclul ureei. În toate speciile, agmatina poate fi metabolizată prin hidroliză în PUT, precursorul poliaminelor spermină și SPD, de către enzima agmatinază. ARG a fost considerată în raport cu PUT și SPD. Conversia SPD din arginină a fost evaluată prin raportul de transformare determinat de scăderea concentrațiilor de ARG și evoluția pozitivă a SPD. Deoarece spermina (SPM) nu a fost detectată, secvența de formare ARG > AGM (agmatina) > SPM > SPD a fost considerată posibilă. Un schemă propusă este prezentată în fig. 7.5.

Vinurile roșii (CS) au prezentat niveluri semnificativ mai mari de amine biogene de 49.54 ± 2.45 mg/L ($523 \mu\text{mol/L}$) în conținutul total, continuând cu vinurile roz (CSR) de 49.08 ± 1.48 mg/L ($452 \mu\text{mol/L}$), FR de 44.91 ± 2.03 mg/L ($386.5 \mu\text{mol/L}$), și în final, FRF de 43.59 ± 2.00 mg/L ($302.3 \mu\text{mol/L}$) (Mandla ș.a., 2017).

pH-ul influențează enzimele de tip decarboxilază prin activarea catalitică, activitățile decarboxilazelor fiind maxime la pH scăzut. Aminele biogene constituie un mecanism de protecție împotriva scăderii de pH, iar acidul lactic produs în condițiile fermentației malolactice favorizează procesul de echilibrare.

Pentru decarboxilaza histidinei (HDC), pH-ul optim este de 4.8; pentru decarboxilaza tirozinei (TDC) pH-ul optim este de 5.0; pentru decarboxilaza ornitinei (ODC) pH-ul optim este de 5.8.

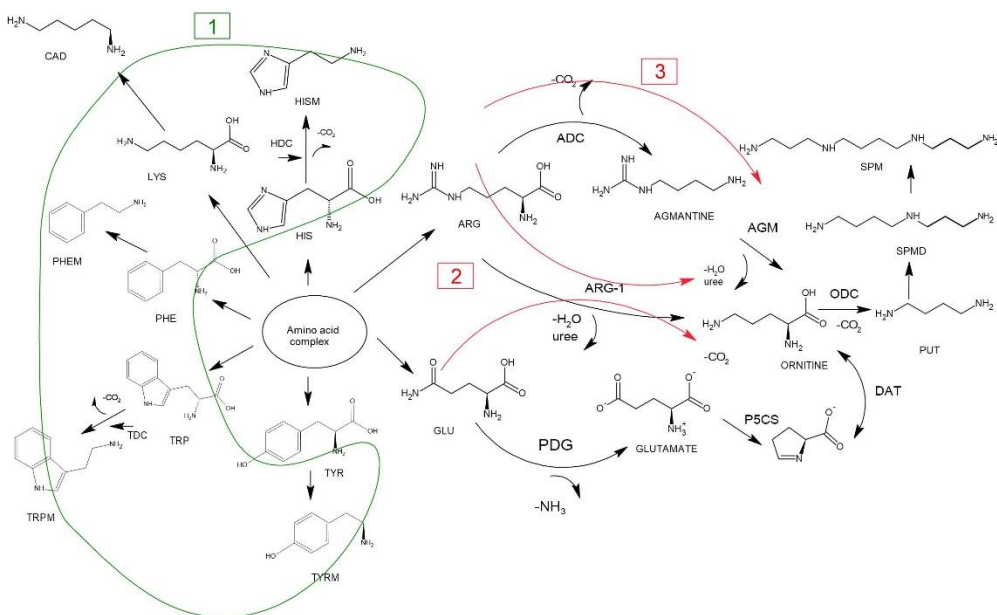


Figura 7.5. Mecanismul propus de decarboxilare și dezaminare pentru a converti aminoacizii în amine biogene.

Figure 7.5. Proposed mechanism of decarboxylation and deamination to convert amino acids to biogenic amines.

Azotul este un nutrient major pentru plante, deci pentru vița de vie are și de reglare a vigurozității și dezvoltării strugurilor. Cantitatea optimă de azot influențează cinetica fermentației și parametrii cum ar fi aromele vinului. Aciditatea totală sau pH-ul sunt importante pentru formarea de amine biogene. Rata decarboxilării aminoacizilor este favorizată de pH. Valorile optime pentru aminele biogene sunt între 4.7 și 5.0 (Yu ș.a., 2021). pH-ul vinurilor a fost menținut la niveluri cuprinse între 3.1 și 3.3 în momentul vinificației. pH-ul, aciditatea, conținutul alcoolic, aciditatea volatilă și conținutul de zahăr au fost monitorizate pentru a verifica condițiile primare care au condus la activarea bacteriilor de acid lactic. În ceea ce privește pH-ul, CS a prezentat valori de pH între 3.00 și 3.74 pentru mostrele fără SO₂ și între 2.91 și 3.72 pentru mostrele cu SO₂. O evaluare similară a fost efectuată pentru CSR (3.12–3.51) pentru mostrele fără SO₂ și 3.38–3.82 pentru mostrele cu SO₂.

Prezența bacteriilor acid lactice (LAB) a facilitat formarea de amine biogene într-un mod similar în comparație cu mostrele care au avut doar fermentație alcoolică. Această evoluție a fost confirmată prin evaluarea celor mai vechi vinuri față de cele mai noi mostre din 2021. Nivelurile de amine biogene și aminoacizi au fost mai mari pentru mostrele cu SO₂ și fără fermentație malolactică. Acest lucru s-a atribuit contactului scurt, acidității mai mari a mostrelor proaspete și caracteristicilor vinului, care influențează flora indigenă cu activitate decarboxilazică diferită. Odată cu maturarea, pH-ul și aciditatea vinurilor au crescut la valori mai mari, în jur de 3.5–

4.0, ceea ce a permis evoluția unor amine biogene. De asemenea, un proces de degradare a fost implicat în acest fenomen (Ayestaran ș.a., 1996).

Variația condițiilor de pH și aciditate totală a vinurilor nu a arătat diferențe statistice între aceste mostre, astfel încât niciun vin nu a dezvoltat creșterea unui mediu bacterian capabil să producă concentrații suplimentare de amine biogene. Doar CAD a avut valori semnificativ diferite între varietăți. În plus, în aceleași condiții, aminele biogene care au avut originea din SER, TIR, HIS și TRP nu au arătat diferențe statistice între mostrele cu +SO₂ și cele cu -SO₂.

După stabilizare și învechire, parametrul nu a înregistrat creșteri specifice, indicând faptul că proprietățile de protecție în vinurile atât de test cât și de control au rămas constante. Aciditatea volatilă este produsă de alterările microbiene, oxidare sau un proces de reducere și este favorizată de oxigenul introdus în timpul perioadei de maturare (Buxaderas ș.a., 2012).

Constituenții sedimentelor de drojdie după fermentația alcoolică/malolactică sunt constituite din substanțe proteice și tanate, autolizate inactive ale drojdiei și pereții de drojdie. Evaluarea s-a efectuat pentru mostre intermediare luate direct din tancul de fermentație (mostre brute (RW-uri)) și mostre care au fost stabilizate și condiționate (vinuri stabilizate (RS)). Clarificarea a dus la eliminarea constituenților sedimentelor care erau surse pentru transformarea/produția ulterioară de aminoacizi.

Deoarece pH-ul vinurilor nu a prezentat variații semnificative, aminele biogene și aminoacizii au avut comportamente diferite. FRF este un vin frizzante, unde a doua fermentație se produce în contact cu culturi de drojdie după corectarea zahărului la doze de 24 g/L și adăugarea de startere de fermentație. Acest mediu favorizează eliberarea aminoacizilor și reacțiile ulterioare pot duce la amine biogene, chiar dacă concentrația alcoolică este suficientă pentru a inhiba enzimele de decarboxilare sau dezaminare. Balanța între aminoacizi și amine biogene a indicat că concentrațiile lor nu au fost semnificativ diferite față de alte tipuri de vinuri.

S-a observat o creștere a conținutului de SER și TRP în comparație cu valorile medii pentru mostrele FRF, cu valori de 7.13 ± 1.8 mg/L (FRF1) și 6.85 ± 3.6 mg/L (FRF0) pentru SER, în timp ce TRP a înregistrat 10.40 ± 5.8 mg/L (FRF1) și 13.13 ± 5.4 mg/L (FRF0). În comparație cu FR, GLU a avut cele mai mici valori din serie, cu 2.22 ± 1.0 mg/L (FRF1) și 1.32 ± 0.3 mg/L (FRF0), fiind semnificativ diferite față de alte mostre cum ar fi CS1. HIS și FE au fost aproape de valorile medii, dar au prezentat diferențe în comparație cu CSR0 și CSR1, respectiv. În corelație directă cu GLU, PUT a avut cele mai mari concentrații cu 20.78 ± 3.2 mg/L și 15.86 ± 4.7 mg/L, ceea ce poate fi explicat prin scăderea continuă datorată activității biologice reziduale. Au fost înregistrate unele diferențe pentru CAD și TIRM, dar acestea au fost asociate cu mostrele CS. Toate diferențele statistice menționate au fost evaluate utilizând testul de diferență semnificativă Tukey cu $p < 0.05$.

Această stabilitate este explicată de posibilitatea ca acești compuși să fie eliminați în timpul maturare datorită surselor de excreție precum autoliza din drojdia reziduală. Sursele alternative implicate sunt reprezentate de compuși de maturare precum manoproteinele. Fermentația malolactică a fost importantă în vinificația vinurilor și s-a realizat concomitent cu fermentația alcoolică. Aceasta a fost efectuată pentru CS, CSR, FR și FRF, dar numai în cazul probelor –SO₂. Aminele biogene cresc în prezența diferiților microorganisme asociate cu mediile biologice. În această situație, formarea acestora în prezența drojdiilor a fost relativ nesemnificativă în comparație cu cazul în care bacteriile lactice erau prezente.

7.5 Concluzii

Evaluarea aminelor biogene și a aminoacizilor în vinurile cu conținut scăzut de dioxid de sulf a fost realizată, luând în considerare semnificația lor în diverse etape ale vinificației, inclusiv prepararea mustului, fermentația, corecțiile și tratamentele. Așa cum era de așteptat, cele mai mari concentrații de aminoacizi au fost găsite în Cabernet Sauvignon, urmate de Cabernet Sauvignon rozé și vinurile albe (Fetească regală și Fetească regală Frizzante). Au fost propuse mecanisme de formare a aminelor biogene, concentrându-se pe reacțiile directe de decarboxilare, precum și pe căi alternative, în special pentru formarea de putrescină și spermidină. Având în vedere cele două surse majore alternative de formare ale aminelor biogene din glutamină și arginină, a fost considerată o dublă corelație pentru a verifica care a avut o corelație directă mai mare, bazată pe rezultatele obținute pentru toate tipurile de vin, diferențiate pe baza adăugării de dioxid de sulf.

Evaluarea vinurilor fără dioxid de sulf nu a arătat nicio schimbare drastică a aminelor biogene sau a aminoacizilor care ar putea fi atribuită unor reacții specifice în probele de vin. pH-ul a fost un factor cheie pentru formarea de BA; de exemplu, din seria aminelor biogene, decarboxilarea la cadaverină este favorizată de una dintre cele mai mari valori ale pH-ului. Studiile au arătat că reacția este favorizată de valori ale pH-ului de până la 8.0 la temperaturi ridicate de 50°C. Am verificat valorile pH-ului pentru toate vinurile, iar valorile de stabilitate au arătat că, în toate cazurile, valorile au fost menținute la un maxim de 3.9–4.0. Acest lucru a asigurat minimizarea reacțiilor. Drept urmare, doar putrescina a prezentat valori ușor crescute, deși au rămas sub pragul de percepție. Acest lucru s-a întâmplat deoarece studiile au indicat că utilizarea acidului lactic poate îmbunătăți formarea cadaverinei.

În cazul nostru, pentru a atenua astringența vinurilor, corectarea acidității a fost realizată folosind acid lactic în loc de acid tartric. Pentru a limita conținutul de aminoacizi și amine biogene, o abordare a fost utilizarea bentonitei și a altor agenți de clarificare care afectează toate componentele proteice. Prin urmare, am realizat un studiu comparativ între probele stabilizate și probele intermediare pentru vinurile frizzante. Aceste vinuri au fost în contact cu drojdiile de vin datorită celei de-a doua

fermentații în sticle. Această comparație a dezvăluit unele diferențe în raport cu alte tipuri de vinuri.

În ceea ce privește impactul senzorial, creșterea scorului intensității aromei în vinurile sulfitate este posibil legată de prezența dioxidului de sulf. S-a observat o diferență clară în vinurile fermentate malolactic comparativ cu vinurile sulfitate, în timp ce echilibrul gustului în vinurile cu fermentație malolactică a fost totuși comparabil. În final, calitatea aromei, corpul, post-gustul și acceptarea generală a probelor de vin tratate cu tanin au fost foarte apreciate și au primit cele mai mari scoruri.

8 EVALUAREA NIVELELOR DE ANTOCIANI ÎN CONTEXTUL VINURILOR VINIFICATE PRIN METODE CARE NU IMPLICĂ UTILIZAREA SO₂

8. EVALUATION OF ANTHOCYAN LEVELS IN THE CONTEXT OF WINES WINE BY METHODS NOT INVOLVING THE USE OF SO₂

8.1 Context

Dintre variantele de *Pichia*, *P. kluyveri* este cel mai studiat și singurul disponibil la nivel comercial. *P. kluyveri* are potențialul de a produce compuși aromatici precum tioli, terpeni și mai multe esteri (Vicente ș.a., 2021).

Printre produsele comerciale, Frootzen® (Hansen®, Hoersholm, Danemarca) este recunoscut pentru capacitatea sa de a îmbunătăți aromele variate și tiolice (Vejarano și Gil-Calderón, 2021). Există o preocupare cu privire la alterarea vinului în prezența speciilor non-*Saccharomyces*, astfel încât în utilizarea acestora trebuie să se ia în considerare o atenție specială în legătură cu eficiența și viabilitatea în raport cu activitatea levurilor de fermentație (Vejarano, 2020). În acest scop, la scară largă, dioxidul de sulf este utilizat pentru a inhiba efectul anti microbian, dar utilizarea prelungită poate provoca reacții alergice și alte tulburări de sănătate, astfel încât sunt necesare alternative.

În timpul maturării vinului apar mai multe reacții, cea mai importantă fiind oxidarea care apare la nivelul compușilor sensibili, cum ar fi antocianii (Deshaies ș.a., 2020). Stabilitatea antocianilor monomerici în vinurile roșii este influențată de soiul de struguri, tehnicile de fermentație sau gestionarea vinului (Baiano ș.a., 2016). Alte influențe sunt legate de valoarea pH-ului, temperatura, starea de oxidare, expunerea la lumină, prezența altor substanțe precum acidul ascorbic, zaharurile, sulfii și ionii metalici ca și catalizatori (He ș.a., 2012). În mod normal, antocianii par să fie mai stabili în medii acide la valori de pH mai mici decât în soluții alcaline la valori de pH mai mari.

Implicații în culoarea vinului, antocianii sunt influențați de prezența altor compuși precum flavanoizi sau taninuri. În funcție de structura lor, antocianii sunt clasificați în mai multe grupuri: antociani neacilați, antociani acetilați, proantociani, antocianine-flavanol, antociani cu grupări flavanol condensate mediate de acetil (Pervaiz ș.a., 2017).

Obiectivul acestui studiu este de a evalua substanțele chimice și impactul senzorial al două produse comerciale de levuri non-*Saccharomyces* utilizate pentru bio-protecție precum și a preparatelor tanice utilizate cu același scop.

8.2 Reactivi și materiale de referință

Pentru analiza antocianilor, acidul formic și acetonitril de puritate și grad HPLC au fost achiziționate de la Merck - Germania. Ca standarde au fost utilizate clorura de cianidin-3-glucosidă (coumarină clorhidrat) (Cy3gl), clorura de delphidină (Dp), clorura de peonidină 3-glucosidă (Po3gl), clorura de malvidină 3-glucosidă (Mv3gl), clorura de petunidină (Pt) și clorura de malvidină (Mv) și au avut ca origine Extrasynthesis Franța. Analiza UFLC a fost efectuată utilizând apă de tip I produsă de un sistem Thermo Scientific GenPure UV-TOC.

În studiul nostru au fost luate în considerare două vinuri clasice românești: Cabernet Sauvignon, Cabernet Sauvignon Rose. Pentru fiecare varietate, vinificația s-a desfășurat aplicând metodele clasice. Pentru vinurile fără conținut de SO₂, metodele au fost diferențiate prin utilizarea de compuși specifici. Primele etape au constat în tratarea strugurilor cu *Pichia kluyveri* în doze de 1.3 kg/1 tonă de struguri, în timp ce tratamentul vinurilor cu conținut de SO₂ a constat în utilizarea de metabisulfid de potasiu, acid ascorbic și acid galic.

Fermentația alcoolică s-a realizat cu levuri *Saccharomyces cerevisiae* în doze de 20 g/hL, în timp ce vinurile roze fără SO₂ CSR-SO₂ și ambele tipuri de CS (CS+SO₂ (CS1) și CS-SO₂ (CS0)) au avut fermentație malolactică cu *Oenococcus Oeni* simultan, indiferent de varietate. O diferență importantă finală a constat în alegerea antioxidantului. Astfel, pentru vinurile cu SO₂, după încheierea fermentației, a fost aleasă adăugarea de acid ascorbic în doze de 20 mg/L (excepție CS) și SO₂ până la 40 - 50 mg/L liber, în timp vinurile fără dioxid de sulf liber au avut protecție antioxidantă cu taninuri galice sau taninuri condensate. Alte tratamente comune au inclus stabilizarea tartrică cu CMC sau gumă arabică și clarificarea cu bentonită, silica coloidală sau clei de pește, urmată de îmbuteliere.

8.2.1 Metode instrumentale

A fost aplicată o metodă de cromatografie de înaltă performanță utilizând un sistem Agilent 1220, cu o coloană cromatografică C18 Phenomenex cu o lungime de 150 mm, un diametru intern de 4,6 mm și particule poroase superficiale (SPP - Kinetex XB - C18, 00F-4496-E0) cu dimensiunea corespunzătoare pre-colonei (AJ0-8768). Eluția cromatografică a fost realizată în mod gradient și a utilizat o amestec de apă/acid formic/acetonitril.

Solventul A a constat într-un amestec 87:10:3 (v/v/v), în timp ce solventul B a fost 40:10:50 (v/v/v) din fiecare componentă. Debitul a fost de 1.85 mL/min, temperatura de 50°C, iar volumul injectat a fost de 10 μL. Detecția s-a făcut la 525 nm, cu o fantă de 1 nm și o rată de scanare a datelor de 80 Hz (0,13 s).

8.2.2 Analiză statistică

Toate analizele statistice au fost realizate utilizând programul StatSoft Tibco Statistica. S-a aplicat o analiză de varianță univariată pentru a compara nivelurile de antociani în cazul diferitelor soiuri de vin, dar și între vinurile tratate cu și fără SO₂. În cazul înregistrării diferitelor valori ale concentrațiilor, s-a aplicat testul LSD (Diferența Minimă Semnificativă) pentru a determina care valorile medii au diferențe semnificative.

8.3 Rezultate și discuții

8.3.1 Evaluare instrumentală

Metoda cromatografică a urmat condițiile metodologiilor de referință (OIV-MA-AS315-11), dar cu mici modificări în ceea ce privește eluția și debitul. În timp ce metoda de referință utiliza un debit de 0.8 mL/min și un gradient de 41 de minute, utilizând o coloană cromatografică SPP cu o dimensiune a particulei de 2.6 μm (mărimea porilor de 0.35 μm și un nucleu solid de 1.9 μm), s-a obținut o îmbunătățire semnificativă în ceea ce privește timpul de cromatografie mai scurt și rezoluția optimă pentru fiecare compus.

În ceea ce privește gradientul, compoziția a început cu solventul A:B 94:6 (v/v), a trecut la 70:30 (v/v) în 4.5 minute și 40:60 (v/v) în 7 minute. Reechilibrarea s-a realizat în 2 minute, timpul total fiind de 9 minute. În aceste condiții, timpul de retenție (min) au fost distribuiți conform tabelului 8.1.

<i>Deteție</i>	Detector cu șir de diode fotosensibile, cu lungimea de undă 525 nm		
<i>Cromatograf de lichide</i>	Agilent 1220 infinity II LC		
<i>Coloana cromatografică</i>	Kinetex c18 – 150 mm x 4.6 mm, 2.6 μm		
<i>Debit</i>	1,85 (ml/min)		
<i>Volum injectat</i>	10 μl		
<i>Temperatura de lucru</i>	50 °C		
<i>Faza mobilă</i>	Amestec apă:acid formic:acetonitril (v/v/v)		
<i>Program de eluție</i>	Timp (min)	Solvent a	Solvent b
		Apă:acid formic:acetonitril 87:10:3 (v/v/v)	Apă:acid formic:acetonitril 40: 10: 50 (v/v/v)
	0,0	94	6
	0.0 → 4.5	70	30
	4.5 → 7.0	40	60
	7.0 → 9.0	94	6
<i>Domeniu de scanare</i>	190 nm → 910 nm (uv-vis), λ=515 nm		

Tabel. 8.1. Parametri metoda cromatografică pentru determinarea antocianilor la lungimea de 515 nm.

Table. 8.1. Parameters of the chromatographic method for the determination of anthocyanins at the length of 515 nm.

Pentru evaluarea acurateții metodei analitice s-a inclus o serie de soluții de analizat care conțineau: solventul de lucru, soluție stoc pentru antocianii monitorizați.

Conform distribuției compușilor, s-a realizat identificarea prin tehnica HPLC a unui număr de 7 compuși, așa cum arată în fig. 8.1. Pe de altă parte, din amestecul analizat s-a constatat că formele glicozidice prezintă o simetrie a semnalelor diferită de formele neglicolizate, ceea ce indică un comportament diferit. În schimb semnalele au putut fi integrate pentru cuantificare cu suficientă acuratețe.

Liniaritatea metodei s-a studiat pe un domeniu cuprins între 50.0 mg/L și respective 1.0 mg/L cu specificitate la fiecare compus. Nivelele superioare ale concentrațiilor coincid cu limita superioară de cuantificare, iar cele mai mici valori ale ariilor au fost alese pentru a asigura precizia și acuratețea la aplicarea repetată a metodei de cuantificare.

Concentrațiile care s-au inclus în domeniul de liniaritate, sunt prezentate în următorul tabelul 8.2.

În acest fel, metoda a determinat intervale de liniaritate după o tendință de ordin 1, între concentrație și ariile determinate fiind o dependență directă, ceea ce face ca estimarea concentrațiilor să se realizeze direct prin intermediul ariilor luând în calcul o ecuație de gradul 1.

Exactitatea metodei s-a axat pe stabilirea factorilor de recuperare a antocianilor determinați în condițiile metodei și luând în considerare domeniul de liniaritate și performanța metodei analitice. Astfel nu s-au înregistrat efecte de matrice sau interferențe cu alți compuși care au co-eluat la analiză probelor reale. De vin, factorii de recuperare fiind cuprinși între 94.6% și 99.5%.

ANTOCIANIDINE – PARAMETRI DE VALIDARE PARTIALI

#	<i>Cy3gl</i>	<i>Dp</i>	<i>Po3gl</i>	<i>Mv3gl</i>	<i>Pt</i>	<i>Pg</i>	<i>Mv</i>
L1	10	15	10	10	12.5	50	10
L2	0.05	0.025	0.05	0.05	0.025	0.5	0.05
L3	25.09	109.81	19.37	37.29	63.30	29.38	8.34
L4	7.73	-11.19	-11.88	-23.25	13.23	14.52	1.09
L5	0.995	0.998	1.00	1.000	0.999	0.999	1.000
L6	98.2	99.5	97.2	94.6	97.63	95.65	99.45
L7	2.5	2.6	3.2	3.5	3.6	2.4	2.9
L8	0.039	0.009	0.055	0.029	0.015	0.032	0.120
L9	0.0154	0.0008	0.0285	0.0077	0.0024	0.0110	0.1434
L10	3.2	0.3	5.7	1.6	0.7	4.0	43.3
L11	0.0051	0.0003	0.0094	0.0025	0.0008	0.0036	0.0473
L12	1.06	0.09	1.90	0.52	0.23	1.35	14.44

Tabel 8.2. Parametrii de validare parțială ai metodei de determinare. L1 – concentrația maximă din domeniul de liniaritate (mg/L); L2 - Concentrație minimă (mg/L), L3 – panta curbei de calibrare; L4 – Interceptul curbilor de calibrare; L5 – coeficient de corelație pentru variația liniară; L6 - grad de recuperare (%); L7 – deviația standard relativă pentru probele în triplicat efectuate la exactitatea metodei; L8 – Eroarea standard a pantei; L9 - Limita minimă de cuantificare (mg/L); L10 - limita minimă de cuantificare (mmol); L11 – limita minimă de identificare (mg/L); L12 - limita minimă de identificare (mmol).

Table 8.2. Partial validation parameters of the determination method. L1 – the maximum concentration in the linearity range (mg/L); L2 - Minimum concentration (mg/L), L3 – calibration curve slope; L4 – Intercept of the calibration curves; L5 – correlation coefficient

for linear variation; L6 - degree of recovery (%); L7 – relative standard deviation for triplicate samples performed at the accuracy of the method; L8 – Standard error of the slope; L9 - Minimum quantification limit (mg/L); L10 - minimum quantification limit (mmol); L11 – minimum identification limit (mg/L); L12 - minimum detection limit (mmol).

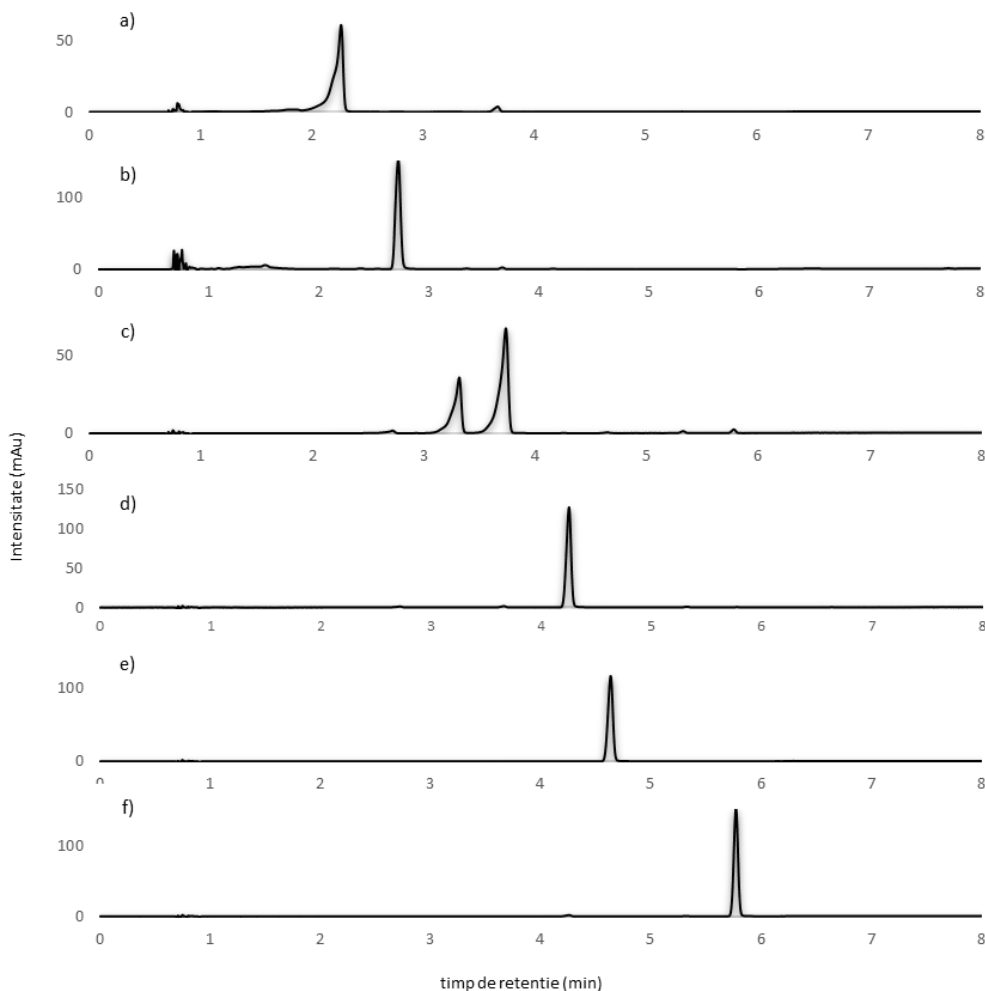


Figura 8.1. Distribuția antocianilor în cadrul metodei de determinare cromatografică utilizând detecția la lungimea de undă de 515 nm (a) – Cy3gl ($T_r = 2.261$); (b) – Dp ($T_r = 2.714$), (c) – Po3gl ($T_r = 3.321$), Mv3gl ($T_r = 3.739$); (d) – Pt ($T_r = 4.260$); (e) – Pg ($T_r = 4.640$); (f) – Mv ($T_r = 5.777$).

Figure 8.1. Distribution of anthocyanins within the chromatographic determination method using detection at a wavelength of 515 nm (a) – Cy3gl ($T_r = 2.261$); (b) – Dp ($T_r = 2.714$), (c) – Po3gl ($T_r = 3.321$), Mv3gl ($T_r = 3.739$); (d) – Pt ($T_r = 4.260$); (e) – Pg ($T_r = 4.640$); (f) – Mv ($T_r = 5.777$).

8.3.2 Evaluarea probelor analitice

Probe reprezentative au fost identificate conform mențiunilor anterioare. După prelevare, toate probele au fost depozitate în condiții care asigurau minimizarea

oricărei oxidări suplimentare. De asemenea, s-au efectuat analize reprezentative pentru a verifica nivelurile de aciditate totală și conținutul de dioxid de sulf. Pentru vinurile CS1 și CSR1, nivelurile de dioxid de sulf au variat între 40 și 58 mg/L, în contrast cu CS0 și CSR0, unde cantitatea nu a depășit 6 mg/L, produsă în general în etapa de fermentație (Pezley, 2015). Toate mostrele au fost depozitate pentru un interval de timp specificat (2018-2021), iar analiza finală a antocianilor a fost efectuată în 2021.

pH-ul a fost important pentru stabilitatea vinurilor și a fost menținut între 3.1 și 3.3 pe durata procesului de vinificație. Verificarea pH-ului, acidității totale, conținutului de alcool, acidității volatile și conținutului de zahăr a fost monitorizată pentru a verifica condițiile primare care ar putea duce la alterarea antocianilor. În ceea ce privește pH-ul, CS a prezentat valori cuprinse între 3.0 și 3.74 pentru mostrele CS0 și între 2.91 și 3.72 pentru mostrele CS1. Aceeași evaluare a fost realizată și pentru CSR: pentru mostrele CSR0 s-au înregistrat variații între 3.12 și 3.51, iar pentru mostrele CSR1 variații între 3.38 și 3.82. Modificarea pH-ului este determinată de acizii organici care contribuie la variația pH-ului.

Creșterea pH-ului, corelată cu o ușoară scădere a acidității totale, poate fi determinată de precipitarea acidului tartric, considerat instabil (Vicente ș.a., 2022). Variația pH-ului nu a arătat diferențe statistice semnificative între aceste mostre. Deoarece în mod normal antocianii sunt mai stabili în medii acide la valori de pH mai mici decât în soluții alcaline, reacțiile de reducere-oxidare fiind favorizate de modificarea stării de oxidare (Wahyuningsih ș.a., 2016), nicio probă de vin nu a prezentat condiții favorabile pentru reacții oxidative. Chiar dacă condițiile vinurilor au fost constante în ceea ce privește parametrii monitorizați, au fost produse unele modificări ale concentrațiilor de antociani pentru mostrele CS și CSR. Aceste modificări pot fi legate de variații mai mult în ceea ce privește polimerizarea și ușoara condensare oxidativă (Cotea ș.a., 2009). Datele sunt prezentate în tabelele următoare.

Conform tabelului 8.3. și respectiv tabelului 8.4., nivelele de antociani s-au evaluat prin raportare la moli pentru uniformizarea echivalențelor moleculare. În ceea ce privește Cabernet Sauvignon roze, nu s-au înregistrat diferențe statistice pentru niciun compus inclus în studiu la comparația între tratamente. Doar pentru Cy3gl, valoarea medie a fost de 0.014 ± 0.002 mmol/L pentru mostrele CSR0, în timp ce mostrele CSR1 au prezentat o valoare semnificativ mai mică de 0.009 ± 0.001 mmol/L. Pe de altă parte, s-au înregistrat valori cuprinse între 1.301 ± 0.49 mmol/L (Mv3gl; CSR1) și 0.005 ± 0.001 mmol/L (Dp, CSR1). Așa cum s-a observat și în alte studii, Po3gl și Mv3gl sunt principalele componente caracteristice pigmentilor pentru caracterizarea vinului.

În același context, Cy3gl a prezentat valori de 0.34 ± 0.045 mmol/L în cazul CS018 (tabel 8.3.), nivel care este mai scăzută decât în cazul probelor cu SO₂ pentru care valorile au fost 0.41 ± 0.112 mmol/L.

<i>Antociani (mmols/L) Cabernet Sauvignon (CS)</i>										
	Param	Cy3gl	Dp	Po3gl	Mv3gl	Pt	Pg	Mv	Total	Flavone
TVS-TVC-TG										
1	AV	0.33	0.59	2.07	9.13	0.33	0.68	0.72	14.33	4.30
	Sd	0.032	0.002	0.233	0.063	0.039	0.063	0.027	0.566	0.027
2	AV	0.31	0.57	2.24	13.63	0.41	0.68	0.89	18.81	2.41
	Sd	0.043	0.101	0.316	0.101	0.032	0.017	0.148	0.618	0.008
3	AV	0.34	1.17	2.14	23.52	0.51	0.83	2.38	31.32	8.31
	Sd	0.019	0.009	0.185	0.104	0.013	0.066	0.089	0.176	0.016
4	AV	0.36	1.33	2.21	23.13	0.56	0.83	2.48	31.20	3.75
	Sd	0.086	0.026	0.129	0.322	0.022	0.124	0.044	0.065	0.019
MEDIE		0.34	0.92	2.17	17.35	0.45	0.76	1.62	23.91	4.69
STDEV		0.045	0.035	0.216	0.147	0.027	0.067	0.077	0.356	0.018
TVS-TVC-TG-AA										
5	AV	0.25	0.38	1.92	8.65	0.38	0.58	0.54	12.80	1.05
	Sd	0.028	0.020	0.106	0.158	0.057	0.058	0.082	0.279	0.009
6	AV	0.23	0.50	1.90	10.51	0.46	0.64	0.54	14.91	6.85
	Sd	0.079	0.051	0.069	0.190	0.043	0.054	0.118	0.371	0.049
7	AV	0.67	1.41	2.42	25.06	0.49	0.88	1.63	32.68	3.55
	Sd	0.341	0.058	0.043	0.032	0.002	0.005	0.003	0.155	0.022
8	AV	0.50	1.36	2.43	25.43	0.52	0.90	1.67	33.82	4.86
	Sd	0.0005	0.001	0.164	0.021	0.001	0.001	0.004	0.377	0.012
MEDIE		0.41	0.91	2.17	17.41	0.46	0.75	1.09	23.55	4.08
STDEV		0.112	0.033	0.095	0.100	0.026	0.029	0.052	0.295	0.023

Tabel 8.3. Nivele de antociani pentru probele Cabernet Sauvignon (CS) (#1' – CS018, #2' – CS019, #3' – CS020, #4' – CS021, #5' – CS118, #6' – CS119, #7' – CS120, #8' – CS121; Av – average value, St- standard deviation).

Table 8.3. Anthocyanin levels for Cabernet Sauvignon (CS) samples (#1' – CS018, #2' – CS019, #3' – CS020, #4' – CS021, #5' – CS118, #6' – CS119, #7' – CS120, #8' – CS121; Av – average value, St- standard deviation).

Aceste valori sunt minime în seria monitorizării pe cei 4 ani de studiu, tendința fiind descrescătoare astfel că la nivelul anului 2021, probele fără SO₂ au prezentat valori de 0.355 ± 0.032 mmol/L, valori care au fost superioare celor pentru care s-a utilizat dioxidul de sulf 0.25 ± 0.028 mmol/L. Ratele de transformare au fost în sensul descreșterii valorilor și au prezentat pante superioare pentru probele fără SO₂. Probele de tip CSR au prezentat nivele net inferioare pentru Cy3gl acestea situându-se de la 7.1 μmol/L la 12.7 μmol/L pentru CSR021 și respectiv 8.1 μmol/L pentru CSR121. Aceasta situație prezintă o distribuție inversă decât în cazul probelor de tip CS atât timp cât valorile considerate superioare au fost constatate pentru probele fără SO₂ și mai mici pentru cele care au fost supuse sulfitării. Pe de altă parte, în cazul probelor roze sulfitate, stabilitatea CSR1 a fost superioară.

Clorura de delfidină (Dp) este un pigment care are rol în special pentru definirea notelor de albastru. Valorile inițiale ale DP pentru CS au fost comparative și superioare față de Cy3gl, astfel că probele CS021 au avut nivele medii de 1.33 ± 0.026 mmol/L și respectiv 1.36 ± 0.001 mmol/L. O tendință similară cu variații influențate de factori precum variabilitatea anuală s-a constatat și pentru probele de tip CS. Nivelele au fost comparative pentru ambele tipuri de probe și chiar s-au determinat stabilități similare fără diferență statistică, cu toate acestea este notabilă

concentrația superioară constatată pentru CS018 de 0.59 ± 0.002 mmol/L, în comparație cu 0.38 ± 0.02 mmol/L pentru CS118. În ambele cazuri s-a constatat variația predictibilă a parametrului în corelație cu perioada de stabilitate a probelor din cadrul studiului.

Antociani (mmols/L) Cabernet Sauvignon Roze (CSR)										
	Param	Cy3gl	Dp	Po3gl	Mv3gl	Pt	Pg	Mv	Total	Flavone
GLC-TC-TB										
1	Av	0.013	0.006	1.132	1.483	0.012	0.026	0.054	2.845	0.446
	Sd	0.0015	0.0009	0.1600	0.0634	0.0018	0.0033	0.0003	0.0020	0.0067
2	Av	0.012	0.004	0.959	1.212	0.014	0.014	0.045	2.878	0.316
	Sd	0.0009	0.0005	0.2112	0.8949	0.0015	0.0020	0.0025	0.0169	0.0013
3	Av	0.013	0.003	1.443	1.467	0.015	0.119	0.047	3.230	0.324
	Sd	0.0006	0.0001	0.2591	0.5479	0.0048	0.0718	0.0027	0.6080	0.0002
4	Av	0.016	0.006	0.916	1.042	0.007	0.014	0.083	2.772	0.459
	Sd	0.0055	0.0003	0.0555	0.4698	0.0002	0.0010	0.0029	0.0645	0.0053
MEDIE		0.014	0.005	1.112	1.301	0.012	0.043	0.057	2.931	0.386
STDEV		0.002	0.000	0.171	0.494	0.002	0.019	0.002	0.173	0.003
TC-TB-AA										
5	Av	0.008	0.003	1.416	1.032	0.006	0.033	0.060	2.480	0.399
	Sd	0.0002	0.0001	0.7365	0.6526	0.0006	0.0037	0.0012	0.2833	0.0031
6	Av	0.011	0.004	1.165	1.326	0.008	0.028	0.066	2.822	0.365
	Sd	0.0023	0.0019	0.5274	0.5465	0.0005	0.0034	0.0058	0.0329	0.0050
7	Av	0.010	0.006	1.247	1.448	0.011	0.019	0.071	2.782	0.405
	Sd	0.0009	0.0003	0.1263	0.0250	0.0008	0.0081	0.0080	0.0501	0.0086
8	Av	0.008	0.004	1.295	1.406	0.009	0.034	0.060	2.019	0.442
	Sd	0.0009	0.0007	0.1011	0.0605	0.0014	0.0018	0.0020	0.8097	0.0034
MEDIE		0.009	0.004	1.281	1.303	0.009	0.028	0.064	2.526	0.403
STDEV		0.001	0.001	0.373	0.321	0.001	0.004	0.004	0.294	0.005

Tabel 8.4. Nivele de antociani pentru probele Cabernet Sauvignon roze CSR (#1 – CSR018, #2 – CSR019, #3 – CSR020, #4 – CSR021, #5 – CSR118, #6 – CSR119, #7 – CSR120, #8 – CSR121; Av (CSR0 and CSR1) – valoare medie, St – deviație standard).

Table 8.4. Anthocyanin levels for CSR Rosé Cabernet Sauvignon samples (#1 – CSR018, #2 – CSR019, #3 – CSR020, #4 – CSR021, #5 – CSR118, #6 – CSR119, #7 – CSR120, #8 – CSR121; Av (CSR0 and CSR1) – mean value, St – standard deviation).

La Cabernet Sauvignon rose, valorile inițiale ale Dp au fost de 4.0 ± 0.1 $\mu\text{mol/L}$ și respectiv 6.0 ± 0.9 $\mu\text{mol/L}$ pentru probele fără SO_2 adăugat. Exceptând variațiile de la an la an, nu s-au putut evidenția tendințe de variație semnificativă în cazul probelor de CSR. Cu toate acestea s-a constatat doar o oarecare modificare liniară în sensul descreșterii concentrației pentru CSR1, în condițiile în care concentrația inițială a fost de 4.0 ± 0.7 $\mu\text{mol/L}$ pentru CSR121 și o descreștere evidențiată de valori de 3.0 ± 0.1 $\mu\text{mol/L}$ pentru anul CSR118.

Petunidina (Pt) reprezintă un pigment care este responsabil cu notele de roșu spre violet. Diferența față de alți antociani este determinată de faptul că probele care au fost supuse sulfitării CSR121 cu valori de 9.0 ± 1.4 $\mu\text{mol/L}$ au prezentat valori mai ridicate decât probele fără SO_2 în condițiile în care valorile raportate au fost de $7.0 \pm$

0.2 $\mu\text{mol/L}$ pentru CSR021. Chiar dacă monitorizarea s-a inițiat pe probele cele mai recente, s-a constatat că în anii 2020 – 2018 nivelele au fost mai ridicate, cea mai ridicată valoare fiind pentru CSR020 cu nivel de $1.5 \pm 0.48 \mu\text{mol/L}$ și $1.1 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ pentru CSR120. Considerând ca și referință anul 2020, în ceilalți ani de monitorizare, valorile au fost mai scăzute, dar tot în domenii superioare față de 2021.

Valori pentru Cabernet Sauvignon au fost în tendința generală, astfel că valorile maxime s-au înregistrat pentru CS121 și respectiv CS021 pentru care nivelurile au fost de $0.52 \pm 0.001 \text{ mmol/L}$ și respectiv $0.56 \pm 0.022 \text{ mmol/L}$. Stabilitatea s-a menținut în condiții similare astfel că concentrațiile au evoluat până la $0.38 \pm 0.057 \text{ mmol/L}$ (CS118) și respectiv cu o scădere mai ridicată pentru CS018 la concentrații de $0.33 \pm 0.039 \text{ mmol/L}$.

Pelargonidina (Pg) s-a introdus în analiză sub formă de clorură, dar raportarea s-a efectuat la masa moleculară a formei acide având în vedere faptul că mediul este cu pH acid. În aceste condiții rolul pelargonidinei este de a oferi note vizuale de roșu la oranj (portocaliu). În comparație cu ceilalți antociani, Pg a prezentat o stabilitate superioară, astfel că valorile au fost într-o deviație standard relativă de $\pm 2.0\%$, neexistând pe de altă parte o tendință clară privind o eventuală evoluție a parametrului.

Comparativ cu petudinidina (Pt), Pg a prezentat valori care au fost mai mari pentru probele din 2018, comparativ cu probele din 2021. La probele de tip CSR018 concentrația a fost de $26.0 \pm 3.3 \mu\text{mol/L}$ față de CSR020 cu $119 \pm 71.8 \mu\text{mol/L}$ și CSR019 cu $14.0 \pm 2.0 \mu\text{mol/L}$. Probele care au fost supuse procesului de sulfitare și condiționare după principiile clasice de vinificație, au prezentat evoluții similare față de probele la care s-a administrat conservant SO_2 , astfel o creștere a concentrațiilor a fost pentru CSR120, CSR119 și respectiv CSR118, valoarea corespunzătoare a concentrațiilor fiind de $19.0 \pm 7.18 \mu\text{mol/L}$, $28.0 \pm 3.4 \mu\text{mol/L}$ și respectiv $33.0 \pm 3.7 \mu\text{mol/L}$.

Pentru Cabernet Sauvignon vinificat roșu, nivelurile de Pg au fost superioare atât timp cât timpul de macerație a fost mai lung și corespunzător tipului de vinificație propus. Astfel nivelele au fost de $0.83 \pm 0.12 \text{ mmol/L}$ pentru CS121 și respectiv $0.90 \pm 0.19 \text{ mmol/L}$ pentru CS021. Evaluarea a avut aceleași tendințe astfel că și în cazul probelor CS1 și respectiv CS0 s-a constatat scăderea ușoară a concentrațiilor în comparație cu perioada de monitorizare. Ratele de scădere au avut tendință liniară astfel că valorile pentru probele 2018 au fost în mod similar comparative; $0.58 \pm 0.06 \text{ mmol/L}$ (CS118) și respectiv $0.68 \pm 0.06 \text{ mmol/L}$ (CS018).

Malvidina este un compus care este responsabil pentru tonalități de roșu, violet, albastru. Prezintă o oarecare instabilitate, mai ales determinată de variațiile de pH, dar este considerată substanța cu cea mai ridicată rezistență la reacțiile de oxidare din vin. În schimb, cea mai întâlnită formă este cea 3-glicolizată astfel că, așa cum s-a stipulat și în alte lucrări (Cotea ș.a., 2013), această formă prezintă procentul cel mai

ridicat dintre antocianidinele și antocianii prezenți și identificați în probele caracteristice Cabernet Sauvignon roșu și respectiv Cabernet Sauvignon roze.

Cele 2 forme ale malvidinei, au prezentat același comportament similar, concentrațiile cele mai ridicate de 1.40 ± 0.06 mmol/L Mv3gl și respectiv 60.0 ± 2.0 μ mol/L pentru Mv au fost pentru varietățile CSR la care s-a adăugat SO₂. Așa cum s-a menționat, s-a constatat o bună stabilitate a compușilor astfel că valorile pe perioada celor 4 ani de monitorizare au fost de 1.03 ± 0.65 mM și respectiv 60.0 ± 1.2 μ mol/L CSR118. Cu toate acestea pentru Mv, la probele nesulfitate, chiar dacă au fost tratamente anti-oxidante succesive, s-a constatat o descreștere de până la 54.0 ± 0.3 μ mol/L, în condițiile în care probele vinificate la nivelul anului 2021 au avut concentrații de 83.0 ± 2.9 μ mol/L.

În cazul probelor de Cabernet Sauvignon roșu, concentrațiile cele mai ridicate au fost 25.43 ± 0.21 mmol/L pentru CS1 și respectiv 23.13 ± 0.32 mmol/L CS0 ambele înregistrate la nivelul anului 2021. Este remarcabilă diferența dintre cele 2 valori înregistrate pentru probele din 2021 în ceea ce privește Mv3gl. Proporțiile se păstrează pentru Mv în cazul aceluiași tipuri de probe, în aceste condiții nivelele au fost de 2.48 ± 0.044 mmol/L (CS021), iar în cazul probelor CS121 concentrația a fost mai mică de 1.67 ± 0.004 mmol/L, raportul fiind invers față de Mv3gl.

Chiar dacă s-a considerat că Mv și Mv3gl prezintă una dintre cele mai ridicate stabilități la nivelul reacțiilor de oxidare, fapt confirmat și de studiile prezente pentru forma CSR, în cazul CS valorile au avut o dinamică descrescătoare pentru ambii compuși. În aceste condiții, considerând valorile de la 2021 \rightarrow 2018 evoluția la nivelul descreșterii concentrațiilor s-a evidențiat până la valori de 8.65 ± 0.15 mmol/L la CS118 și respectiv 9.13 ± 0.063 mmol/L la CS018. Aceeași tendință se poate considera și în cazul probelor la care s-a utilizat corecția de SO₂.

A doua glicozidă care a fost inclusă în studiu a fost Po3gl. Așa după este considerat, aceasta al doilea antocian inclus cu proporția cea mai ridicată în vinurile studiate, pe lângă Mv3gl.

Soiurile CS au avut o caracterizare similară, dar cu niveluri și conținut relativ mai ridicate (Fernandes ș.a., 2017). Mv3gl și Po3gl au fost principalele componente în pigmentii vinului roșu, urmate de Pt, dar și Mv și forma de glicoliză ca Mv3gl.

Deoarece spectrul compușilor de culoare este același și diferențele statistice între mostrele de tratament (CS0, CSR0) și mostrele de control (CS1, CSR1) nu sunt semnificative din punct de vedere statistic, influența și impactul substanțelor anti-oxidante sunt verificate în funcție de variația pe parcursul maturării vinului. În cazul CS, modificarea culorii a fost mai intensă decât în cazul CSR, aspect confirmat de variația mai mică a antocianilor, așa cum este prezentat în fig. 8.2(a).

În cazul CSR, mai multe compuși au prezentat o stabilitate mai bună, așa cum este arătat în fig. 8.2(a), unde linia de tendință prezintă coeficienți de corelație de maximum 0.83. Cy3gl și Po3gl au prezentat o evoluție clară pe durata perioadei de

maturare a vinului, între anii 2018 și 2021, cu valori ale coeficienților de corelație de 0.91 și 0.99.

Stabilitatea antociani/flavone pentru Cabernet Sauvignon Rose

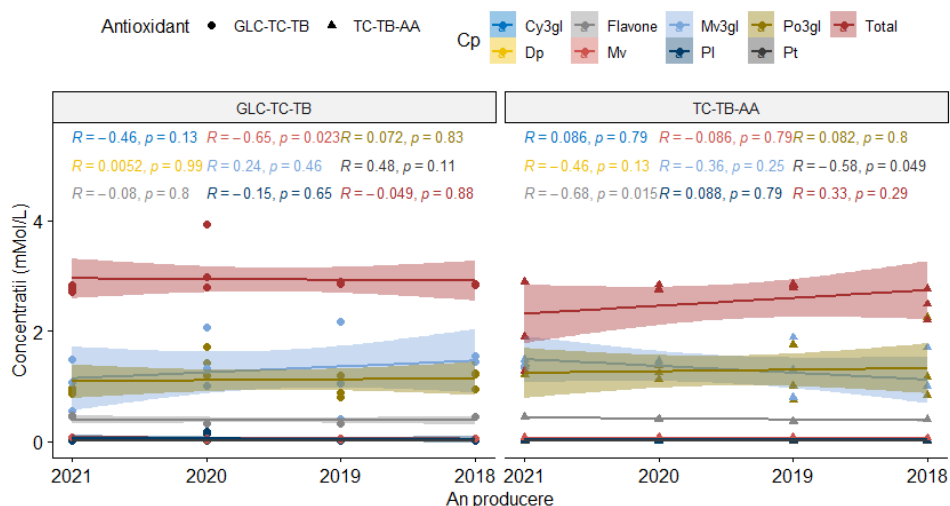


Figura 8.2. a) Evoluția concentrațiilor de antociani pe perioada de monitorizare (2018 – 2021) pentru Cabernet Sauvignon Roze.

Figure 8.2. a) Evolution of anthocyanin concentrations during the monitoring period (2018 – 2021) for Cabernet Sauvignon Rose.

Stabilitatea antociani/flavone pentru Cabernet Sauvignon

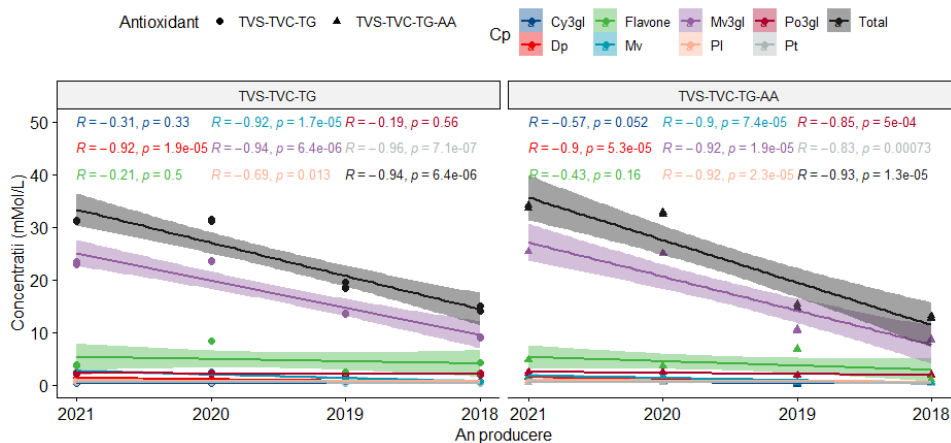


Figura 8.2. b) Evoluția concentrațiilor de antociani pe perioada de monitorizare (2018 – 2021) pentru Cabernet Sauvignon.

Figure 8.2. b) Evolution of anthocyanin concentrations during the monitoring period (2018 – 2021) for Cabernet Sauvignon.

Diferențele statistice între mostre, la comparația între tratamente nu au relevat nici o importanță pentru fiecare compus din studiu. Evoluția continuă a compușilor a arătat diferențe statistice la criteriul de comparație utilizând anul de vinificație (de la 2018 la 2021). Doar Cy3gl și Po3gl au avut valori constante pentru care coeficienții Pearson au valori mai mari de 0.05. În corelație directă cu valorile scăzute ale

coeficienților de corelație, se regăsesc și valorile medii ale concentrațiilor de antociani la comparația între tratamente, care nu au fost semnificativ diferite, excepția fiind Cy3gl, cu o valoare medie de $13.3 \pm 1.4 \mu\text{mol/L}$ pentru CSR0 față de $9.0 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$ (CSR1) care este semnificativ mai mică. Pentru mostrele CS (fig. 8.2(b)), coeficienții de corelație au valori pozitive, care indică o scădere a concentrației unor antociani precum Cy3gl, Dp, Mv3gl, Pt, Mv sau conținut total, deoarece valorile cele mai mari au fost înregistrate pentru anul 2021, iar cele mai mici valori au fost găsite în cazul mostrei din 2018, indiferent de tratament.

8.3.3 Discuții privind evoluția antocianilor în contextul utilizării amestecurilor taninice

Recent, Harbertson ș a. (2012) au considerat că taninurile oenologice conțin un nivel relativ scăzut de tanin precipitabil (193-425 mg/L echivalent catechină), ceea ce reprezintă doar 12-48% din totalul fenolic reactiv la fier, în timp ce Keulder, 2005 a constatat că conținutul de tanin condensat al unei produs oenologic din struguri este în aceeași ordine de mărime.

Similar, taninurile condensate reprezintă 13% și 45% din extractul total de fenoli atunci când se utilizează un solvent apos sau organic (Kahn și Bertrand, 2005). S-a constatat o relație între compuși fenolici totali și conținutul total de tanin, așa cum au confirmat și alții (Obreque-Slier ș.a., 2009). Evaluarea concentrațiilor de taninuri adăugate și nivelele de substanțe care sunt afectate de procese oxidative au relevat coeficienți de corelație semnificativi ($p < 0.05$) doar în cazul probelor de CSR pentru care adaosul de amestecuri GLC-TC-TB au prezentat implicații asupra descreșterii Petunidinei ($r = -0.60$), dar au prezentat o influență pozitivă asupra conținutului de flavone ($r = 0.746$, $p < 0.05$).

Considerând concentrațiile de taninuri adăugate, dozele administrate și proprietățile considerate în studiu, complexe de substanțe cu rol antioxidant sunt prezentate în tabelul 8.5.

		CS0	CS1	CSR0	CSR1
TVS	Tanin VR Supra	30	30.0		
TVC	Tanin VR Color	30	30.0		
TG	Tan Gal	6.5	4.00		
FR	Enartistan Fruitan	5.0	5.00		5.00
AA	Acid ascorbic		0.04		0.04
GLC	Fresh Arom			50.0	4.00
QT	Qurca Tan Mk				
TC	TAN Citrus			3.60	
TB	TFT blanc			0.20	
	Total	71.50	69.04	53.80	9.04

Tabel. 8.5. Tipuri de taninuri și concentrații utilizate în metodele de vinificație pentru vinurile Cabernet Sauvignon CS1-CS0 și Cabernet Sauvignon Roze CSR1-CSR0.

Table. 8.5. Tannin types and concentrations used in winemaking methods for Cabernet Sauvignon CS1-CS0 and Cabernet Sauvignon Rose CSR1-CSR0 wines.

Precursorii de glutation au structurat efecte invers proporționale între Dp și conținuturile de polifenoli totali ($r=0.60$) și respectiv flavone ($r=0.90$), în schimb creșterea nivelului de taninuri în vin a determinat descreșterea Dp ($r=-0.71$). O variație similară în raport cu flavonele și cu polifenolii totali a prezentat și Pt care a avut coeficienți de corelație de -0.75 și respectiv -0.63 .

		Corelații în cadrul grupului Varietate:CSR									
		Cy3gl	Dp	Po3gl	Mv3gl	Pt	Pg	Mv	Total	Fl	An
Corelații în cadrul grupului Varietate: CS	Cy3gl		0.30	-0.38	-0.17	0.17	0.00	0.22	0.42*	0.01	0.19
	Dp	0.63*		-0.41*	-0.02	-0.04	-0.37	0.49*	0.06	0.55*	0.25
	Po3gl	0.55*	0.67*		0.02	-0.05	0.26	-0.15	0.03	-0.12	-0.07
	Mv3gl	0.59*	0.97*	0.65*		0.36	-0.02	-0.13	0.27	-0.04	0.02
	Pt	0.33	0.76*	0.33	0.80*		0.28	-0.62*	0.47*	-0.51*	-0.10
	Pg	0.60*	0.91*	0.66*	0.89*	0.60*		-0.42*	0.07	-0.39	0.09
	Mv	0.35	0.87*	0.46*	0.88*	0.78*	0.74*		-0.16	0.65*	0.43*
	Total	0.58*	0.98*	0.66*	1.00*	0.79*	0.89*	0.89*		-0.42*	-0.16
	Fl	-0.05	0.28	-0.05	0.31	0.37	0.32	0.38	0.31		0.23
	An	0.43*	0.90*	0.56*	0.92*	0.89*	0.81*	0.84*	0.92*	0.32	

Tabel 8.6. Valorile coeficienților de corelație stabiliți între variabilele continui în cadrul fiecărui grup Varietate CSR (superior) și Varietate CS (inferior) Corelațiile marcate sunt semnificative pentru $p < 0.05$.

Table 8.6. The values of the correlation coefficients established between the continuous variables within each group CSR variety (top) and CS variety (bottom) Correlations marked are significant for $p < 0.05$.

În contextul conținutului mediu de taninuri adăugate, conform tabelului 8.5, dozele medii au fost de 71.50 g/hL pentru probele cu CS0 și respectiv 69.04 g/hL pentru CS1. În cazul vinurilor de tip CSR, dozele au fost de 53.40 g/hL pentru probele de tip CSR0 și respectiv 9.04 g/hL pentru probele de tip CSR1.

Procentele taninurilor condensate în cazul vinurilor considerate au fost în raport de 6.99% pentru CS0 și respectiv 7.13% pentru CS1. În condiții similare valorile taninurilor condensate s-a situat la nivelul de 6.69% pentru CSR0 și în doze similare pentru CSR1. La vinurile fără adaos de sulfiți vinificate roze, nivelurile pentru precursorii de glutation s-au situat în doze de 50 g/hL cu rol de a compensa taninurile cu caracter antioxidant. Nivelele taninurilor adăugate cu rol activ în menținerea compușilor cu caracter protectiv au prezentat influențe limitate asupra conținutului total de polifenoli, flavone sau taninuri. În contextul verificării corelației (tabel 8.6.) între categoriile de taninuri și influența avută asupra antocianilor, s-a constatat o diferență invers proporțională în raport cu Pt ($r=-0.60$, $p<0.05$) dar și o corelație pozitivă asupra conținutului de flavone ($r=0.74$, $p<0.05$).

Variația invers proporțională poate fi explicată și prin faptul că în cazul CSR, taninurile galice au avut o proporție mult mai ridicată din totalul taninurilor adăugate,

ceea ce se pare ca a avut impact asupra protecției substanțelor de tip flavone și respectiv polifenoli totali. În condițiile în care acidul ascorbic și respectiv SO₂ au prezentat rolul de antioxidanți și respectiv conservanți nivelele de taninuri a fost mult inferior, deci în raport cu dozele aplicate nu s-au gasit corelații suficiente pentru a asocia rolul acestor tipuri de substanțe cu categoriile de parametri cu rol în conservarea culorii specifice ale vinurilor analizate (Boulton, 2001).

Capacitatea taninurilor oenologice de a îmbunătăți culoarea vinului a fost investigată de mai mulți autori, cu rezultate contradictorii (Manfroi ș.a., 2010).

În cazul probelor incluse în studiul de evaluare a compușilor cu rol în copigmentarea și menținerea parametrilor vizuali la vinurile considerate (CS și respectiv CSR), s-a constatat că amestecurile cu rol în legarea antocianilor pentru stabilizarea culorii au fost incluși în 2 faze. Conform tabelului 8.5, în cazul probelor CS adaosul s-a efectuat în 2 etape, în timpul procesului de fermentație – macerație dozele au fost de 30 g/hL și respectiv în etapa de condiționare post-fermentativă după fermentația malolactică în doze de 5 g/hL. În aceste cazuri produsele au constatat în amestecuri de catechine cu rol în formarea de legături covalente cu antociani, în schimb taninurile condensate extrase din castan și semințe de struguri au prezentat capacitatea de a stabili proteinele cu rol în complexarea antocianilor. Pentru probele de tip CSR s-a optat doar pentru utilizarea de taninuri cu rol în stabilizarea proteică în doze de 5 g/hL (Rinaldi ș.a., 2010).

În cadrul proceselor de vinificație, dozele de acid ascorbic s-au aplicat în 2 doze de câte 20 mg/L astfel că doza totală a fost de 40 mg/L. Conform principiilor considerate, activitatea acidului ascorbic permite încetinirea procesului de degradare a substanțelor colorante, iar potențialul redox este menținut pentru 1 – 2 ani, în dependență cu cantitatea de oxigen dizolvat.

Acidul ascorbic nu poate inactiva polifenoloxidazele, responsabile de producerea de polifenoli care pot re-cataliza reacțiile de oxidare. În prezența unui exces de oxigen, oxidarea polifenolilor ar putea evolua, favorizând apariția defectelor de oxidare. La introducerea de taninuri cu rol anti-oxidant, condițiile pentru reacții de oxido-reducere au rămas constante astfel că din punct de vedere a degradării antocianilor nu s-au produs efecte diferite în cazul probelor la care s-a administrat dioxid de sulf (CS1, CSR1) și probele care au fost tratate doar cu amestecul de taninuri (CS0, CSR0). Evaluarea pe baza studiului analizei varianței ANOVA a relevat diferențe ne-semnificative pentru fiecare parametru inclus în studiu (Cy3gl, Dp, Po3gl, Mv3gl, Pt, Pg, Mv, taninuri determinate, flavone și polifenoli totali) (Callemien ș.a., 2009).

8.3.4 Analiza discriminant liniară

A fost utilizată analiza discriminant liniară pas cu pas pentru diferențierea diferitelor tipuri de amestecuri cu caracter antioxidant. Clasificarea corectă referitoare

la tipurile de vin cu și fără sulfiți adăugați s-a efectuat prin intermediul amestecurilor specifice de substanțe taninice. Astfel conform tabelului 8.5 s-au utilizat amestecuri specifice pentru CSR și CS, diferențele dintre vinurile la care s-au adăugat sulfiți au fost evidențiate prin prezența acidului ascorbic (AA). Modelele care au fost la baza diferențierii dintre soiuri și respectiv amestecuri de substanțe antioxidante au explicat modelul în proporție de 92.05%. Această clasificare a fost realizată folosind următoarele variabile: Cy3gl, Dp, Po3gl, Mv3gl, Pt, Pg, Mv, flavone.

Analiza discriminant liniară a fost folosită și pentru diferențierea vinurilor roze și roșii în funcție de perioada de macerație precum și includerea fermentației malolactice suplimentare la vinurile roze. Vinurile roșii și roze au fost tratate separat. Un nivel de semnificație de 10% a fost predefinit. Au fost excluse acele variabile care au depășit limita de semnificație predefinită.

Tabelul 8.7 arată clasificarea vinurilor realizate prin diferite tehnologii de vinificație. Din toate variabilele incluse în studiu doar anumite variabile au avut o contribuție semnificativă, ele fiind considerate cu puterea de discriminare cea mai ridicată. Procentul de vinuri corect clasificate cu aceste variabile, așa cum s-a menționat și anterior a fost de 92.05%. În acest context, doar Pt, Mv, Pg, Mv3gl au prezentat relevanță statistică pentru definirea modelului de diferențiere.

În Figurile 8.3. (a), (b) și (c) sunt prezentate grupările de vinuri realizate prin diferite tehnologii de vinificație, respectiv utilizând amestecuri de antioxidanți specifici. În Figurile 8.3.(a), (b) (rădăcină 1 vs rădăcină 2) sunt prezentate metode de protecție antioxidantă ceea ce indică este o separare acceptabilă. Cu toate că vinurile realizate prin diferite tehnologii de vinificație nu prezintă cluster neșeparate, în fig. 8.3(a), care prezintă (rădăcină 1 vs rădăcină 2), vinurile roșii și variantele roze indiferent de perioada de macerație formează un grup separat în această proiecție.

<i>N=48</i>	<i>Wilks' Lambda</i>	<i>Partial Lambda</i>	<i>F (3,38)</i>	<i>p</i>	<i>Toler.</i>
<i>Pt</i>	0.011	0.323	26.577	0.000	0.243
<i>Mv</i>	0.009	0.371	21.471	0.000	0.078
<i>Pg</i>	0.008	0.423	17.255	0.000	0.200
<i>Mv3gl</i>	0.004	0.780	3.576	0.023	0.007
<i>Total</i>	0.004	0.826	2.664	0.062	0.005
<i>Dp</i>	0.004	0.868	1.932	0.141	0.037
<i>Po3gl</i>	0.004	0.901	1.387	0.262	0.748

Tabel 8.7. Contribuția fiecărui compus de tip antocian la diferențierea claselor incluse în analiza discriminantă.

Table 8.7. The contribution of each anthocyanin-type compound to the differentiation of the classes included in the discriminant analysis.

Cu toate că fig. 8.3(c) arată cele mai bune două rădăcini, grupurile se suprapun în mare măsură. Următoarele variabile au cea mai mare putere de discriminare pentru diferențierea tipurilor de fermentație și respectiv pentru

diferențierea în funcție de procesele macerație. În acest caz s-a diferențiat doar Pt (Wilks' Lambda: 0.976, approx. F (1,45)=13,43 p< 0.0006) și respectiv Mv ((Wilks' Lambda: 0.999 approx. F (1,45)=13,43 p< 0.0003) și în ordine descrescătoare Mv3gl, Pg, conținut total, Po3gl și Dp. Concluzia a fost că este dificil de clasificat vinurile roșii și roze în funcție de impactul tehnologiilor de vinificație asupra compușilor antioxidanți.

8.4 Concluzii

Studiul prezent a creat premisele evaluării stabilității și evoluției vinului în perioada de maturare, în cazul soiurilor de Cabernet Sauvignon roșu și roze. Cele mai importante substanțe au prezentat comportamente clare în timpul maturării vinului și au produs două dinamici diferite. Unii dintre compușii, cum ar fi Po3gl, Mv3gl, Cy3gl și Dp au prezentat un comportament specific. În schimb, formele glicolizate au arătat o instabilitate în ceea ce privește scăderea, fapt confirmat și de o ușoară schimbare a culorii.

Pentru vinurile roșii, nivelurile au fost superioare celor ale probelor de roze și au prezentat, de asemenea, un comportament variabil în ceea ce privește scăderea antocianilor în timpul monitorizării. Un aspect important este că mostrele fără dioxid de sulf au prezentat o stabilitate ușor superioară, deoarece Mv3gl și Po3gl au menținut o concentrație stabilă. Din perspectiva comparației tratamentelor, cele două tipuri de vin au prezentat un comportament similar, astfel încât tehnologia de vinificație a atins scopul de a produce vinuri fiabile în ceea ce privește evitarea reacțiilor oxidative care ar putea altera calitatea vinului.

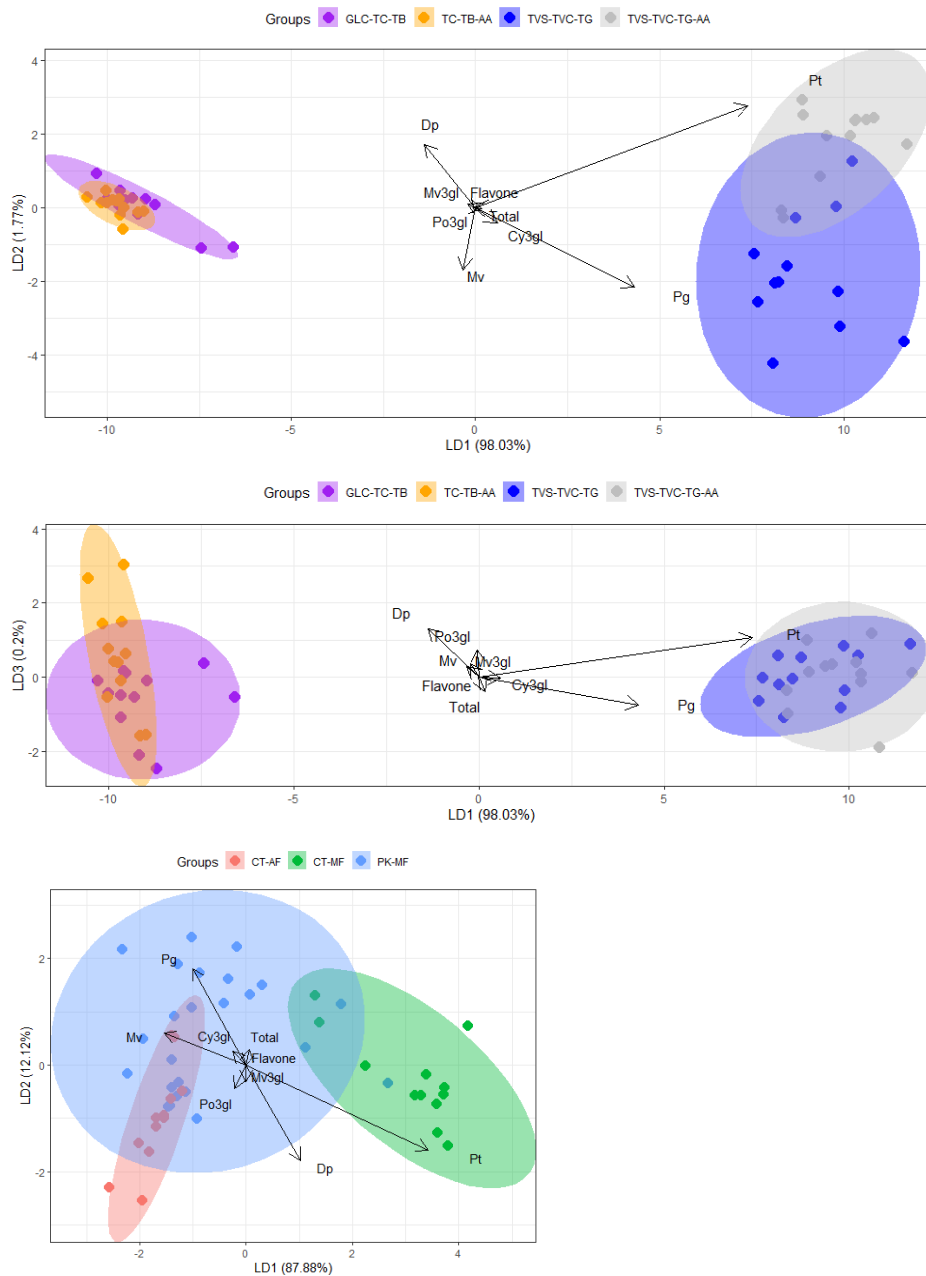


Figura 8.3. (a) Distribuția analizei discriminante conform LD1 (98.02%) și LD2 (1.77%) (b) Distribuție conform LD2 (1.77%) și LD3 (0.2%) și respective (c) LD2 (1.77%) și LD3 (0.2%) prezentate pentru categoriile de vinuri realizate prin diferite tehnologii de vinificație, respectiv utilizând amestecuri de antioxidanți.

Figure 8.3. (a) Distribution of discriminant analysis according to LD1 (98.02%) and LD2 (1.77%) (b) Distribution according to LD2 (1.77%) and LD3 (0.2%) and respective (c) LD2 (1.77%) and LD3 (0.2%) presented for the categories of wines made by different winemaking technologies, respectively using antioxidant mixtures.

9 MONITORIZAREA EVOLUȚIEI DIN PUNCT DE VEDERE A MODIFICĂRILOR PARAMETRILOR SPECIFICI STĂRILOR ANTI-OXIDANTE

9. MONITORING THE EVOLUTION FROM THE POINT OF VIEW OF CHANGES IN THE SPECIFIC PARAMETERS OF ANTI-OXIDANT STATES

9.1 Evaluarea diferențelor de culoare prin tehnici CIELab

Efectul SO₂ asupra culorii vinului nu a fost considerat doar prin prisma efectului asupra antocianilor ci și din perspectiva impactului asupra vinurilor albe. Astfel, scopul acestui studiu a fost de a evalua culoarea vinului în funcție de prezența SO₂ pe tot parcursul procesului de vinificație și precum și pe durata maturării, studiu la care se vor include și vinurile albe. Prima abordare este dedicată observațiilor spectrofotometrice asupra vinurilor comerciale și experimentale din diferite recolte produse cu și fără adăugare de SO₂.

9.1.1 Principiul metodei

Parametrii CIELab au fost evaluați folosind un spectrofotometru Perkin Elmer cu o sursă de lumină D65 și controlat de software-ul Spectramagic NX (v.2.03). Calibrarea a fost realizată înainte de utilizare, cu transparență corespunzătoare 0% și negru corespunzător 100%. Pentru a măsura parametrii L*, a* și b* volume de 25 ml de vin au fost filtrate pe o membrană de 0.45 m. Măsurătorile au fost efectuate într-o celulă de sticlă transparentă cu 1 cm de lungime optică. Diferențele de culoare între cele două vinuri DEab au fost calculate după formula:

$$\Delta E^*ab = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (10)$$

, unde ΔL , Δa^* și Δb^* provin din valorile determinate ale CIELab conform Organizației Internaționale a Viei și Vinului. Pentru toate probele, măsurătorile au fost realizate de două ori. L* reprezintă luminozitatea, coordonatele de culoare a* și b* indică direcția culorilor: de la roșu la verde (+a* către roșu, -a* către verde) și de la galben la albastru (+b* către galben, -b* către albastru) (Ayala ș.a., 2017). În cele din urmă, cromatica C* și tonalitatea H* au fost calculate după formulele:

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (11)$$

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (12)$$

9.1.2 Analiza caracteristicilor cromatice.

În completarea analizelor CIELab, s-au realizat și măsurători spectrofotometrice ale intensității culorii (CI). Pentru aceste analize, toate probele au fost măsurate de trei ori. Parametrii cromatici ai vinurilor, adică absorbția la 420 nm (d420), 520 nm (d520) și 620 nm (d620), au fost determinați spectrofotometric printr-

o celulă cu drum optic de 1 cm. Intensitatea culorii vinului (CI) a fost determinată prin adăugarea densităților optice la 420 nm (d_{420}) și 520 nm (d_{520}), iar densitatea culorii modificată (CD) a fost obținută prin adăugarea absorbantei la 620 nm (d_{620}) la cei doi parametri anteriori, apa fiind utilizată ca referință. Pentru vinurile roșii s-a efectuat o diluție 1:10 în apă ultra pură.

9.2 Rezultate și discuții

A fost efectuată o evaluare colorimetrică a vinurilor experimentale și comerciale, utilizând parametrii L^* , a^* , b^* și măsurători ale intensității culorii. Fig. 9.1 reprezintă distribuția valorilor CIELab pentru vinurile incluse în studiu, considerând diferite variabile de grupare semnificative. S-au considerat ca variabile de grupare: tipul de vin, soi, tratamentul aplicat care a implicat utilizarea dioxidului de sulf (a) ca și agent antioxidant și antifungic, precum și evoluția în timp.

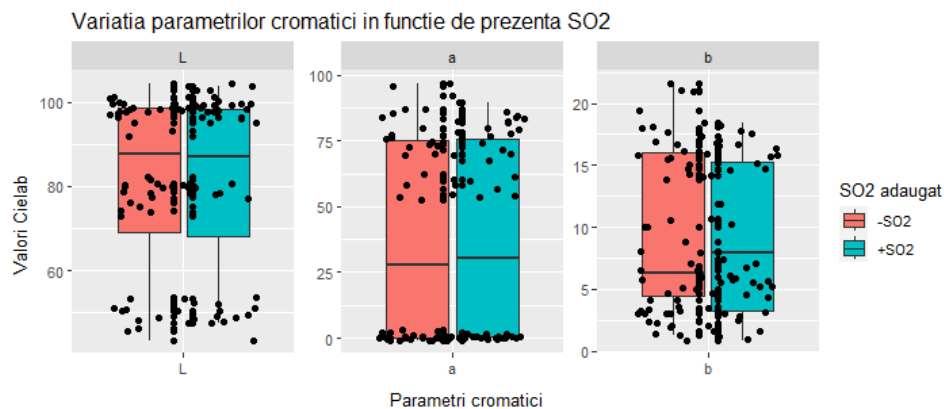
Evaluările boxplot arată că vinurile fără adăugare de SO_2 au valori mai mici pentru L^* , a^* și b^* în comparație cu vinurile cu adăugare de SO_2 și că, pentru cele 4 variante, vinurile din 2018 au prezentat o diferență statistic semnificativă.

În fig. 9.1 s-a demonstrat faptul că prin considerarea prezenței dioxidului de sulf nu s-au obținut diferențe statistice remarcabile, toate probele incluse au prezentat pentru parametrii L^* , a^* , b^* valori comparative. Evaluarea inter-an (2018-2021) și inter-tratament (+ SO_2 / $-SO_2$) nu a determinat vreo diferență statistică remarcabilă, astfel că parametri precum claritatea probelor nu a fost afectată în condițiile în care evaluarea s-a efectuat pe probe care nu au necesitat filtrări suplimentare.

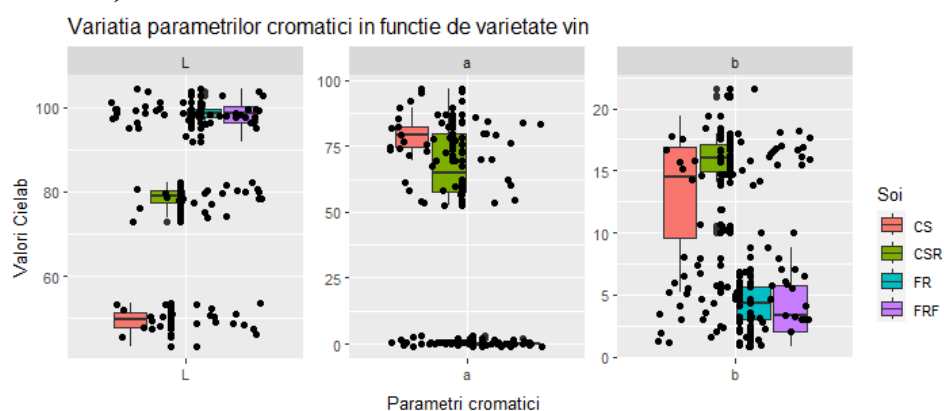
În ceea ce privește evaluarea cromaticității a^* , au existat diferențe între probele FR120 și respectiv FR121, soi care a dat cea mai bună stabilitate. În schimb, probele FRF au fost expuse unui grad de evoluție mai ridicat, astfel că FRF120 a prezentat diferențe față de FRF020, vin produs în același an, dar care a prezentat evoluție diferită în sensul că valorile pentru FRF120 au fost de 1.44 ± 0.84 , iar pentru valorile FRF020 acestea au prezentat valori de 0.01 ± 0.0001 . Pe de altă parte, se observă valori diferite ale cromaticității a^* pentru FR121 față de FRF120, FRF119 și FRF118.

Pentru parametrul de cromaticitate b^* , diferențele au prezentat semnificație statistică pentru FR între probele FR119 și FR019. De asemenea, pentru probele din anul 2021, diferențe s-au situat în intervale pentru care $p < 0.05$ astfel că au existat diferențe de cromaticitate între FR121 în raport cu FR119 și FR118, iar FR120 a prezentat valori diferite față de FR118.

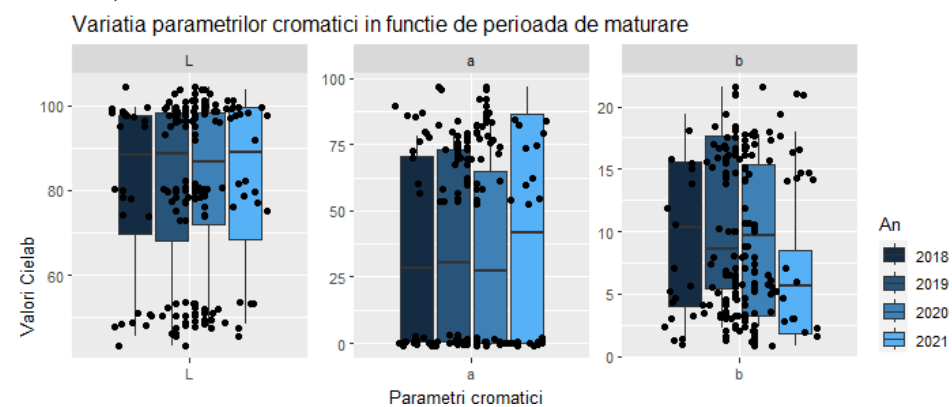
O diferență remarcabilă este inter-tratament astfel că FR120 și FR121 au prezentat valori diferite în raport cu FR018 și FR019. Având în vedere similaritatea de soi, dar considerând diferența de metodă de vinificație, s-a constatat un comportament apropiat în cazul probelor FRF astfel diferențele de cromaticitate b^* s-au produs între FRF121 și FRF118, respectiv FRF119 (Martinez ș.a., 2001).



a)



b)



c)

Figura 9.1. Distribuția valorilor CIELab pentru vinurile incluse în studiu a) parametri categoriali (tehnologia aplicată +SO₂/⁻SO₂); b) Varietate vin; c) perioadă de maturare.
 Figure 9.1. Distribution of CIELab values for the wines included in the study a) categorical parameters (applied technology +SO₂/⁻SO₂); b) Wine variety; c) maturation period

Așa cum se remarcă, Cabernet Sauvignon a prezentat o variație accentuată a parametrilor cromatici indiferent de metoda de vinificație pentru CSR sau CS la

nivelul ambilor parametri de cromaticitate a^* și respectiv b^* . Ceea ce se remarcă în cazul CS, probele de tip CS018 și respectiv probele CS118 nu au prezentat valori medii care au fost semnificativ diferite ($p < 0.05$), similar pentru CS119 și CS019, fapt care a determinat evoluția parametrilor de culoare în mod similar. Aceeași tendință s-a evidențiat pentru CS120 și CS020, precum și pentru CS121 și respectiv CS021. Aceeași tendință a fost înregistrată și pentru parametrul b^* între probele cu SO_2 și respectiv probele fără SO_2 în sensul că nu au existat diferențe semnificative la comparația inter-tratament (Gambuti ș.a., 2007).

Cabernet Sauvignon roze a prezentat o variabilitate superioară, parametrii de cromaticitate a^* și respectiv b^* au prezentat diferențe semnificative inter-tratament și inter-an, astfel că la compararea valorilor CS018 cu CSR181, CS019 cu CS119 și respectiv CS021 cu CS121 valorile parametrilor de variație Pearson au avut valori mai mici de 0.05. Pe de altă parte și probele 2021 au prezentat valori semnificative în raport cu probele 2019 și respectiv 2018 indicând variații continue, așa cum este remarcat și în fig. 9.2.

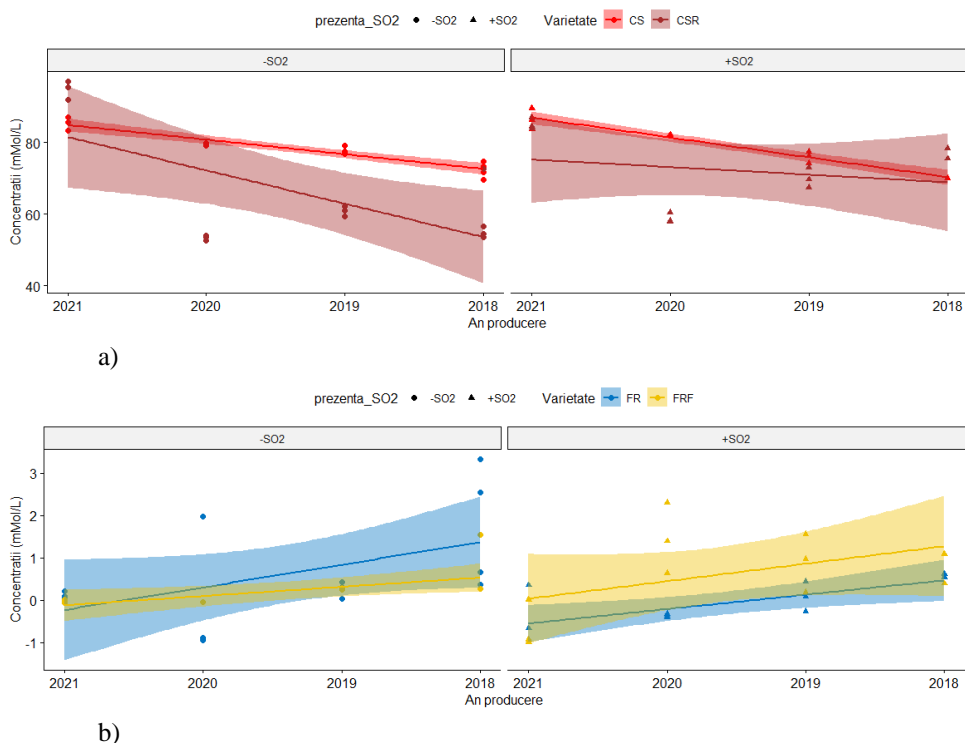


Figura 9.2. Variația pentru cromaticitate a^* în cazul probelor studiate pe parcursul intervalului de maturare. a) monitorizare CS și CSR; b) monitorizare FR și FRF.

Figure 9.2. Variation for chromaticity a^* in the case of the samples studied during the ripening interval. a) CS and CSR monitoring; b) FR and FRF monitoring.

Diferențele de culoare DEab (tabel 9.1) au fost calculate între vinurile cu și fără adăugare de SO_2 în cazul celor 4 tipuri de vin. Pentru vinurile de tip CS,

diferențele s-au situat între 6.11 ± 2.10 pentru probele de tip CS din 2018 și respectiv 3.09 ± 0.89 pentru probele din 2021. Având în vedere faptul că la Cabernet Sauvignon s-a înregistrat o variație continuă încă de la probele din 2021, nu s-a putut stabili o corelație privind o eventuală evoluție în timp, astfel că valorile s-au încadrat între 2.12 ± 0.57 pentru ΔE (probele CSR019 și respectiv CSR119) și respectiv 4.23 ± 2.92 pentru probele din 2021 (CSR021 și CSR121). Un comportament similar s-a constatat la Fetească regală pentru care valorile au prezentat distribuții importante, de la un nivel de 5.64 ± 1.26 (2019) la valori de 20.82 ± 1.10 (2018), ceea ce s-a confirmat și pentru Fetească regală Frizzante. În acest caz valorile au prezentat un nivel foarte scăzut pentru probele din 2021 cu o medie de (0.99 ± 0.45) FRF021 și FRF121, dar o evoluție s-a produs începând cu probele din 2020 ale căror valori au fost de 8.15 ± 4.34 , continuând cu FRF 2019 (4.34 ± 1.14) și respectiv FRF 2018 (1.64 ± 1.17)

Ochiul uman poate percepe diferențele pentru o valoare DEab mai mare de 2.7. Acești parametri au relevat că vinurile fără adăugare de SO₂ au arătat unele diferențe remarcabile care pentru unele soiuri prezintă o evoluție în timp. Datele sunt confirmate și de parametrul L* ale cărui valori mai mici indică o colorație mai accentuată și o culoare violet mai intensă, în condițiile în care parametrii a* și b* rămân comparabili cu probele cu SO₂ (Pelonnier-Magimel ș.a., 2020).

În acest context, valorile mediile multianuale pentru L* la probele fără SO₂ sunt de 49.68 ± 2.00 (CS0) și respectiv 53.87 ± 1.93 (CS1), în comparație cu a* care a relevat valori mai ridicate de 78.76 ± 1.23 (CS0) și respectiv 76.45 ± 1.23 (CS1), iar b* a rămas comparativ 13.32 ± 1.36 (CS0) și 13.31 ± 0.99 (CS1). Aceeași situație la CSR s-a produs, o oarecare modificare a culorii spre note mai întunecate 78.46 ± 2.11 (CSR0) și respectiv 80.75 ± 2.22 (CSR1), în condițiile în care a* a fost de 66.97 ± 1.85 și 60.37 ± 1.85 , iar b* care schimbă tonalitatea spre verde a prezentat ca și în cazul CS valori comparabile 15.97 ± 0.59 (CSR0) și 14.84 ± 0.59 (CSR1).

În mod invers, vinurile ale au avut un comportament comparativ, astfel valorilor probelor cu adăugare de SO₂ prezentau o valoare semnificativ comparabilă pentru L* 98.87 ± 1.83 (FR0) și 98.34 ± 2.08 (FRF0), în comparație cu probele la care s-a administrat SO₂, ale căror valori au fost apropiate cu nivele de 98.75 ± 1.88 (FR1) și respectiv 98.49 ± 2.08 (FRF1). Doar o colorație mai intensă pentru tentele de roșu a* în valori de 0.3 ± 0.08 (FR0) și respectiv 0.07 ± 0.09 (FR1). Valoarea mai mare pentru a*, asociată cu vinurile fără sulf a fost determinată de valorile mai ridicate și de notele mai închise pentru probele FR019, iar FR018 a dat note de "pinking". Mai mult, s-au calculat și valorile C* și H*, așa cum s-a descris anterior, și acestea urmează observațiile făcute pentru valorile L*, a* și b*, prezentând valori semnificativ mai mari pentru C* și h* în vinurile cu adăugare de SO₂ în comparație cu cele fără adăugare de SO₂ (tabel 9.1).

Aceste rezultate evidențiază un impact semnificativ asupra culorii vinurilor roșii Cabernet Sauvignon și respectiv Fetească regală produse fără adăugare de SO₂,

lucru corelat cu utilizarea acestui aditiv (Cheynier ș.a., 2006). Mai mult, vinurile fără adăugare de SO₂ prezintă o valoare semnificativ mai mare pentru indicele Croma (C) 12.84 ± 1.22 (CS0), 8.03 ± 0.75 (CSR0), 4.21 ± 0.72 (FR0) și respectiv 3.68 ± 0.79 (FRF0) decât la vinurile cu SO₂ (12.30 ± 1.28 (CS1), 8.11 ± 0.47 (CSR1), 3.72 ± 0.89 (FR1) and 3.76 ± 0.68 (FRF1)), ceea ce este în acord cu datele CIELab, care arată din nou culoarea mai închisă a acestor vinuri și care a evoluat în perioada de monitorizare.

Colordistance oferă un instrument comparativ obiectiv pentru orice analiză a culorii care altfel se bazează pe un sistem de clasificare obiectiv.

	<i>L</i> *	<i>A</i> *	<i>B</i> *	ΔE^*	<i>C</i>	<i>H</i>	
CS018	46.44	73.28 ^{3,4,5,6,7,8}	15.81 ^{7,8}	6.11	10.65	27.10	
(1)	0.89	1.51	3.13		1.95	3.48	
CS118	51.44	69.78 ^{3,4,5,6,7,8}	16.09 ^{7,8}	±2.10	13.29	30.10	
(2)	3.31	0.18	0.53		2.85	1.03	
CS019	49.05	77.75 ^{1,2,6,7,8}	14.10 ^{7,8}	4.53	14.18	30.96	
(3)	5.23	1.14	3.79		0.63	0.36	
CS119	49.09	75.90 ^{2,6,7,8}	18.24 ^{6,7,8}	±3.24	13.25	30.15	
(4)	1.26	1.66	0.19		0.96	0.93	
CS020	51.32	79.62 ^{1,2,7,8}	16.81 ^{7,8}	5.30	13.22	25.52	
(5)	0.81	0.46	0.82		0.27	1.83	
CS120	50.43	82.07 ^{1,2,3,4,8}	12.20 ^{4,7}	±1.77	13.07	22.36	
(6)	2.72	0.09	1.78		0.80	1.97	
CS021	50.73	85.25 ^{1,2,3,4,5}	5.55 ^{1,2,3,4,5,6}	3.09	12.97	10.38	
(7)	1.35	1.88	0.31		0.87	0.99	
CS121	48.90	86.39 ^{1,2,3,4,5,6}	7.76 ^{1,2,3,4,5}	±0.89	12.09	11.09	
(8)	0.42	2.89	0.30		1.41	0.74	
CSR018	79.96	54.86 ^{2,3,4,7,8}	15.75 ^{3,8}	3.51	6.33	72.68	
(1)	0.32	1.55	0.20		2.45	1.35	
CSR118	77.16	75.48 ^{1,3,5,6,7,8}	14.92 ^{3,7,8}	±0.98	9.11	37.77	
(2)	1.88	2.88	0.52		0.40	1.18	
CSR019	79.21	60.85 ^{1,2,4,5,7,8}	21.23 ^{1,2,4,5,6,7}	2.12	7.94	73.45	
(3)	1.84	1.35	0.35		1.26	3.41	
CSR119	77.51	69.96 ^{1,3,5,6,7,8}	16.34 ^{3,8}	±0.57	6.93	67.36	
(4)	4.57	2.79	0.29		0.14	1.26	
CSR020	80.18	53.33 ^{2,3,4,7,8}	15.31 ^{3,7,8}	2.42	6.00	70.97	
(5)	0.53	0.61	1.44		0.43	1.16	
CSR120	79.30	58.79 ^{2,4,7,8}	16.43 ^{3,8}	±2.85	6.95	72.26	
(6)	1.99	1.39	1.14		0.33	1.19	
CSR021	76.47	77.45 ^{1,2,3,4,5,6,8}	17.55 ^{1,2,5,8}	4.23	10.62	46.99	
(7)	2.25	2.59	0.52		0.70	0.77	
CSR121	77.87	85.01 ^{1,2,3,4,5,6,7}	10.25 ^{1,2,3,4,5,6,7}	±2.92	10.34	23.76	
(8)	3.52	1.66	0.27		0.32	0.51	

Tabel 9.1. Valori ale analizelor spectrofotometrice pentru vinuri experimentale cu și fără SO₂ (evaluare pentru CS și CSR).

Table 9.1. Values of spectrophotometric analyzes for experimental wines with and without SO₂ (evaluation for CS and CSR).

	<i>L</i> *	<i>A</i> *	<i>B</i> *	ΔE^*	<i>C</i>	<i>H</i>	
FR018	98.31	2.08 ^{6,8}	6.67 ^{2,4,5,6,8}	20.82	7.02	74.99	
(1)	1.21	1.53	0.16		0.19	0.71	
FR118	96.75	0.61	3.90 ^{1,8}	±1.10	3.84	80.09	
(2)	0.74	0.06	0.83		0.22	1.39	
FR019	98.69	0.26	5.60 ^{4,6,8}	10.48	4.79	-88.65	
(3)	0.92	0.20	0.52		0.81	3.61	
FR119	98.56	0.09	3.49 ^{1,4,7,8}	±3.20	3.29	86.77	
(4)	0.22	0.36	1.38		1.29	1.93	
FR020	97.70	0.05	3.93 ^{1,8}	5.64	5.21	88.90	
(5)	3.11	1.67	0.78		1.06	0.89	
FR120	99.88	-0.37 ¹	2.96 ^{1,3,7}	±1.26	3.48	-84.24	
(6)	2.59	0.05	0.15		0.57	2.98	
FR021	100.63	0.13	5.57 ^{4,6,8}	10.60	4.46	93.16	
(7)	2.86	0.07	0.34		0.90	5.13	
FR121	100.46	-0.44 ¹	1.38 ^{1,2,3,4,5,7}	±2.89	1.57	82.87	
(8)	2.98	0.71	0.58		0.74	0.20	
FRF018	97.32	0.27	2.51 ^{4,6}	1.64	3.09	84.75	
(1)	1.63	0.00	1.12		1.53	1.96	
FRF118	96.57	1.00 ⁸	3.28 ^{4,6}	±1.17	3.03	64.85	
(2)	0.70	0.58	1.15		0.30	1.48	
FRF019	99.14	0.26	4.27 ⁶	4.34	2.61	83.37	
(3)	1.58	0.03	1.63		1.13	4.10	
FRF119	95.46	0.90 ⁸	6.49 ^{1,2,5,7,8}	±1.14	6.21	81.42	
(4)	0.69	0.69	0.55		0.50	1.39	
FRF020	101.65	-0.01 ⁶	2.90 ^{4,6}	8.15	1.88	-91.01	
(5)	3.55	0.0001	0.49		0.72	1.18	
FRF120	95.46	1.44 ^{5,7,8}	7.99 ^{1,2,3,5,7,8}	±4.34	8.44	-82.32	
(6)	5.12	0.84	0.85		1.38	2.56	
FRF021	99.76	-0.02 ⁶	2.14 ^{4,6}	0.99	2.14	-89.65	
(7)	1.53	0.03	1.11		0.46	2.36	
FRF121	99.38	-0.64 ^{2,4,6}	1.48 ^{4,6}	±1.45	2.02	-86.56	
(8)	1.36	0.56	0.57		0.28	1.70	

Tabel 9.1(cont). Valori ale analizelor spectrofotometrice pentru vinuri experimentale cu și fără SO₂ (evaluare pentru FR și FRF).

Table 9.1(cont). Values of spectrophotometric analyzes for experimental wines with and without SO₂ (evaluation for FR and FRF).

Scopurile centrale ale metodei sunt utilizate să permită cuantificarea rapid a culorilor în imagini și să ofere instrumente pentru categorizarea tonalităților în raport cu culori similare, să dezvolte abordări pentru comparația profilurilor de culori și evaluarea "distanței de culoare", o metrică care împrumută tehnici din prelucrarea imaginilor computaționale pentru a măsura diferența de culoare între obiecte (Zhang ș.a., 2012; Byers, 2006; Phung ș.a., 2005).

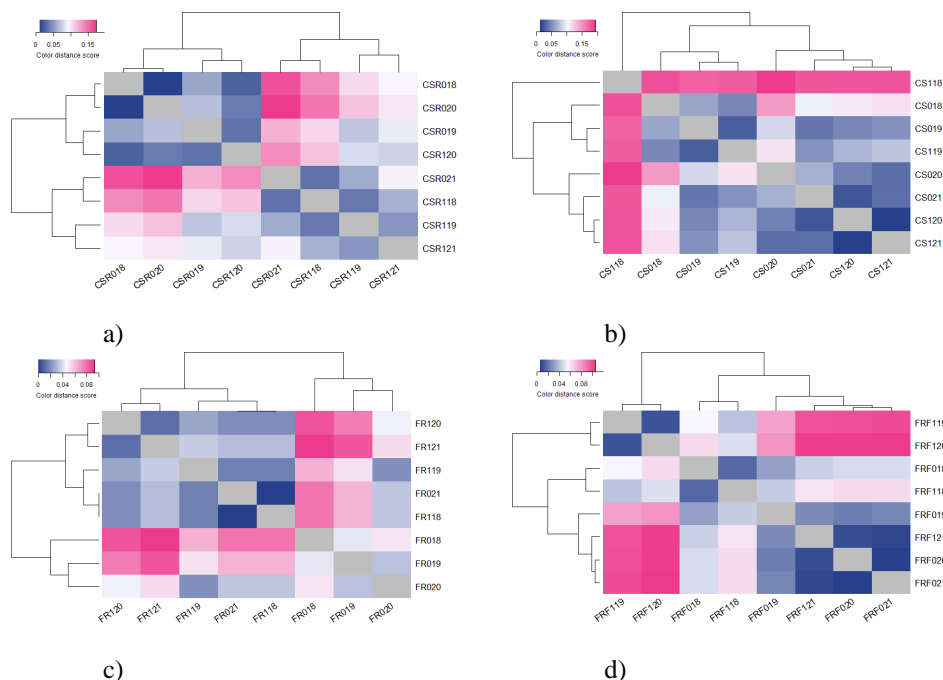


Figura 9.3. Evaluări diferențelor de culoare în cazul probelor CS, CSR, FR și FRF vinificate pe baza celor două tehnologii de vinificație +SO₂/-SO₂ precum și pe baza perioadei de monitorizare.

Figure 9.3. Evaluations of color differences in the case of CS, CSR, FR and FRF samples vinified based on the two winemaking technologies +SO₂/-SO₂ as well as based on the monitoring period.

Matricele de distanță de mai sus s-au utilizat în sensul că relevă un număr pe diferențele de culoare dintre imagini, astfel încât să putem cuantifica cât de similare sunt tonalitățile din acele imagini, în condițiile în care este dificil să obținem o înțelegere intuitivă a similitudinilor. Pentru a vizualiza matricea de distanță, colordistance include o funcție pentru a prelua matricile de distanță

Clasificarea tonalităților vinurilor s-a efectuat considerând fiecare soi și tehnicile de vinificație specifice. S-au construit 4 histograme (fig. 9.3) corespunzătoare CS(a), CSR(b), FR(c) și respectiv FRF(d). Fiecare diagramă de tip cluster a evidențiat diferențele de tonalitate între vinuri considerând prezența SO₂ dar și din punct de vedere a evoluției în perioada de monitorizare. Scorul privind diferențele de culoare (color distance score) s-a calculat și evaluat pentru fiecare tip de soi de vin. Culoarea roșie a indicelui indică valori diferite, în schimb similaritatea este indicată prin albastru și arată apropierea și similaritatea tonalităților vinurilor. În cazul soiurilor roșii și respectiv soiurilor roze, scorul s-a situat între 0 și 0.15, valoare care a evidențiat cele mai mari diferențe. Pentru probele de vin alb, FR și respectiv FRF, diferențele s-au situat după factori de scor de cuprinși între 0 și respectiv 0.1, ceea ce indică diferențe de culoare mai reduse decât în cazul Cabernet Sauvignon roșu sau roze.

Pentru CSR, în cea mai mare parte, rezultatele reflectă ceea ce se poate observa intuitiv, perechea cu cel mai bun scor sunt tonalitățile caracteristice CSR018 și respectiv CSR020, dar care prezintă similaritate în raport cu CSR021 și respectiv CSR118; o evoluție în sensul unor valori mai mici pentru scorul distanței de culoare este pentru CSR019. Pentru celelalte tipuri de probe similaritățile indică că nu sunt diferențe semnificative. Concluzia este faptul că nu există o variație continuă a tonalităților de culoare ale vinurilor de tip CSR, indiferent de tehnologia de vinificație, dar mai important nu există o evoluție continuă datorită perioadei de maturare.

Probele CS au avut o evoluție diferită, în cazul histogramei (b) doar probele de tip CS118 au avut cel mai mare grad de diferențiere astfel că au conturat un singur cluster. Cu toate că aspectul transpus prin utilizare Cielab color space indică un grad de similaritate cu celelalte probe, valoarea scorului distanței de culoare mai mare a fost determinat de $L^* = 51.44$ și respectiv $a^* = 69.78$. Aceste valori au fost cele mai ridicate din seria de probe de tip Cabernet Sauvignon, indiferent de tipul de vin, cu și fără SO₂. Pe de altă parte, aceste valori, care au individualizat proba CS118, au prezentat diferențe semnificative prin testele de multi-varianță Tuckey's HSD, așa cum este prezentat în tabelul 9.1.

O particularizare aparte este determinată pentru FRF119 și respectiv FRF120, care au prezentat, la momentul analizei, o colorație cu o tentă ușor brunificată, chiar dacă sunt probe care au fost supuse tratamentului antioxidant pe bază de SO₂.

Analiza relevă valori mai mari pentru tenta b^* , adică 6.49 ± 0.55 (FRF119) și respectiv 7.99 ± 0.85 (FRF120). Aceste valori sunt diferite de celelalte din serie, fapt care este confirmat de testele de multi-varianță aplicate. O explicație poate fi determinată de posibile reacții de oxidare care pot produce schimbări ale culorii vinului alb către o nuanță mai închisă cauzate de expunerea la aer în timpul procesului de vinificație sau maturare, sau prin prezența unor cantități mari de oxigen în sticlele de vin.

Un cluster a fost particularizat pentru probele FR fără SO₂ produse în anii 2018 și 2019. Particularitatea este remarcată pentru FR018, care a prezentat un efect de „pinking”, tonalitatea b^* a avut valori de 6.67 ± 0.16 , iar a^* a prezentat nivele 2.08 ± 1.53 . Mai apropiat de probele FRF120 a fost FR019 care a prezentat un scor distanta de culoare similar cu FR018, în schimb nota pe care vinul a avut-o la nivelul aspectului a fost de brunificare. Efectul de pinking a fost asociat cu oxidarea taninurilor și flavonoidele, compuși care pot fi sensibili la oxidare. Când acești compuși sunt expuși la oxigen, pot suferi o reacție chimică care duce la apariția nuanțelor rozalii sau roșiatice în vin. Concluzia este confirmată și de coeficienții de corelație care sunt invers proporționali la evaluarea comparativă L , a^* și b^* în raport cu conținuturile totale de polifenoli, flavone și respective taninuri. În ceea ce privește parametrul b^* , acesta a prezentat corelație invers proporțională cu polifenoli totali.

Cu toate acestea, nu s-au detectat diferențe semnificative pentru indicii ITP (Indexul Total de Polifenoli) în cazul acestor vinuri comerciale, ceea ce sugerează că impactul posibil al SO₂ asupra dinamicii polifenolilor în timpul procesului de vinificație nu a fost observat semnificativ în cazul acestor vinuri. Acest lucru este în contrast cu rezultatele raportate anterior. Cu toate acestea, pentru a fi siguri de o astfel de evaluare, ar fi trebuit să fie efectuate analize mai specifice.

9.3 Evaluarea tendințelor de evoluție din punct de vedere a modificărilor capacității anti-radicalice

9.3.1 Principii

Proprietățile antioxidante ale compușilor fenolici din vinuri sunt evaluate prin capacitatea de a inhiba radicalii organici stabili 1.1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

Evaluarea se realizează pe baza radicalilor liberi, a capacității vinurilor sau a mediilor hidroalcoolice care conțin compuși cu caracteristici antioxidante, de a neutraliza radicali liberi. În acest context radicalul 1.1-difenil-2-picrilhidrazil absoarbe la lungimea de undă de 515 nm dar, după reducerea de către un compus antioxidant de tip compus fenolic sau specie radicalică, absorbanta descrește. Descreșterea este proporțională cu concentrația speciilor reziduale DPPH (Brand-Williams ș.a., 1995).

9.3.2 Reactivi și instrumente

Pentru analiză s-a utilizat metanol HPLC, care s-a utilizat pentru prepararea soluției de DPPH la o concentrație de $6 \cdot 10^{-5}$ mol/L, pentru care s-a cântărit o masă de 23.64 mg pentru 1.0 L în metanol. Determinarea s-a efectuat spectrofotometric utilizând un spectrofotometru de tip Specord Analytic Jena. Probele de vin considerate (CS, CSR, FR și FRF) au fost analizate prin diluțiile corespunzătoare în reactiv DPPH, diluțiile fiind conform următoarei secvențe.

Soluție de referință (D0): la un volum de 1.9 ml reactiv DPPH s-a adăugat un volum de 0.1 ml metanol. Pentru fiecare soi de vin s-au optimizat și considerat următoarele diluții corespunzătoare. CS0 și respectiv CS1 au utilizat diluții 1:250, 1:100 și respectiv 1:50. Diluțiile pentru CS s-au efectuat prin amestecul unor volume de 10μL, 25μL și 50μL probă (CS1 sau CS0) cu volume de 2490μL, 2475μL și respectiv 2450μL reactiv DPPH, în timp ce pentru CSR (CSR0 – CSR1), FR (FR0 – FR1) și FRF (FRF0 – FRF1) s-au utilizat diluții 1:12.5; 1:8.33 și 1:6.25. Diluțiile s-au respectat prin utilizarea unor volume de 200μL, 300μL și 400μL și a unor volume corespunzătoare de reactiv DPPH de 2480μL, 2470μL și 2460μL.

Activitățile antioxidante sunt evaluate pe baza radicalilor liberi DPPH care rămân în mediu după reacția dintre soluția metanolică DPPH și probele de testat.

Pentru fiecare diluție de la D1 la D3, reducerea este determinată spectrofotometric la 515 nm prin scanare de la momentul 0 până la obținerea platoului

privind stabilitatea colorației soluției DPPH. Absorbanțele se determină prin scanare continuă la un interval de 3 secunde pe un interval de până la 30 minute. Se înregistrează absorbanța inițială A_1 precum și absorbanța calculată din intermediul curbelor de reacție A_2 de la care s-a considerat instalat platoul.

Procentul de DPPH rămas în formă stabilă (%) este:

$$\%_{DPPH} = \frac{(A_1 - A_2)}{A_2} \times 100 \quad (13)$$

Unde A_1 – Absorbanța probei blanc la t_0

A_2 – Absorbanța probei la platou

9.3.3 Interpretarea statistică a datelor spectrofotometrice

Pentru fiecare diluție testată, s-a indicat cinetica reacției prin intermediul curbelor de reacție. Concentrația la care platoul s-a instalat s-a calculat pe baza unei funcții de tip **model răspuns liniar – platou**. Relația dintre concentrația speciilor antioxidante, respectiv influența asupra formelor radicalice ale reactivului DPPH și concentrațiile reziduale ale acestor specii a fost descrisă de un model de răspuns liniar și platou (LRP). Acest model împarte toate datele în două clase. Prima clasă conține datele corespunzătoare descreșterii absorbantei după o curbă liniară de ordin 1 în funcție de timp. Datele de monitorizare ale absorbantei în clasa a doua sunt independente de concentrațiile speciilor antioxidante din proba analizată. Modelul LRP este foarte util, deoarece la determinarea limitei dintre cele două clase se folosește evaluarea progresivă a coeficienților de corelație evaluați în cadrul celor 2 grupe.

Metoda descrisă optimizează simultan parametrii pentru ambele componente ale modelului LRP. Parametrii calculați corespund parametrilor a 2 funcții de regresie liniară (Interceptare cu axa Y, pantă). S-a considerat componenta pentru care valoarea pantei este apropiată de 0 (Linear-Plateau Model Tutorial, 2023).

În tabelul 9.2 și fig. 9.4 s-au exemplificat metodele de estimare a IC50 pentru probele de Cabernet Sauvignon. S-a considerat interceptul (INT) și respectiv panta (Slope) modelului 2 de la care s-a instalat platoul. Corespondența datelor pentru platou s-a făcut pe baza coeficientului Pearson de comparație, ale cărui valori au fost de minim 0.95 pentru fiecare model. Pentru CS018-1 și respectiv CS118-1 diluțiile au fost de 4.0 mg/mL pentru care diluția a corespuns unui raport 1/250, CS018-2 și CS118-2 cu concentrații 10 mg/mL cu o diluție 1/100 și respectiv CS018-3; CS118-3 cu concentrații echivalente de 20 mg/mL sau diluții 1/50.

CSTV – critical sample test value (valoare critică de testare) este reprezentată de momentul de timp când concentrațiile DPPH au fost constante pe un interval de timp de până la 30 minute. Pentru diluțiile mai mari de 1/250, valorile CSTV au fost cuprinse între 314 ± 12.25 (CS018) secunde și 568 ± 6.25 (CS119) secunde, fiind dependente de gradul de maturitate a vinului. Pentru diluțiile 1/100 valorile s-au

concentrat între 126 ± 5.26 (CS121) și respectiv 356 ± 3.21 (CS120), iar diluțiile 1/50 CSTV a avut valori cuprinse între 50.5 ± 1.24 (CS121) și respectiv 147 ± 5.26 (CS020). Variațiile au fost produse ca urmare a comportamentului diferit al probelor la acțiunea asupra reactivului DPPH.

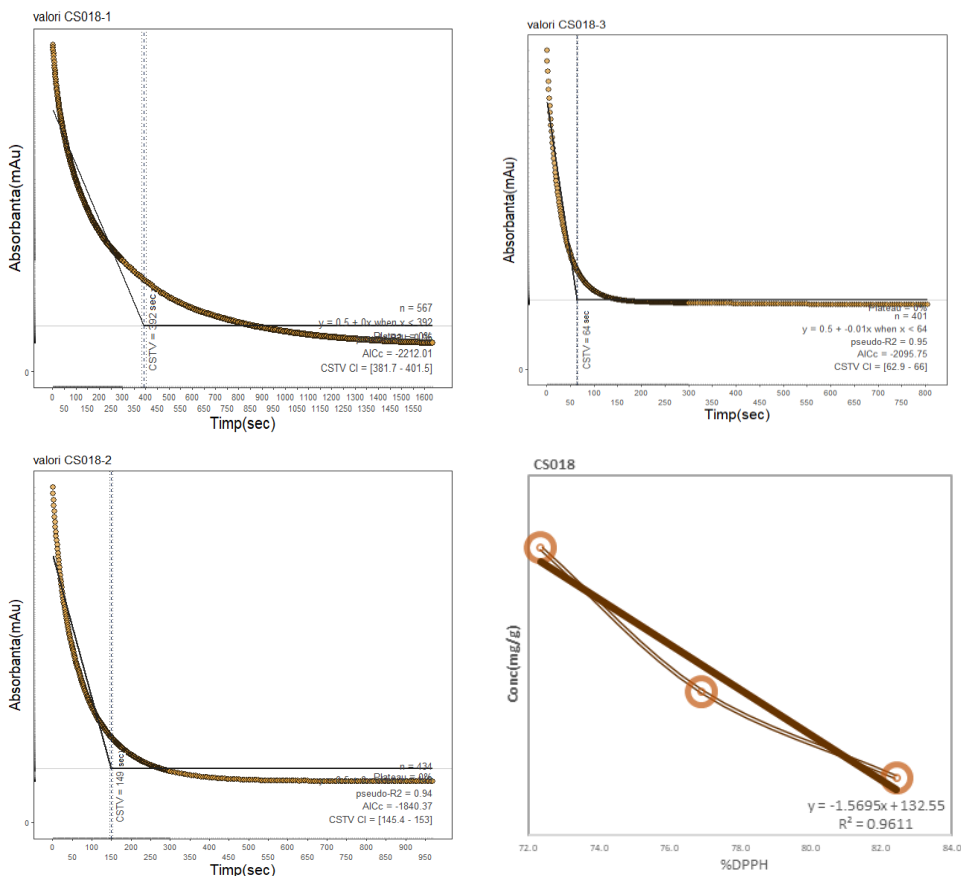


Figura 9.4. Determinarea răspunsului linear probe CS018 . Proba CS018-1 corespunde diluției raport 1/250, CS018-2 diluție 1/100 și respectiv CS018-3 corespunde diluției 1/50. CS018 – dependența liniară a valorilor determinate pentru model raspuns linear – platou în funcție de diluție.

Figure 9.4. Determination of linear response samples CS018. Sample CS018-1 corresponds to the 1/250 ratio dilution, CS018-2 to the 1/100 dilution and respectively CS018-3 to the 1/50 dilution. CS018 – linear dependence of values determined for linear response model – plateau according to dilution.

CSTV – critical sample test value (valoare critică de testare) este reprezentată de momentul de timp când concentrațiile DPPH% au fost constante pe un interval de timp de până la 30 minute. Pentru diluțiile mai mari de 1/250, valorile CSTV au fost cuprinse între 314 ± 12.25 (CS018) secunde și 568 ± 6.25 (CS119) secunde, fiind dependente de gradul de maturitate a vinului. Modurile de calcul sunt prezentate în tabelul 9.2.

Pentru diluțiile 1/100, valorile s-au concentrat între 126 ± 5.26 (CS121) și respectiv 356 ± 3.21 (CS120), iar la diluțiile 1/50 CSTV a avut valori cuprinse între 50.5 ± 1.24 (CS121) și respectiv 147 ± 5.26 (CS020). Variațiile au fost produse ca urmare a comportamentului diferit al probelor la acțiunea asupra reactivului DPPH.

Valorile testelor ANOVA au arătat că între cele 2 variabile de dependență, timpul (măsurat în secunde) și absorbanțele determinate, pe baza cărora s-au calculat valorile CSTV, există diferență semnificativă ($p < 0.05$). Acest lucru se traduce prin faptul că cu cât timpul este mai mare, absorbanta rămâne la o valoare care nu variază în același mod cu evoluția valorilor pentru timpul de monitorizare (sec.)

În acest context, s-au ales absorbanțele de referință pentru fiecare probă care au avut nivele cuprinse între 0.59 ± 0.0976 mAu și respectiv 0.54 ± 0.0645 mAu, ceea ce reprezintă o stabilitate suficientă pentru a considera repetabilitatea metodei de determinare. Totodată, se constată că absorbanțele inițiale nu sunt influențate de concentrațiile probelor de vin adăugate. Absorbantele au fost calculate pe curba de absorbție obținută în cinetica de reacție a fiecărei probe. Intervalele de absorbantă au fost cuprinse între 0.072 ± 0.005 mAu și respectiv 0.176 ± 0.004 mAu. Aceste valori s-au menținut pe perioada monitorizării.

Între nivelele de DPPH% rămase la platou și concentrațiile probelor s-a evaluat tipul de dependență, pentru care s-a constatat că dependența a fost liniară, cu o curbă de tendință de ordin 1. Corespondența datelor a fost confirmată de coeficienții Pearson care s-au înscris în intervalele de -1.00 (CS118, CS121, CS019 CS020) și respectiv -0.71 în cazul CS119.

Considerând valorile pantelor și interceptelor care s-au obținut, s-a efectuat interpolarea pe curba de variație și s-a calculat valoarea concentrației la care s-a considerat IC50, adică concentrația probelor care produc reducerea până la nivelul de 50% a speciilor radicalice ale reactivului DPPH (concentrație inhibitorie mediană). Pe baza valorilor obținute s-a determinat IC50 în cazul probelor CS, care au fost dependente de perioada de maturare a vinului (fig. 9.4).

#	ECUAȚIE	CSTV (SEC)	R2	A1	PLATOU (A2)	%DPPH	C(mg/g)	PANTA	INTERCEPT	R ²	IC50
CS118	0.5 + 0x când x < 421	421	0.95	0.637	0.089	86.0	4	-2.42	211.71	-1.00	90.841
	0.5 + 0x când x < 149	149	0.94	0.609	0.101	83.4	10				
	0.5 + 0x când x < 75	75.2	0.95	0.59	0.121	79.5	20				
CS119	0.6 + 0x când x < 126	568	0.94	0.694	0.129	81.4	4	-2.20	198.05	-0.71	88.133
	0.5 + 0x când x < 339	339	0.94	0.563	0.089	84.1	10				
	0.5 + -0.01x când x < 67	67.4	0.96	0.586	0.133	77.3	20				
CS120	0.4 + 0x când x < 408	408	0.96	0.481	0.086	82.0	4	-1.79	149.10	-0.93	59.468
	0.4 + 0x când x < 116	356	0.95	0.517	0.113	78.1	10				
	0.4 + 0x când x < 80	80.4	0.95	0.482	0.113	76.6	20				
CS121	0.5 + 0x când x < 362	362	0.95	0.622	0.077	87.6	4	-1.09	101.27	-1.00	46.547
	0.5 + 0x când < 126	126	0.94	0.587	0.106	81.9	10				
	0.5 + -0.01x când x < 50	50.5	0.94	0.585	0.176	69.9	20				
CS018	0.4 + 0x când x < 392	392	0.95	0.477	0.083	82.4	4	-2.69	228.12	-0.84	93.824
	0.4 + 0x când x < 149	149	0.94	0.451	0.115	74.5	10				
	0.4 + 0x când x < 64	64	0.95	0.434	0.115	73.5	20				
CS019	0.5 + 0x când x < 363	363	0.95	0.629	0.072	88.5	4	-1.60	144.26	-1.00	64.377
	0.5 + 0x când x < 177	177	0.94	0.606	0.085	85.8	10				
	0.5 + 0x când x < 77	77.2	0.95	0.57	0.106	81.4	20				
CS020	0.6 + 0x când x < 482	482	0.95	0.711	0.148	79.2	4	-1.07	95.76	0.11	42.479
	0.5 + 0x când x < 280	280	0.94	0.5	0.073	85.3	10				
	0.5 + 0x când x < 147	147	0.95	0.465	0.089	80.8	20				
CS021	0.4 + 0x când x < 408	408	0.96	0.481	0.086	82.0	4	-1.19	98.85	-0.93	39.425
	0.4 + 0x când x < 116	356	0.95	0.517	0.113	78.1	10				
	0.4 + 0x când x < 80	80.4	0.95	0.482	0.114	76.6	20				

Tabel 9.2. Valori CSTV – (valoarea critică de testare) este reprezentată de momentul de timp când concentrațiile DPPH au fost considerate constante pe baza valorilor pantelor 0x de tip 0x și a coeficienților de corelație (R²). Evaluare pentru CSI și CS0.
Table 9.2. CSTV Values – (Critical Test Value) is the time point when DPPH concentrations were considered constant based on 0x type 0x slope values and correlation coefficients (R²). Assessment for CSI and CS0.

9.4 Evaluarea valorilor pentru DPPH în condițiile mediilor produse.

Toate probele analizate în condițiile metodei analitice au fost testate în triplicat, astfel că valorile prezentate în funcție de soi și de perioada de maturare sunt prezentate în tabelul 9.3.

Evaluarea diluției efective pentru vinurile incluse în studiu a urmărit capacitatea acestora din punct de vedere a acțiunii asupra reactivului DPPH (1.1-difenil-2-picril-hidrazil) precum și stabilitatea în timp.

Problele caracteristice CS au prezentat valorile cele mai ridicate din punct de vedere a IC50, astfel că nivelele s-au încadrat între 23.98 ± 4.40 (CS021) și 26.49 ± 2.51 (CS121). Aceste valori au fost comparabile pe toată perioada de monitorizare, cu toate că ratele de descreștere au fost diferite la comparația celor 2 tipuri de vinuri vinificate prin cele 2 metode de vinificație propuse. Se constată o rată de descreștere neliniară în cazul probelor fără SO₂ datorită variației mai mari între probele 2021 și 2020, astfel că valoarea CS020 a fost 16.42 ± 1.43 și a evoluat până la 10.95 ± 2.08 pentru CS018. Valoarea comparabilă a fost înregistrată pentru CS118 pentru care nivelul a fost de 10.76 ± 0.91 (Garaguso și Nardini (2015)).

<i>CABERNET SAUVIGNON (CS)</i>											
-SO ₂						+SO ₂					
#	\bar{X}	SD	\tilde{X}	CI(95%)	IC50	#	\bar{X}	SD	\tilde{X}	CI(95%)	IC50
018	91.29	2.08	90.84	5.16	10.95	118	92.92	0.91	92.93	2.25	10.76
019	89.18	1.15	89.00	2.87	11.21	119	63.25	1.39	63.67	3.45	15.81
020	60.89	1.43	60.87	3.56	16.42	120	44.88	2.73	44.31	6.78	22.28
021	41.70	4.40	40.59	10.94	23.98	121	37.75	2.51	38.97	6.24	26.49
<i>CABERNET SAUVIGNON ROZE (CSR)</i>											
-SO ₂						+SO ₂					
018	726.73	5.23	731.65	9.05	1.38	018	679.36	1.30	678.80	2.24	1.47
019	651.17	1.45	649.94	2.52	1.54	019	626.26	0.77	625.88	1.33	1.60
020	657.02	1.42	657.17	2.46	1.52	020	599.11	0.89	599.78	1.55	1.67
021	619.04	1.29	618.19	2.23	1.62	021	582.74	1.32	581.69	2.29	1.72
<i>FETEASCĂ REGALĂ (FR)</i>											
-SO ₂						+SO ₂					
018	622.78	5.30	622.42	13.16	1.61	018	527.67	1.51	527.21	2.29	1.90
019	521.83	1.38	521.26	3.43	1.92	019	498.31	4.09	498.33	16.71	2.01
020	531.34	1.28	531.51	3.18	1.88	020	471.78	1.29	471.08	1.65	2.12
021	401.53	4.20	399.35	10.44	2.49	021	481.46	1.49	481.99	2.23	2.08
<i>FETEASCĂ REGALĂ FRIZANTE (FRF)</i>											
-SO ₂						+SO ₂					
018	450.59	3.33	450.97	8.27	2.22	018	685.62	4.45	686.26	19.81	1.46
019	420.45	1.89	419.72	4.70	2.38	019	662.48	2.64	663.11	6.96	1.51
020	418.65	0.34	418.48	0.84	2.39	020	480.16	1.26	479.97	1.59	2.08
021	398.96	2.18	399.16	5.41	2.51	021	450.46	2.26	451.60	5.12	2.22

Tabel 9.3. Valorile IC50 pentru probele incluse în studiu (\bar{X} – valoare medie, SD – deviație standard, \tilde{X} – valoare mediană, CI(95%) – interval de confidență (95%).

Table 9.3. IC50 values for the samples included in the study (\bar{X} – mean value, SD – standard deviation, \tilde{X} – median value, CI(95%) – confidence interval (95%).

Evaluarea în cazul celorlalte soiuri de vinuri indică faptul că prezintă o eficiență mult mai scăzută așa cum este menționat și în alte studii (Fernández-Pachón ș.a., 2004; Paixão ș.a., 2007).

Caracterizarea nivelelor pentru CSR s-a efectuat comparativ utilizând ca variabile de grupare, tipul de vin, tratamentul și anii de studiu. Astfel, în ceea ce privește tratamentul tendințele au fost similare, în schimb ratele de descreștere au fost inferioare față de alte soiuri incluse în studiu. Astfel, nivelele au fost mai scăzute la aproximativ 9.85 ± 1.71 % față de Cabernet Sauvignon (CS). Evaluarea dozei efective 50 (IC50) a determinat valori mai ridicate ale nivelelor la vinurile care au fost vinificate la nivelul anului 2021, astfel CSR021 a prezentat valori 1.62 ± 0.98 și respectiv 1.72 ± 0.63 CSR121 (Gabriele ș.a., 2018).

Pe perioada de monitorizare 2021 → 2018 considerând valorile în cei 4 ani de stabilitate ai vinurilor, concentrațiile au fost indirect proporționale cu perioada de monitorizare pentru că au prezentat aceeași tendință descrescătoare cu rate comparabile. Astfel următoarele valori s-au înregistrat pentru probele din 2020 (CSR020 – 1.52 ± 1.42 , CSR120 – 1.67 ± 0.89) și respectiv 2019 (CS019 – 1.54 ± 1.45 și CS119 – 1.60 ± 0.77). Rata de descreștere a ajuns la $85 \pm 0.7\%$ din activitatea inițială a vinului (IC50), valoare care este confirmată de nivelele 1.38 ± 0.64 – CSR018 și respectiv 1.47 ± 0.38 – CSR118.

Așa cum s-a menționat și anterior, probele pentru Fetească regală au prezentat o activitate ușor superioară față de probele de Cabernet Sauvignon roze, nivelele medii fiind de 2.02 ± 0.21 – FR0 și respectiv 1.97 ± 0.36 – FR1. Pentru probele frizzante (FRF0 și FRF1) raportul dintre activități a fost invers, valoarea IC50 a fost mai mare pentru FRF0 – 2.37 ± 0.63 și respectiv pentru FRF1 – 1.82 ± 0.72 .

La nivelul valorilor individuale, descreșterea s-a confirmat la toate tipurile de vin. La nivelul valorilor FR, pentru probele 2021 s-au înregistrat valori de 2.49 ± 0.42 – FR021 și respectiv 2.08 ± 1.49 – FR121. Date comparabile au fost înregistrate pentru FRF pentru care nivelele au fost de 2.5 ± 0.22 FRF021 și respectiv 2.22 ± 0.23 FRF121 (Rivero-Pérez ș.a., 2007).

Ratele de descreștere au fost determinate de timp și au fost dependente de condițiile de păstrare, o diferență aparte a fost pentru FRF118 care s-a comportat diferit pentru că nivelele au fost superioare de 2.22 ± 0.33 față de 1.46 ± 0.46 – FRF018, 1.61 ± 0.53 – FR018 și respectiv 1.90 ± 0.15 – FR118.

Analiza multi-factorială (tabel 9.4) folosind ca indicatori de comparație tipul de vin - tratament (+SO₂ și -SO₂) și respectiv soi (CS, CSR, FR, FRF) a relevat faptul că $p > 0.05$ la comparația între tratamente a fost doar în cazul probelor de Cabernet Sauvignon (CS) și respectiv în cazul probelor de Cabernet Sauvignon Rose (CSR), deci nu este diferență semnificativă între cele 2 tipuri de vin. În schimb, așa cum se observă s-au constatat diferențe între soiuri (Arnous ș.a., 2002)

Parametrii de probabilitate între soiuri au prezentat valori $p < 0.05$ ceea ce indică că s-au produs evoluții semnificative, excepție a fost produsă pentru FR0 și respectiv FRF0. Pentru ambele tratamente s-au înregistrat valori apropiate și din punct de vedere a mediilor dar și a deviațiilor standard.

Valoarea medie a probelor de tip FR1, considerând mediile calculate prin contribuția determinată de variabilele categoriale tratament și an, a fost 2.10 ± 0.25 , iar pentru FRF0 s-au înregistrat 2.00 ± 0.23 . Aceeași situație a fost considerată și pentru FR0 și respectiv FRF1 datorită valorii $p = 0.329$ confirmată de valori medii de 1.97 ± 0.37 (FR0) și respectiv 1.82 ± 0.39 (FR1). Situație similară a fost și pentru evaluarea comparativă între Fetească regală fără SO₂ (FR0) adăugat și respectiv Cabernet Sauvignon Roze cu SO₂ adăugat (CSR1) (Di Majo ș.a., 2008).

	Tip de vin	Vari etate	{1} - 70.766	{2} - 663.49	{3} - 519.37	{4} - 494.81	{5} - 59.701	{6} - 621.87	{7} - 422.16	{8} - 569.68
1	-SO2	CS		0.0001	0.0001	0.0001	0.9997	0.0001	0.0001	0.0001
2	-SO2	CSR	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001	0.5766	0.0001	0.0016
3	-SO2	FR	0.0001	0.0001		0.9548	0.0001	0.0005	0.0010	0.3290
4	-SO2	FRF	0.0001	0.0001	0.9548		0.0001	0.0001	0.0327	0.0246
5	+SO2	CS	0.9997	0.0001	0.0001	0.0001		0.0001	0.0001	0.0001
6	+SO2	CSR	0.0001	0.5766	0.0005	0.0001	0.0001		0.0001	0.2836
7	+SO2	FR	0.0001	0.0001	0.0010	0.0327	0.0001	0.0001		0.0001
8	+SO2	FRF	0.0001	0.0016	0.3290	0.0246	0.0001	0.2836	0.0001	

Tabel 9.4. Testul Tukey HSD; variabila IC50 Probabilități Aproximative pentru Testele Post Hoc Eroare: Între MS = 2980.4, df = 88.000.

Table 9.4. Tukey HSD test; variable IC50 Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2980.4, df = 88,000.

9.5 Testarea conținuturilor de polifenoli, flavone și taninuri implicați în stabilitatea vinurilor fără SO₂

9.5.1 Determinarea conținutului total de fenoli

În baloane cotate de 25 ml fost prelevate volume de 0.25 mL vin roșu (CS), diluat în prealabil 1/5 (10 mL vin la balon cotate de 50 mL) sau 0.25 ml vin alb (FR, FRF) și roze (CSR) care au fost amestecate cu 10 ml apă, 1.25 mL reactiv Folin-Ciocalteu și s-au completat la semn cu soluție Na₂CO₃ (7.5 %; w/v). Amestecul a fost menținut la întuneric 30 de minute înainte ca absorbanta să fie măsurată la 750 nm. Rezultatul este exprimat sub formă de indice Folin-Ciocalteu (Fc) și obținut înmulțind absorbanta (densitatea optică) cu factorul de diluție F care în cazul vinurilor roșii diluate 1/5 a fost de 500 pentru vinuri roșii și 100 în cazul vinurilor albe:

$$F_c = A_{750} \times F \quad (14)$$

în care: Fc= indicele Folin-Ciocalteu și A₇₅₀ = absorbanta (densitatea optică) citită la 750 nm (Singleton ș.a., 1999).

9.5.2 Determinarea conținutului total de flavone

Pentru analiză s-a folosit proprietatea flavonelor de a reacționa specific cu clorura de aluminiu (III). Toate substanțele chimice folosite au fost de grad analitic și nu au necesitat purificare suplimentară. Clorura de aluminiu hexahidratată ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), (+)-catechina au fost obținute de la Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, SUA), în timp ce azotitul de sodiu NaNO_2 și hidroxidul de sodiu (NaOH) au fost obținute de la Fluka (Buchs, Elveția). Apa ultrapură provenită dintr-un sistem Thermo cu rezistivitatea $> 18 \text{ M}\Omega$ și etanolul absolut de puritate analitică au fost utilizate pentru pregătirea tuturor soluțiilor.

Metoda spectrofotometrică, descrisă de Zhishen ș.a., (1999) pentru determinarea flavonoizilor totali, a fost adaptată pentru sistem de analiză cu microplăci cu 96 de godeuri (Tecan MicroPlate reader). Soluția stoc de (+)-catechină (1.500 mg/L) a fost pregătită într-o soluție etanolică 10% (v/v). Soluțiile standard de lucru de quercetină ($20.0 - 200.0 \text{ mg/L}$) au fost pregătite zilnic prin diluția soluției stoc în soluție etanolică 10% (v/v).

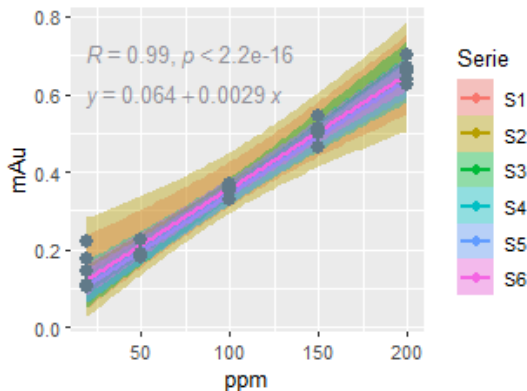
Astfel, în fiecare godeu s-au adăugat $75 \mu\text{L}$ de soluție standard de (+)-catechină sau de probă de vin și $75 \mu\text{L}$ de soluție azotit de sodiu NaNO_2 (6 g/L). După 5 minute, s-a adăugat $75 \mu\text{L}$ de soluție clorură de aluminiu $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (22 g/L). După 6 minute, s-au adăugat $75 \mu\text{L}$ de soluție NaOH ($0,8 \text{ M}$), iar absorbanta complexului de colorație roz format a fost monitorizată la 510 nm în fiecare minut timp de 10 minute. Concentrația finală de NaNO_2 , Al(III) și NaOH în cazul fiecărei probe după diluție a fost de 1.5 g/L , 0.61 g/L și respectiv 0.2 M .

Blancul de reactiv a fost evaluat prin adăugarea a $75 \mu\text{L}$ de soluție etanolică 10% (v/v) în loc de catechină standard sau probă. Toate experimentele au fost realizate în cvadruplicat la temperatura camerei ($25 \pm 1.0^\circ\text{C}$). Studiile referitoare la reacție, inclusiv timpul de reacție după adăugarea NaNO_2 sau Al(III) și concentrația reactivilor utilizați, au fost comparate cu acest protocol folosind vin roșu ca model de probă.

Datele sunt raportate ca medie \pm deviație standard pentru cel puțin șase replicare. Valorile coeficienților de corelație și pentru pantele obținute s-au încadrat în nivelurile de încredere a valorilor prezise. În acest context, s-a putut efectua estimarea concentrației ca și $\text{mEq catechina/L vin}$ (mg ECA/L). Valoarea limitelor de cuantificare și a limitelor de detecție pentru metoda testată au fost de $10.39 \pm 1.23 \text{ mg ECA/L}$ iar limita de cuantificare este de $3.60 \pm 0.69 \text{ mg ECA/L}$.

Taninurile din probe s-au determinat prin intermediul indicelui D280, după o pre-tratare a fiecărei probe cu polivinilpirolidonă și determinare absorbantă înainte și după tratamentul probelor. Evaluarea concentrațiilor s-a efectuat tot prin raportare la echivalenți epicatechină determinați dintr-un litru de vin, considerând volumul caracteristic de probă, factorii de diluție și respectiv absorbantele probelor (Canuti ș.a., 2012).

ABSORBANȚĂ (mAu)	CONCENTRATII (PPM)				
	20	50	100	150	200
0.18	0.18	0.36	0.55	0.64	
0.22	0.19	0.33	0.51	0.67	
0.11	0.18	0.37	0.50	0.70	
0.11	0.22	0.35	0.46	0.66	
0.10	0.18	0.37	0.50	0.63	
0.14	0.19	0.36	0.50	0.66	



Tabel 9.5 Liniaritate metodă de analiză pentru testarea flavonelor prin derivatizare cu clorură de aluminiu.

Figura 9.5. Liniaritate probe (+)-catechină ($\mu\text{g/mL}$).

Table 9.5 Linearity of the analytical method for the testing of flavones by derivatization with aluminum chloride.

Figure 9.5. Linearity samples (+)-catechin ($\mu\text{g/mL}$).

9.5.3 Rezultate și discuții privind implicațiile în calitatea și stabilitatea anti-oxidantă a vinurilor

9.5.3.1 Evaluarea corelațiilor dintre compuși fenolici, taninuri și flavone

Conținutul total de flavonoizi al probelor a fost evaluat prin metoda standard convențională (Tagliacruzchi ș.a, 2010) (tabel 9.6). Luând în considerare limitele intervalului de încredere de 95% prezentate, interceptul și panta calculate nu diferă semnificativ de valorile 0 și 1.

Conținutul total de polifenoli a variat între 608.67 mg EAG/L pentru Cabernet Sauvignon și respectiv 71.43 mg EAG/L pentru Fetească regală. Varietatea Cabernet Sauvignon, în special eşantionul forma fără SO_2 a prezentat o valoare de 616.68 ± 3.41 mg EAG/L, a avut cel mai mare conținut total de fenoli, urmată de varietățile Fetească regală Frizzante (FRF) (125.57 ± 0.95 mg EAG/L (FRF121)) și respectiv 106.41 ± 7.76 mg EAG/L (CSR121). Valorile cele mai mici au fost obținute pentru varietățile varietatea Fetească regală 45.23 ± 2.3 mg EAG/L (FR019) și respectiv 63.76 ± 2.96 mg EAG/L (CSR119).

S-a constatat din punct de vedere a valorilor medii, determinate în raport cu tipurile de antioxidanți introduși, conținuturile de polifenoli au avut corelație directă și respectiv s-au situat la valori superioare în cazul probelor care au avut administrat SO_2 (doze de 80 mg/L liber) și respectiv 40 mg/L acid ascorbic.

În aceste condiții valorile IFC au fost superioare doar în cazul probelor CS care, în cazul amestecurilor TVS-TVC-TG, au prezentat valori de 616.68 ± 20.76 mg EAG/L, în schimb probele care au prezentat același amestec dar în combinație cu acid ascorbic 40 mg/L au determinat valori de 600.67 ± 14.89 mg EAG/L. Evaluarea a arătat valori semnificativ diferite în cazul probelor care nu au prezentat SO_2 adăugat.

În acest context, pentru varietatea CS și nivelele flavonelor și a taninurilor au fost mai ridicate în cazul probelor fără SO₂.

CABERNET SAUVIGNON -SO ₂				CABERNET SAUVIGNON ROZE -SO ₂			
#	IFC	Fl	T	#	IFC	Fv	T
CS018	729.13	62.73	176.64	CSR018	93.88	2.20	11.59
	4.88	0.21	0.78		10.27	0.48	0.17
CS019	559.17	215.94	56.40	CSR019	84.21	2.80	8.22
	7.15	0.42	0.28		7.10	0.15	0.03
CS020	616.26	97.41	151.95	CSR020	76.95	3.36	8.42
	3.41	0.51	0.49		9.70	0.06	0.01
CS021	526.87	27.42	101.78	CSR021	77.98	2.98	11.93
	4.10	0.22	0.14		9.30	1.01	0.14
CABERNET SAUVIGNON + SO ₂				CABERNET SAUVIGNON ROZE + SO ₂			
#	IFC	Fl	T	#	IFC	Fv	T
CS118	662.38	178.11	104.05	CSR118	78.68	2.71	10.38
	6.12	1.28	0.10		5.16	0.22	0.08
CS119	611.57	92.27	121.59	CSR119	63.76	2.95	9.49
	3.75	0.58	0.07		2.96	0.03	0.13
CS120	601.87	126.49	143.92	CSR120	121.88	2.91	10.53
	22.46	0.30	0.24		25.04	0.33	0.22
CS121	58.13	9.78	3.73	CSR121	106.41	2.60	11.48
	5.64	0.02	0.30		7.76	0.16	0.09
FETEASCĂ REGALĂ + SO ₂				FETEASCĂ REGALĂ FRIZZANTE + SO ₂			
#	IFC	Fl	T	#	IFC	Fl	T
FR018	58.13	0.51	9.78	FRF018	85.75	1.25	14.94
	5.64	0.42	0.02		5.02	0.25	0.12
FR019	45.23	0.20	3.99	FRF019	82.24	1.62	9.92
	2.30	0.02	0.02		3.79	0.02	0.03
FR020	65.24	0.12	8.68	FRF020	67.12	0.23	7.77
	6.05	0.03	0.08		13.37	0.10	0.11
FR021	47.28	0.11	4.14	FRF021	74.91	1.21	18.17
	2.04	0.01	0.14		8.24	0.13	0.06
FETEASCĂ REGALĂ - SO ₂				FETEASCĂ REGALĂ FRIZZANTE - SO ₂			
#	IFC	Fl	T	#	IFC	Fl	T
FR118	106.60	0.45	17.71	FRF118	81.40	0.21	14.49
	4.13	0.06	0.11		4.72	0.05	0.12
FR119	101.09	0.25	15.35	FRF119	116.08	0.49	19.19
	6.25	0.12	0.27		21.18	0.08	0.01
FR120	54.78	0.53	4.31	FRF120	115.98	0.77	15.15
	5.90	0.02	0.05		22.42	0.07	0.05
FR121	93.09	0.56	14.55	FRF121	125.57	0.29	7.14
	19.77	0.06	0.25		9.49	0.09	0.05

Tabel 9.6. Valorile Indicelui Folin Ciocalteu (mg EAG/L), Flavonelor (mg ECA/L) și respectiv Taninuri (mg/L) pentru fiecare tip de vin, în funcție de varietate (CS, CSR, FR, FRF) și metoda de vinificație (-SO₂/ +SO₂) (valori medii / deviații standard).

Table 9.6. The values of the Folin Ciocalteu Index (mg EAG/L), Flavones (mg ECA/L) and respectively Tannins (mg/L) for each type of wine, depending on the variety (CS, CSR, FR, FRF) and the winemaking method (-SO₂/ +SO₂) (mean values / standard deviations).

Considerând nivelele de compuși fenolici pentru celelalte tipuri de varietăți, s-a constatat faptul că în cazul FRF diferențele între probele +SO₂/ -SO₂ au fost 34.92 ± 13.84 mg EAG/L datorită faptului că nivelele medii au prezentat concentrații de

88.89 ± 23.15 mg EAG/L FRF1 și respectiv 53.96 ± 9.30 mg EAG/L pentru FRF0. La probele de tip vin liniștit, CSR și respectiv FR, diferențele au fost mai scăzute de 23.71 ± 15 mg EAG/L și respectiv 17.96 ± 14.96 mg EAG/L, acest tip de probe beneficiind doar de procese de macerație scurtă sau fără macerație (FR), dar așa cum s-a constatat și la evaluarea antocianilor, stabilitatea a fost cea mai ridicată.

În acest context, luând în calcul varietatea vinurilor, s-au constatat valori ridicate pentru vinurile roșii CS de 120.26 ± 35 mg ECA/L valoare ce reprezintă aproximativ 20% din compușii fenolici.

În schimb, pentru celelalte varietăți de vin, nivelele de taninuri au fost mult mai scăzute, în directă corelație menținută cu flavonele, adică pentru CSR valorile au fost de 3.32 ± 0.58 mg ECA/L, FR a prezentat un nivel de 1.90 ± 0.56 mg ECA/L și, la fel ca în cazul anterior, FRF o valoare ușor mai ridicată de 2.98 ± 0.98 mg ECA/L.

În schimb, la evaluarea probelor s-a demonstrat faptul că în cazul amestecurilor unde s-a utilizat tanin citric, nivelele obținute de taninuri au fost superioare, în aceste condiții este posibil ca rapoartele taninuri precipitabile să fie mult inferioare. S-a constatat faptul că pentru amestecul TC-TB, fracția de taninuri raportată la doza aplicată (tabelul 9.6) a fost de 18.21 ± 5.89%, pentru TC-TB (tanin citric – tanin alb) a fost de 35.84 ± 25.44%, iar în cazul TG-TC (tanin galic – tanin citric) a fost de 31.90 ± 11.37%.

Monomerii de tip flavan-ol au fost determinați în vinurile studiate în raport cu catechină. Nivelele de concentrație pentru catechină în vinurile roșii sunt în acord cu valorile raportate pentru vinurile franceze și germane (Tintunen și Lehtonen, 2001). În aproape toate eșantioanele, flavonele au fost abundente, independente de timpul de maturare. Rezultatele noastre au confirmat descoperirile anterioare care au raportat catechina ca fiind cel mai important flavanol găsit în vinurile făcute din diferite soiuri de struguri (Monagas ș.a., 2005; Gomez-Alonso ș.a., 2007). Variabilitatea mare obținută pentru concentrațiile de flavonele totale, atât între cele trei tipuri de vinuri (alb, roze și roșu), cât și între vinurile roșii, poate fi atribuită tehnicilor de vinificație (prin specificitate dar și prin amestecurile adăugate) dar și soiului de struguri. Nivelele ridicate de flavone în unele eșantioane pot fi consecința unei mai bune extracții a taninurilor de struguri în vin, în timpul unei macerări mai lungi cât și datorită concentrațiilor de taninuri adăugate, hidrolizabile sau policondensate. În ceea ce privește nivelurile regăsite este absolut evident că cele mai ridicate nivele au fost pentru CS cu valori medii de 114.03 ± 57.71 mg ECA/L, dar în schimb la variantele de vin la care dozele de taninuri au fost mai mici, nivelurile au prezentat corelație pozitivă astfel că s-au înregistrat valori de 10.25 ± 1.36 mg ECA/L pentru CS, respectiv 9.81 ± 5.27 mg ECA/L pentru FR.

FRF, forma frizzante pentru Fetească regală a prezentat o valoare mai ridicată decât FR, ceea ce indică faptul că depozitul de autoliză și fermentația secundară

reprezintă o sursă de stabilitate pentru extracția mai ridicată a flavonelor din struguri valoarea fiind de 13.34 ± 4.36 mg ECA/L.

Cantitățile de compuși fenolici variază în diferitele mostre de vin în funcție de soiul de struguri, factorii de mediu din vie, tehnica de prelucrare a vinului, solul și condițiile atmosferice în timpul maturării sau procesul de maturare a boabelor (Pérez-Magariño și González-San José, 2006). Rezultatele noastre confirmă această variație în conținutul de fenoli între mostrele de vin testate, conținutul total de fenoli în vinul roșu fiind de până la 10 ori mai mare decât în vinul roze și alb, explicat prin conținutul mai ridicat de taninuri condensate și antociani. Aceste diferențe pot fi, așa cum s-a menționat și la flavone, rezultatul unei mai bune extracții a fenolilor din coaja și semințele strugurilor în funcție de timpul de contact al mustului cu pielea și semințele. Conținutul maxim de fenoli al vinurilor roșii a contribuit la creșterea activității lor antioxidante în comparație cu vinul roze și alb.

Prin urmare, obținerea unui conținut ridicat de flavone totale pentru vinurile obținute este un rezultat dorit deoarece flavone au demonstrat să aibă activități antioxidante puternice în diferite medii (Arnous ș.a., 2001). În plus, conținutul de flavone este un parametru cheie pentru calitatea vinului deoarece acești compuși sunt responsabili pentru astringență și amărăciune. De asemenea, ei joacă un rol important datorită interacțiunilor lor cu alți compuși fenolici în timpul maturării vinului (Boulton, 2001).

Din punct de vedere a capacității antioxidante, considerând nivelurile tuturor compușilor de tip fenolici, flavone și respectiv taninuri, este de remarcat faptul că nivelele medii ale compușilor studiați, grupate după criteriul $+SO_2/-SO_2$, au relevat inexistența unor diferențe semnificative considerând perioada de monitorizare și respectiv stabilitatea acestor compuși în diverse tipuri de vin.

Conform tabelului 9.7. se observă faptul că la comparația ANOVA, pentru testul de varianță, nu s-au remarcat valori semnificative statistic diferite în condițiile în care, așa cum s-a menționat și anterior, valorile medii includ și dinamica vinurilor pe perioada de păstrare.

Astfel, probele fără $-SO_2$ au prezentat valori de 207.85 ± 34.85 mg EAG/L (IFC), în raport cu 223.00 ± 32.16 mg EAG/L ($+SO_2$) ($p > 0.05$), în timp ce flavonele au înregistrat valori de 37.85 ± 8.23 mg ECA/L ($-SO_2$) și 35.88 ± 7.15 mg ECA/L ($p > 0.05$), respectiv taninurile au prezentat concentrații de 32.72 ± 8.28 mg/L ($-SO_2$) și 31.50 ± 7.38 mg/L ($+SO_2$) ($p > 0.05$). Aceste valori sunt cu atât mai remarcabile cu cât dozele de antioxidanți utilizați au fost diferite pentru a suplimenta lipsa de SO_2 și acid ascorbic cu taninuri cu rol protectiv: probele $-SO_2$ au avut doze de 36.47 ± 3.92 g/hL și respectiv dozele $+SO_2$ au fost de 24.19 ± 3.86 g/hL (Rastija ș.a., 2009).

Au existat diferențe semnificative între și în cadrul fiecărei varietăți, în funcție de tipul de vin, diferențe care au prezentat corelație directă sau corelație inversă în raport cu dozele aplicate. Din punct de vedere a tratamentelor antioxidante,

s-a constatat faptul că acestea au prezentat similarități la nivelul amestecurilor introduse, prin intermediul tipurilor de taninuri cu specificitate la tipul de vin (CS, CSR, FR sau FRF).

	IFC		FLAVONE		TANINURI		DOZE ANTIOXIDANTI	
	M	SE	M	SE	M	SE	M	SE
-SO ₂	207.85	34.85	37.85	8.23	32.72	8.28	36.47	3.92
+SO ₂	223.00	32.16	35.88	7.15	31.50	7.38	24.19	3.86
p	0.750		0.857		0.912		0.028	

Tabel 9.7. Valorile medii ale compușilor fenolici (mg EAG/L), flavone (mg EQ/L), taninuri (mg ECA/L), valori medii ale dozelor de antioxidanți (g/hL).

Table 9.7. Average values of phenolic compounds (mg EAG/L), flavones (mg EQ/L), tannins (mg ECA/L), average values of antioxidant doses (g/hL).

Conținutul total de fenoli a fost, de asemenea, corelat negativ în cazul amestecului de tip TVS-TVC-TG (aplicat pentru formele de tip CS0) pentru care coeficientul de corelație între compușii fenolici și flavone a fost $r=-0.73$, dar în cazul raportului compuși fenolici/taninuri a avut o corelație pozitivă $r=0.85$. În cazul amestecului de TVS-TVC-TG-AA, raportul IFC/Flavone a prezentat o corelație pozitivă, $r=0.93$ și de asemenea o variație semnificativă a conținutului de taninuri în raport cu anul de vinificație $r=0.95$. Atât timp cât monitorizarea s-a efectuat între 2018 – 2021, valoarea pozitivă a coeficientului de corelație indică faptul că în timp, pe perioada de maturare, nivelul taninurilor a scăzut odată cu învechirea vinului, ceea ce nu s-a produs și în cazul probelor fără adaos de sulfiți ($r=0.04$, $p>0.05$) Prin urmare, perioada de maturare a vinului reprezintă un factor esențial în variația conținutului de compuși fenolici totali ce, în acest caz, prezintă influență asupra taninurilor și a fost condiționată de dozele aplicate.

Rezultatele confirmă studiile efectuate până în prezent care indică faptul că prezența SO₂ în vinuri nu are o influență semnificativă asupra activității antioxidante a acestora. Astfel, rezultatele obținute de Garaguso și Nardini (2015) indică faptul că vinurile roșii organice produse fără adăugarea de dioxid de sulf/sulfii prezintă activitate antioxidantă, profil fenolic, conținut total de polifenoli și flavonoizi comparabile cu cele ale vinurilor roșii convenționale. Într-un alt studiu, Gabriele ș.a., (2018) au urmărit influența SO₂ asupra profilului fitochimic și activității antioxidante in vitro a vinurilor și au găsit rezultate comparabile pentru vinurile produse fără adăugarea de SO₂ și cele cu adăugarea a 50 mg/L SO₂.

9.5.3.2 Evaluarea corelațiilor dintre compuși fenolici, taninuri și flavone și activitatea anti-radicalică

Atât timp conținutul de flavone, antociani și chiar capacitatea anti-radicalică au fost liniare în timp, datele constante ale vinurilor pentru indicii Folin Ciocâlteu pot fi compensate de prezența altor categorii precum acizi fenolici care condiționează semnificativ prezența acestor compuși bioactivi în vin. În aceste condiții s-a constatat o variație semnificativă în cazul probelor de tip FRF. Probele de tip FRF0 (TG-TC) cât și FRF1 (QT-TG-AA) au prezentat aceeași variație directă de tip IFC/flavone unde

$r=0.81$ (FRF0) și respectiv $r=0.90$ (FRF1), o corelație invers proporțională a taninurilor în raport cu perioada de maturare ($r=-0.83$ (FRF1)) și respectiv $r=-0.70$ (FRF0)).

În fig. 9.7 sunt prezentate corelațiile între parametri cu implicații în stabilitatea oxidativă a vinurilor, determinate de factorii de studiu ca tehnologie de vinificație, adică tehnologie care utilizează SO_2 și respectiv utilizarea antioxidantilor de origine vegetală, fără adaos suplimentar de SO_2 ($-\text{SO}_2$). Din punct de comparație dintre cele 2 tehnologii, coeficienții de corelație au fost similari și au prezentat variații comparative. S-a constatat că pentru IFC/flavone coeficienții de corelație $r=0.80$ ($-\text{SO}_2$) și $r=0.88$ ($+\text{SO}_2$), o relație similară s-a produs pentru IFC/ taninuri ($r=0.95$) ($-\text{SO}_2$) care s-a menținut și pentru probele $+\text{SO}_2$ ($r=0.98$).

Din punct de vedere a implicațiilor asupra stabilității oxidante a probelor, considerând parametrii din activitățile anti-radicalice, relația este directă și cu impact semnificativ și asupra caracterului oxidativ. Acest aspect este determinat de faptul că antioxidanții sunt compușii care reduc sau previn oxidarea, iar aceștia sunt responsabili pentru activitatea anti-radicalică a vinului (Bai ș.a., 2013).

Cum unul dintre cele mai importante tipuri de antioxidanți din vin sunt polifenolii, care includ flavonoidele (cum ar fi flavonele și taninurile) și a căror impact este semnificativ, se deduce că un vin cu o activitate anti-radicalică puternică poate fi mai rezistent la oxidare și poate avea o durată de viață mai lungă, menținându-și astfel calitățile organoleptice (gust, aromă, culoare) pentru o perioadă mai lungă de timp (Ionete ș.a., 2019).

Deci, în aceste condiții, impactul asupra stabilității oxidante, asupra stabilității culorii și aspectului vinurilor roze sau albe, s-a considerat ca fiind influențat de valorile taninurilor, compușilor fenolici și respectiv taninurilor în condițiile în care nivelurile au prezentat constanță în perioada de maturare a vinurilor, dar și puternic corelate cu conținuturile altor compuși fenolici.

Aspectele sunt confirmate de coeficienții de corelație cu valori comparabile IFC/IC50 ($r=0.87$) pentru probele tip de vin: $-\text{SO}_2$ și respectiv $r=0.89$ pentru tip de vin $+\text{SO}_2$. Corelațiile similare au fost pentru flavone/IC50 ($r=0.79$) ($-\text{SO}_2$) dar și pentru flavone/IC50 ($r=0.85$) ($+\text{SO}_2$). În același fel, activitatea antioxidantă, justificată de conținuturile de taninuri adăugate dar și extrase din struguri a fost influențată de prezența acestor compuși cu caracter benefic, astfel raportul taninuri/IC50 a avut o corelație ($r=0.83$) la probele de tip $-\text{SO}_2$, în aceeași manieră s-a produs și în cazul tipurilor de vin $+\text{SO}_2$ ($r=0.94$). În toate aceste cazuri $p<0.05$ pentru cazurile analizate și specificate anterior.

Aceste constatări au fost în acord cu cele raportate de câțiva autori (Rivero-Pérez ș.a., 2007), dar în contrast cu alții care au arătat o corelație pozitivă între conținutul total de fenoli al vinurilor și activitatea lor antioxidantă evaluată prin metoda DPPH (Fernández-Pachón ș.a., 2004). Prin urmare, putem concluziona că

activitatea antioxidantă a vinurilor este mai mult legată de tipul de compuși fenolici individuali găsiți în vinuri decât de conținutul total de fenoli. De asemenea, s-a sugerat că activitatea antioxidantă se datorează în principal fracțiunii de flavan-3-oli și nu antocianilor. Fenolicii polimerici și alți pigmenți nu ar putea avea caracteristici antioxidante similare în comparație cu antocianii monomerici, iar o posibilă sinergie sau antagonism între diferitele clase de polifenoli ar putea influența capacitatea antioxidantă (Arnous ș.a., 2002; Di Majo ș.a., 2008).

9.5.4 Concluzii

Structura și proprietățile chimice și senzoriale ale taninurilor oenologice comerciale au fost revizuite și s-a constatat că interacțiunile acestor taninuri cu componentele vinului pot fi complexe și, deși există o mare varietate de taninuri, proprietățile lor, cum ar fi sursa botanică, compoziția, puritatea, solubilitatea și cinetica reacției, influențează calitatea vinului. S-a constatat că proprietățile acestor compuși cu caracter anti-oxidant s-a dovedit ca fiind comparabile și pot fi alternativă viabilă pentru substituția dioxidului de sulf. .

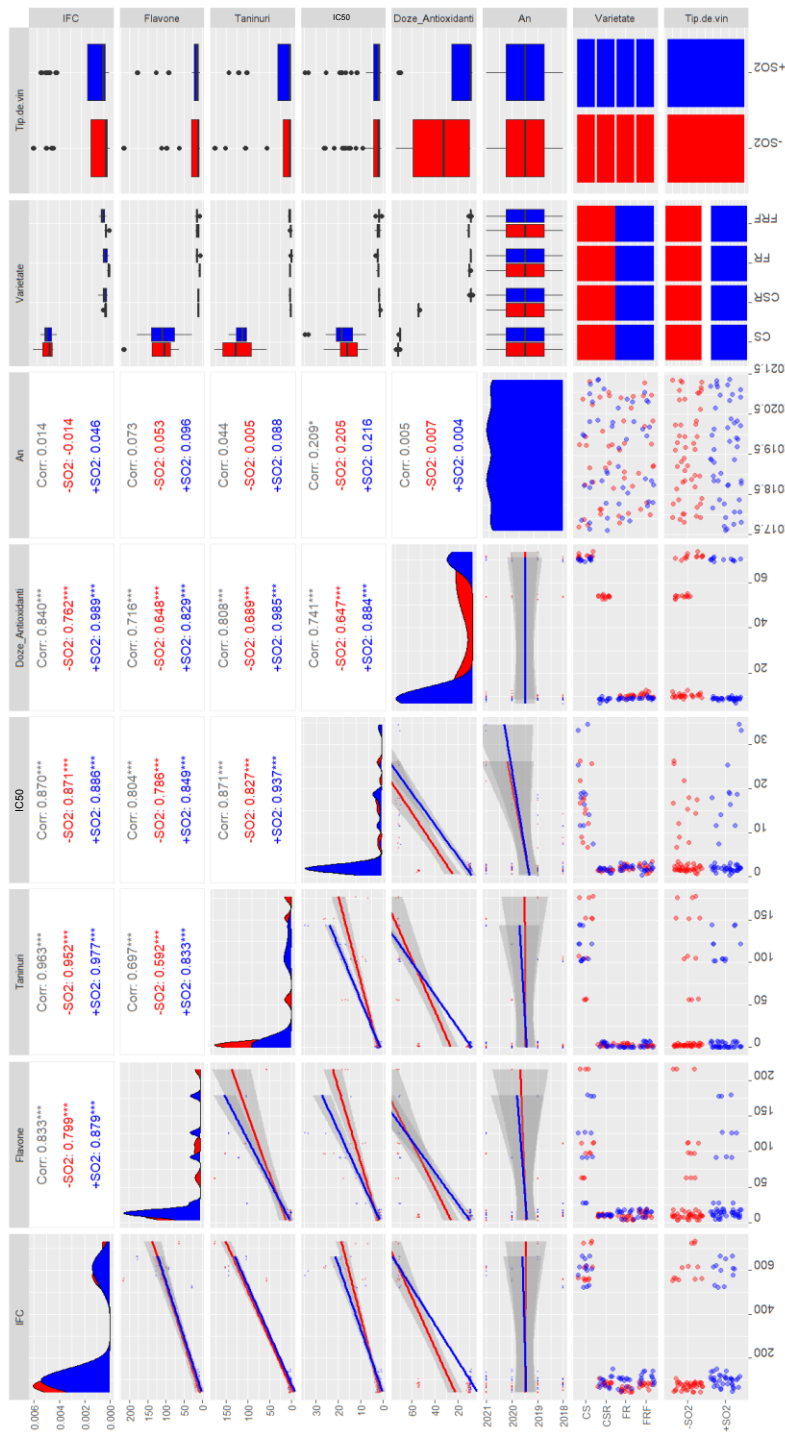


Figura 9.6. Matricea de corelație pentru relația interdependentă dintre conținuturile de compuși fenolici (IFC), flavone, taninuri și activitate anti-radicalică, în raport cu perioada de stabilitate a probelor, dozele de antioxidanți, pe fiecare varietate de vin și pe fiecare tip conform metodei de vinificație.

Figure 9.6. Correlation matrix for the interdependent relationship between the contents of phenolic compounds (IFC), flavones, tannins and antiradical activity, in relation to the stability period of the samples, the doses of antioxidants, on each wine variety and each type according to the winemaking method.

10 EFECTUL NIVELELOR DE DIOXID DE SULF ADĂUGAT ASUPRA CARACTERISTICILOR AROMATICE ALE VINURILOR DIN PODGORIA PANCIU

10. THE EFFECT OF ADDED SULFUR DIOXIDE LEVELS ON THE AROMATIC CHARACTERISTICS OF WINES FROM THE PANCIU VINEYARD

10.1 Context

Vinul este produs prin exploatarea metabolismului mai multor tulpini levuriene. În aceste condiții, microorganismele indigene cresc în mediile de fermentație și influențează levurile și bacteriile care pot, de asemenea, să producă mai mulți metaboliți nedorți, cum ar fi alcoolii superiori, acid acetic sau acetaldehidă (Sharma ș.a., 2020). În practicile de vinificație, adăugarea dioxidului de sulf previne procesele de oxidare și minimizează, de asemenea, creșterea organismelor microbiologice viabile, aspecte cu impact ridicat în vinificația și maturarea vinului.

Dioxidul de sulf are rolul de a inhiba abundența mai multor tulpini indigene, astfel încât unele caracteristici de aromă sunt denaturate și vinul ar putea avea caracteristici diferite (Morgan ș.a., 2019). De exemplu, acidul acetic a avut niveluri mai mari decât acetatul de etil și de izoamil în vinurile cu conținut scăzut de dioxid de sulf decât în vinurile tratate cu SO₂ în concentrații de 60 mg/L. Acest lucru a arătat impactul negativ potențial asupra caracteristicilor vinului datorită prezenței bacteriilor acetice. Pe de altă parte, un exces de dioxid de sulf produce compuși de diacetil care afectează într-o măsură mai mare calitatea vinurilor (Sun ș.a., 2016).

Sulfii au proprietăți anti-microbiene și antioxidante, dar au și un potențial toxic și pot fi, de asemenea, alergeni pentru consumatori. Vinurile cu conținut de dioxid de sulf mai mare de 10 mg/L ar trebui să fie etichetate obligatoriu cu "conține sulfite" sau mesajul trebuie specificat pe eticheta vinului. Din cauza noilor reglementări, a existat o preocupare continuă în ceea ce privește utilizarea unui conținut mai mic al acestui aditiv în vinificație. În acest scop, au fost testate unele modificări ale protocolului de vinificație a vinului pentru a avea aceleași rezultate în tratamentul strugurilor, fermentație, stabilizare, corectare, filtrare și maturare (Nardini ș.a., 2018). În ceea ce privește aroma vinului, există două caracteristici principale care definesc tipicitatea produselor finale. Din această categorie, sunt implicate patru esteri, cum ar fi acetatul de izoamil (ISA), lactatul de etil (ETL), acetatul de etil (ETA) și cinci alcoolii, cum ar fi n-propanolul (1PROH), n-butanolul (1BUTOH), izobutanolul (2M-1PROH), isopentanolul (2M-1BUTOH) și 2-fenetanolul (2PHET). Acești compuși au fost monitorizați în studiul prezent în vinurile cu dioxid de sulf ca aditiv și vinuri fără adăugare de SO₂.

10.2 Material și metode

În ceea ce privește vinurile, au fost luate în considerare o serie de soiuri cu SO₂ și fără SO₂: Fetească regală (FR0), (FR1), Cabernet Sauvignon (CS0), (CS1), Cabernet Sauvignon rose (CSR0), (CSR1), Fetească regală Frizzante (FRF0) (FRF1). Tehnologiile aplicate pentru producerea vinurilor incluse în studiu.

În studiu, au fost utilizate o serie de alcooli, compuși carbonilici și esteri: acetaldehidă (ACTAL), metanol (MEOH), butan-1-ol (1BTOH), butan-2-ol (2BTOH), propan-1-ol (1PROH), 2-metil-propan-1-ol (2M-1PROH), 2-metil-pentan-2-ol (2M-1PTOH), pentan-1-ol (1PTOH), acetat de izoamil (ISA) și lactat de etil (ETL) au fost achiziționate de la Sigma Aldrich - și aveau o concentrație de minimum 99,9%.

Analiza a fost efectuată pe un gaz cromatograf cu detector de ionizare în flacără GC-FID, Agilent 7890B de la Agilent Technologies echipat cu un auto-sampler GC 80. A fost utilizată tehnologia de injectare de tip "head-space" iar pentru separare cromatografică a fost utilizată o coloană de tip GC Phenomenex Zebron FFAP de 50 m lungime, 0.32 mm diametru interior și 0.50 μm grosimea filmului. Pentru injectorul de tip "head-space", temperatura de incubare a fost menținută la 85 °C timp de 15 minute și temperatura seringii a fost de 87 °C, după care un volum de 1.5 mL a fost injectat în injectorul de tip split/splitless care a funcționat în modul split la un raport de split 2:1, cu o temperatură de 250°C.

Sistemul gaz cromatografic a utilizat hidrogen ca gaz purtător la un debit de 1.6 mL/min. Programul de temperatură pentru eluția componentelor a fost setat la 30 °C pentru de 5 minute, apoi au fost aplicate două rampe de temperatură. În primul rând, o creștere de 2.3 °C/min până la 80°C și o rampă secundară de 25°C/min până la 250°C. În cele din urmă, a fost menținut la 250°C de 3 minute. Timpul total de cromatografiere a fost de 45 de minute. Detectorul de tip ionizare în flacără a operat la o temperatură de 250 °C cu o rată de achiziție de 20 Hz.

10.3 Rezultate și discuții privind implicațiile tehnologiilor de vinificație asupra compușilor volatili

10.3.1 Determinarea compușilor volatili

Metoda a asigurat separarea tuturor compușilor, cu o rezoluție minimă de cel puțin 2 pentru fiecare compus. Timpul de cromatografie de 45 de minute a fost necesar datorită complexității probelor și pentru a confirma rezoluția prin adăugare de standard care a arătat un profil cromatografic ridicat, așa cum se arată în fig. 10.1.

Procedurile generale de vinificație au urmat metodele clasice, dar cu unele modificări pentru soiurile fără adaos de sulfiți. Programul de vinificație a început cu tratamentul strugurilor. Pentru vinurile cu sulfiți adăugați, sulfitearea a fost efectuată prin adăugarea de metabisulfid de potasiu, acid ascorbic și tanin galic. În schimb,

pentru loturile care urmau să fie produse fără sulfiți, a fost utilizată *Pichia kluyveri*. Etapa de fermentare a utilizat levuri de tip *S. cerevisiae* cu o doză de 20-30 g/hL și nutrienți specifici. Menținerea vinului pe drojdie s-a făcut pe protecție cu dioxid de carbon până la îmbuteliere. Înainte de transferul la sticlă, vinurile au avut o stabilizare tartrică.

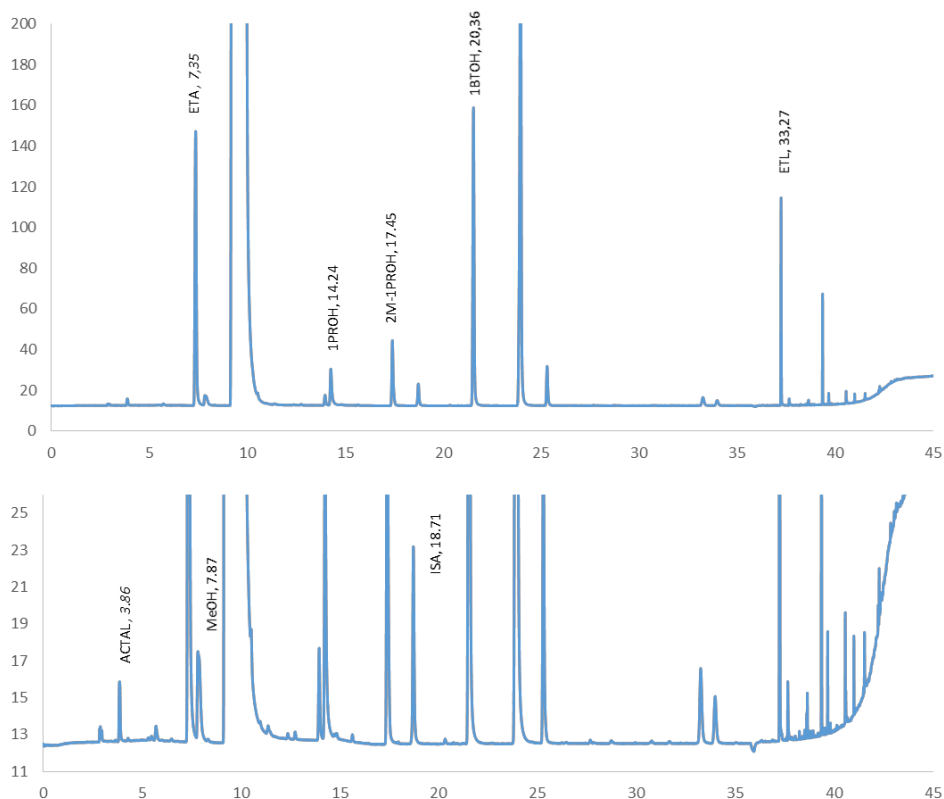


Figura 10.1. Cromatograma pentru FRF118 (S4) (Tr (minute) – Timp de retenție) (ACTAL (acetaldehidă) – (Tr – 3.86); ETA (acetat de etil) – (Tr – 7.35); MEOH (metanol) – (Tr – 7.87); 1PROH (n-propanol) – (Tr – 14.24); 2M-1PROH (isobutanol) – (Tr – 17.45); ISA (acetat de isoamil) – (Tr – 18.71); 1BTOH (n-butanol) – (Tr – 20.36); ETL (lactat de etil) – (Tr – 33.27).
 Figure 10.1. Chromatogram for FRF118 (S4) (Tr (minutes) – Retention time) (ACTAL (acetaldehyde) – (Tr – 3.86); ETA (ethyl acetate) – (Tr – 7.35); MEOH (methanol) – (Tr – 7.87); 1PROH (n-propanol) – (Tr – 17.45); 1BTOH (n-butanol) – (Tr – 20.36); ETL (ethyl lactate) – (Tr – 33.27).

Au fost efectuate mai multe corecții pentru vinurile fără sulfiți folosind acid lactic și tanin galici. În schimb, pentru vinurile cu aditiv de SO₂ s-au efectuat corecțiile dioxidului de sulf până la 40 - 50 mg/L SO₂ liber. Cantitatea totală adăugată în 2 etape de vinificație a ajuns la 80 - 100 mg/L. Pentru toate vinurile fără SO₂ și toate tipurile de vinuri roșii, fermentația malolactică a fost făcută în conjuncție cu fermentația alcoolică, prin monitorizarea conținutului de acid lactic.

SO₂-ul total adăugat la vinurile din studiu prezintă activitate anti microbiană diferită, gradul și viteza acestui echilibru depinzând de pH și temperatură. La pH 3.0 – 4.0, SO₂ liber constă în principal din anionul bisulfid (HSO₃⁻), o mică fracțiune de SO₂ molecular (H₂SO₃), care este considerată forma activă de SO₂ și o cantitate neglijabilă de anion sulfid (SO₃²⁻). Valorile de pH s-au situat între 3.71 ± 0.23 pentru FRF0 și respectiv 3.33 ± 0.059 pentru FR1. Se constată că pe perioada de maturare valorile de pH nu au prezentat variații remarcabile față de momentele când probele au fost vinificate. Pentru probele care au fost vinificate la nivelul anului 2018, diferențele între valorile de la vinificație și respectiv la momentul final al analizei au fost de 0.34 unități pentru FRF0 și respectiv 0.35 pentru FRF1 (pH=3.30 ± 0.25, respectiv pH = 3.65 ± 0.24).

În aceleași condiții variabilele de modificare a pH-ului s-au încadrat în intervalele 3.27 ± 0.12 și respectiv 3.40 ± 0,25 pentru CS0, dar o variație mai mică a fost pentru CS1 (pH = 3.47 ± 0.12 (vinificație)) și respectiv 3.37 ± 0.57. Cum la valori de pH mai ridicate de 3.5 și concentrații scăzute de SO₂ molecular se favorizează formarea de compuși volatili nedorți, prin intermediul bacteriilor acid lactice (Grbin ș.a., 1996), considerând fermentațiile malolactice și corecțiile corespunzătoare de pH, se constată că premisele sunt corespunzătoare pentru a evita aceste efecte suplimentare.

Compușii carbonilici (în principal acetaldehida) se leagă cu SO₂ liber, (în special ionul bisulfid) pentru a forma compuși complecși (SO₂ legat). SO₂ legat prezintă o funcție anti microbiană slabă. Având în vedere faptul că acetaldehida are o afinitate puternică pentru SO₂, produsul bisulfid-acetaldehidă devine majoritar. Legarea ionului bisulfid și a acetaldehidei reduce cantitatea de SO₂ liber disponibil, dar această formă legată poate fi și inhibitorie pentru bacteriile lactice care conduc fermentația malolactică.

10.3.2 Efectul asupra fermentației alcoolice.

După cum s-a indicat, efectul anti-microbian al SO₂ este bine cunoscut, jucând un rol selectiv asupra microflorei în timpul fermentației. Cu toate acestea, natura exactă a acțiunii inhibitorii a SO₂ asupra microorganismelor nu este complet înțeleasă, deși SO₂ reacționează direct cu tiamina, reducând nivelul disponibil al acestei vitamine pentru microorganisme (Ochando ș.a., 2020).

Aceasta este o enzimă din mustul de struguri care concurează direct pentru oxigenul dizolvat disponibil, făcând astfel oxigenul mai ușor disponibil pentru *S. cerevisiae*, și nu pentru inhibarea levurilor indigene (non *Saccharomyces*) și a bacteriilor. În plus, un exces de compuși carbonilici liberi determină inhibarea fermentației (Liu ș.a., 2000).

Acetaldehida se formează în timpul fermentației alcoolice de către levuri. Când este prezentă în exces, acetaldehida conferă o aromă neplăcută de verde,

ierboasă, asemănătoare cu merele, care este de obicei mascată de adăugarea de SO₂. Limita de aromă a acetaldehidei în vin a fost stabilită la aproximativ 10 mg/mL. Diferențele în formarea de acetaldehidă depind de specia sau tulpina de levuri utilizată, dar factori precum temperatura, oxigenul și concentrațiile de SO₂ afectează și formarea acesteia pe lângă levurile fermentative. Zaharul este substratul principal, care contribuie la formarea acestui compus, dar metabolismul unor aminoacizi precum alanina favorizează procesul, . În plus, se formează și din oxidarea etanolului. Acetaldehida este excretată în principal în timpul perioadei de fermentație și poate fi recatabolizată, deși levurile nu sunt capabile să metabolizeze acetaldehida legată de SO₂ (Van Dijken ș.a., 1986).

În condițiile de lucru, concentrația de SO₂ utilizată în prealabil sub formă de metabisulfid nu a cauzat vreo întârziere a debutului fermentației alcoolice. De fapt, se poate observa un efect ușor stimulant în primele 10 zile. Fermentația alcoolică în ambele cazuri a fost completă în medie în 45 zile, perioadă mai îndelungată datorită fermentațiilor malolactice concomitente. SO₂ format produce inhibarea polifenoloxidazei, enzimă prezentă în mustul de struguri și care concurează direct pentru oxigenul dizolvat disponibil, făcând astfel ca oxigenul să fie mai ușor disponibil pentru *S. cerevisiae*, dar și pentru inhibarea levurilor indigene (non *Saccharomyces*) și a bacteriilor (Li și Mira de Orduña, 2011). În plus, un exces de compuși carbonilici liberi determină inhibarea fermentației levuriene, care este neutralizată și de creșterea SO₂.

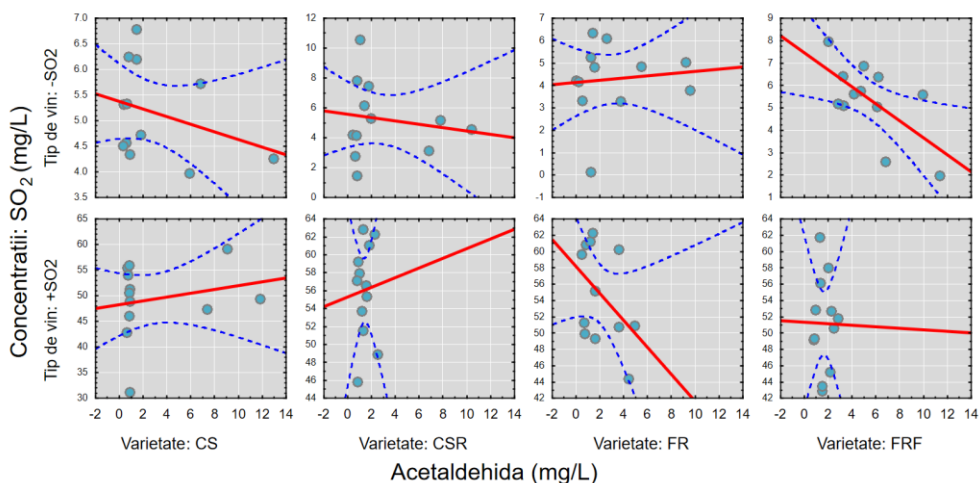


Figura 10.2. Corelația dintre nivelele de acetaldehidă și respectiv nivelele dozelor de SO₂ liber aplicate.

Figure 10.2. Correlation between the levels of acetaldehyde and respectively the levels of doses of freely applied SO₂.

Conform fig. 10.2, s-a confirmat corelația stabilității acetaldehidei în timp, valorile maxime au fost înregistrate pentru probele vinificate la nivelul anului 2021. Se constată că valorile de 0.79 ± 0.21 mg/L (CSR021), 8.08 ± 2.28 (FR021) și $6.56 \pm$

1.62 mg/L (FRF021) pentru probele care nu au prezentat SO₂ cu rol de legare au confirmat concluzia anterioară. Concentrațiile au fost semnificativ diferite între tipurile de tratament, acestea situându-se la concentrații de 1.65 ± 0.75 mg/L (CSR121), respectiv 0.86 ± 0.25 mg/L (FR121) și 1.04 ± 0.24 mg/L (FRF121). Pe baza rezultatelor obținute, s-a putut confirma că adăugarea de SO₂ induce legarea ACTAL, așa cum a fost raportat anterior în vinificație (Aguera ș.a., 2018). Din figura anterioară se remarcă faptul că dependența dintre ACTAL și concentrațiile de SO₂ s-a produs doar în cazul FRF0 și cu o corelație mai scăzută pentru FR1. Corelația în cazul FRF0 corespunde unei coeficient de corelație de -0.64 care transpune faptul că nivelele de ACTAL au scăzut în condițiile în care nivelele SO₂ liber s-au menținut constante.

Pe fondul descreșterii acetaldehidei pentru cele 2 tipuri de probe, corelația poate fi explicată prin faptul că o posibilă reacție este aceea de oxidare a ACTAL la acid acetic, reacție care este însoțită de saponificare la esterul respectiv, de tip acetat de etil. Între concentrațiile de acetat de etil și acetaldehidă prezente în cadrul probelor analizate nu s-a putut realiza o corelație directă la monitorizarea concentrației de ACTAL și ETA (acetat de etil) decât pentru FRF0. Acest lucru poate fi determinat, deoarece probele de studiu ar putea conține și acetaldehidă polimerizată. În schimb, așa cum s-a menționat pentru FRF0, coeficienții de corelație de -0.68 în raport cu ETA indică faptul că descreșterea ACTAL este invers proporțională cu creșterea ETA.

Anterior s-a sugerat că această prezență a acetaldehidei indusă de SO₂ poate fi legată și de rezistența la SO₂ a levurilor (Bosso și Guaita, 2008). Este demn de remarcat faptul că utilizarea SO₂ în condiții industriale de fabricație a vinului, aplicată conform recomandărilor din practica viti-vinicolă, a produs concentrații semnificativ mai mici de acetaldehidă la probele care au avut sulfiți adăugați (CS1, CSR1, FR1, FRF1). Deși tehnologiile de fabricație tind să utilizeze SO₂ pentru a masca nivelurile excesive ale acetaldehidei, care afectează negativ proprietățile organoleptice ale vinului, în cazul probelor incluse în studiu, nivelurile produse ale acestui compus nu au atins nivelul de percepție de 10 mg/L.

Cantitatea maximă măsurată a corespuns la 8.53 ± 3.82 mg/L în prezența SO₂ CS1, în timp ce valoarea de 9.41 ± 2.23 mg/L fost atinsă ca maxim în absența acestui compus. Mai mult, pe perioada de menținere a vinului, există posibilitatea ca acetaldehida să fie reabsorbită, dar s-au menținut niveluri aproape constante pentru probele 2021, 2020, 2019, când concentrația a fost de aproximativ 0.686 ± 0.10 mg/L (CS0). Cu SO₂, au fost măsurate niveluri relativ mai mari pe tot parcursul perioadei de menținere a vinului de 0.746 ± 0.103 mg/L (CS1). Aceste variații pot fi legate de modificările care au loc în timpul fermentației malolactice (Gomez Garc ' 1a-Carpintero ș.a., 2014).

10.3.3 Efectul asupra fermentației malolactice.

După cum s-a menționat, pentru probele care nu au avut sulfiți adăugați (CSR0, FR0 și FRF0) precum și toate probele CS (CS0 și CS1) au prezentat fermentații malolactice complete.

Trebuie remarcat faptul că *S. cerevisiae* poate metaboliza și acidul malic (Julien ș.a., 2000). Concentrația de acetaldehidă este critică pentru fermentația malolactică, deoarece s-a demonstrat că nivelurile ridicate (>100 mg/L) pot inhiba creșterea bacteriilor lactice hetero-fermentative, în timp ce nivelurile scăzute (<100 mg/L) stimulează creșterea acestor bacterii. Astfel, nivelurile de acetaldehidă atinse în ambele tipuri de probe ar fi putut influența în mod favorabil dezvoltarea fermentațiilor alcoolice și malolactice simultane. În acest sens datele au fost confirmate de rezultatele obținute pentru probele care au prezentat fermentație malolactică. Așa cum s-a expus în capitolul 5 pentru a evita eventuale referențieri, probele la care nu s-au efectuat adaosuri de sulfiți CSR0, FR0 și FRF0, precum și ambele tipuri de probe cu și fără sulfiți adăugați (CS0 și respectiv CS1) au prezentat fermentație malolactică.

Pe de altă parte, este incert dacă bacteriile lactice (LAB) din vin pot produce acetaldehidă. Cu toate acestea, sinteza acetaldehidei de către LAB-urile din alte tipuri de produse este bine documentată. Cantitatea de acetaldehidă produsă de LAB-urile din produsele alimentare variază în funcție de specie și tulpină, situându-se în general sub 30 mg/L. Sinteza acetaldehidei are loc prin metabolismul glucozei, 2-dezoxi-D-riboz-5-fosfatului și treoninei. Acești precursori sunt de asemenea prezenți în vin, sugerând că LAB-urile din vin ar putea fi capabile să genereze acetaldehidă din aceste substraturi. În plus, alte microorganisme precum LAB-urile și levurile non-*Saccharomyces* pot coexista provocând posibile devieri senzoriale și deteriorarea vinurilor. (Lasanta și colab., 2010).

În cazul acestui tip de tratament se produc condiții care au un impact asupra ACTAL deoarece conferă instabilitate în prezența bacteriilor lactice, ceea ce poate determina degradarea sau dispariția unor cantități din acetaldehida formată.

Din fig. 10.3 se deduce faptul că pentru probele CS0 și respectiv CS1 variația ACTAL a reprezentat o evoluție continuă în ceea ce privește variația acesteia în urma proceselor de fermentație malolactică. Maturarea în sticlă a probelor CS a realizat un mediu fără oxigenări suplimentare, dar creșterea poate fi asociată cu relativa oxidare a alcoolului etilic format, iar acest proces a determinat variația de la 0.55 ± 0.26 mg/L CS021 la 8.53 ± 3.82 mg/L CS018. O situație similară s-a constatat pentru CS121 pentru care valorile au fost de 0.86 ± 0.22 mg/L și respectiv 9.41 ± 2.23 mg/L pentru CS118. Utilizarea de levuri selective a menținut formarea de ACTAL la niveluri sub 10 mg/L în vinuri (Vashakidze și Bezhushvili, 2020). Formarea ACTAL este stimulată de dioxidul de sulf din must. Acest lucru a fost în contrast cu celelalte soiuri

care au avut valori mai mari fără SO₂, fapt explicat prin posibilitatea de a se lega de acidul sulfuros produs de sulfitaarea vinurilor (Zara și Nardi, 2021).

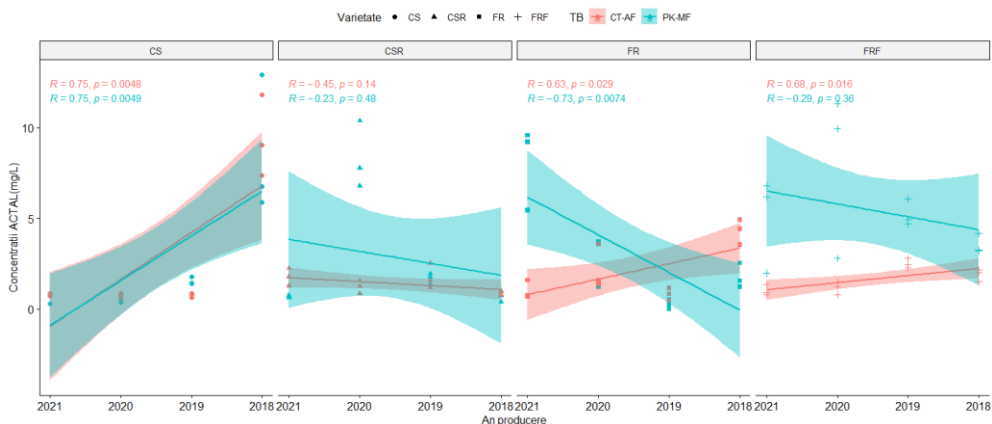


Figura 10.3. Distribuția concentrațiilor de acetaldehidă (ACTAL) în funcție de perioada de maturare a vinurilor.

Figure 10.3. Distribution of acetaldehyde concentrations (ACTAL) according to the maturation period of the wines.

Auto-oxidarea alcoolului etilic care poate produce ACTAL poate fi catalizată și de oxidarea acidului ascorbic la acid dehidroascorbic la vinurile care au fost tratate cu acid ascorbic (excepție CS) (Oliveira ș.a., 2011) Conținutul de acid ascorbic folosit ca antioxidant a fost în raport 1:2 în raport cu dozele de SO₂. În acest context, conform figurii anterioare, s-a constatat că valorile corespunzătoare au prezentat corelații similare pentru vinurile de tip CSR1, FR1 și FRF1. Corelațiile similare sunt determinate de factorii de corelație care au prezentat valori pozitive mai ales pentru FR1 ($r=0.63$ ($p=0.029$)) și respectiv FRF1 ($r=0.68$ ($p=0.016$)). În schimb o particularitate aparte a prezentat CSR care a avut o corelație negativă CSR1 ($r=-0.45$) dar fără relevanță statistică.

De fapt pentru CSR, nici varianta CSR0 nu a determinat vreo instabilitate suplimentară vis-a-vis de conținuturile de acetaldehidă, valorile prezentând o evoluție, dar valoarea coeficientului de probabilitate a fost $p=0.140$ ($r=-0.45$). Spre deosebire de probele care nu au beneficiat de fermentație malolactică, dar nu au avut adaos de acid ascorbic care să catalizeze formarea de acetaldehidă prin auto-oxidarea alcoolului etilic, s-a remarcat variația invers proporțională ce corespunde unor scăderi ale concentrațiilor pentru ACTAL în cazul CSR0 ($r=-0.23$ ($p>0.05$)), FR0 ($r=-0.73$ ($p=0.0074$)) și respectiv FRF0 ($r=-0.29$ ($p=0.36$)).

10.4 Influența taninurilor oenologice asupra compușilor volatili

Compușii analizați în acest studiu sunt produși în principal în timpul metabolismului levurilor, având o influență importantă asupra caracteristicilor organoleptice ale vinurilor incluse. Printre compușii volatili testați (tabelele 10.1 și 10.2), au fost găsite puține diferențe între vinul fermentat cu și fără SO₂. Conținuturile

de metanol, acetat de etil și 2-metil-1-propanol nu au fost influențate semnificativ de utilizarea SO₂.

Dimpotrivă, 1-propanolul și alcoolii 2- și 3-metilbutilic au fost afectați de tratamentul cu SO₂. 1-Propanolul poate fi format din scheletul de carbon corespunzător amino acidului treonina prin transaminare, în timp ce 2- și 3-metilbutanolul sunt derivați din izoleucină și respectiv leucină. În vinificație, s-au raportat și cantități mai mari de 1-propanol în vinurile fermentate cu SO₂, deși în alte cazuri s-au raportat nivele mai abundente de 2- și 3-metilbutanol (Clemente-Jimenez ș.a., 2004).

Aromele vinului sunt alcătuite din mai multe sute de compuși volatili, dezvoltate în principal din patru mecanisme: metabolismul strugurilor, reacții biochimice care au loc înainte de fermentație, metabolismul microorganismelor responsabile pentru fermentația alcoolică și malolactică, și reacții chimice sau enzimatică post-fermentație (Chen ș.a., 2016, Romano ș.a., 2003). Compușii volatili rezultați din fermentație sunt prezenți în tabelul 10.1 și respectiv tabelul 10.2.

Ca și alternativă pentru utilizarea SO₂ pentru a menține caracterul antioxidant, au fost folosite tratamentele cu taninuri enologice. Așa cum s-a remarcat și anterior, utilizarea acestor tipuri de substanțe a redus semnificativ concentrația de acetaldehidă, care este considerată un rol în stabilitatea culorii, deoarece acționează ca un precursor al vitaminei B. (Horvat ș.a., 2019).

În contextul monitorizării compușilor volatili, este de remarcat influența pe care o prezintă temperatura din timpul fermentației alcoolice asupra formării esterilor. Astfel, la temperaturi de 10–20°C sunt produși și menținuți în condiții corespunzătoare esterii care imprimă vinului o nuanță de fructuozitate (acetat de etil, acetat de izoamil).

Concentrațiile regăsite pentru probele analizate sunt distribuite în 2 tabele care au fost distribuite conform asocierii după tipul de struguri. În tabelul 10.1 sunt prezentate valorile pentru compușii volatili la probele de tip Cabernet Sauvignon roșu, varianta +SO₂ (CS1) și varianta –SO₂ (CS0) și respectiv Cabernet Sauvignon roze, variantele +SO₂ (CSR1) și respectiv –SO₂ (CSR0). În tabelul 10.2 s-au prezentat variantele de vin din struguri Fetească regală, forma de vin FR liniștit (FR1(+SO₂)/FR0(-SO₂)) și respectiv Fetească regală Frizzante (FRF1(+SO₂)/FRF0(-SO₂)).

Cantitatea de acetat de etil (ETA) (aroma de ananas, 0.87 mg/L ca limită de percepție) a crescut în toate cazurile datorită adăugării de taninuri oenologice la niveluri acceptabile, adăos care a permis limitarea concentrațiilor ETA sub limita de toleranță (150 mg/L), altfel cantitatea excesivă ar fi dat un miros neplăcut de lipici proprietăților olfactive. În acest context nivelurile de ETA s-au situat la niveluri mai ridicate pentru CS cu valori de 114.14 ± 22.60 mg/L (CS0) și 97.58 ± 15.65 mg/L (CS1). Valori mai scăzute au fost obținute pentru CSR astfel că nivelurile s-au situat

la nivele de 68.47 ± 11.43 mg/L CSR0 și ușor superioare pentru CS1 74.74 ± 14.60 mg/L. Valori mai mici s-au produs, dar au fost comparabile pentru FR0 și respectiv FR1 (37.93 ± 10.10 mg/L) și respectiv 35.79 ± 10.11 mg/L. Se constată totodată faptul că nivelele au fost crescătoare pornind de la probele cele mai proaspete până la nivelul probelor din 2018.

În timpul fermentației alcoolice se formează și acetat de izoamil, care este unul dintre principalii responsabili de aroma vinurilor tinere. Pe parcursul maturării și învechirii, această aromă diminuează în paralel cu scăderea conținutului în acetat de izoamil, pentru ca în final să dispară.

M/SD	ACTAL	ETA	MeOH	2BTOH	1PROH	2M-1PROH	ISA	1BTOH	1PTOH	ETL
CS018	8.53	117.43	144.89	1.16	8.05	28.47	2.36	1.52	0.32	196.55
	3.82	31.67	24.13	0.10	5.23	24.25	1.24	0.26	0.13	10.80
CS019	1.55	104.72	176.32		11.63	20.98	1.00	1.82	0.31	198.76
	0.22	29.22	54.26		0.69	4.19	0.01	0.83	0.04	9.28
CS020	0.52	149.45	140.19		15.00	23.68	0.35	1.41		224.73
	0.12	29.64	66.28		0.41	3.41	0.64	0.11		38.00
CS021	0.65	96.76	226.77		19.32	21.23	1.10	1.68		206.97
	0.30	12.36	31.73		2.64	1.93	0.09	0.11		25.45
CS118	9.41	88.69	121.63		10.75	34.52	2.70	1.29		144.44
	2.23	23.37	44.61		1.92	8.85	1.36	0.10		32.38
CS119	0.79	112.25	160.26		10.80	26.54	1.13	1.79	0.17	239.39
	0.11	3.11	3.07		1.53	10.67	0.67	0.30	0.12	20.76
CS120	0.77	100.85	183.44		20.75	31.34	1.72	2.23		214.60
	0.13	6.85	13.12		0.77	7.35	0.11	0.46		15.53
CS121	0.80	91.93	210.53		13.44	27.67	1.48	1.10		242.86
	0.07	2.23	13.26		0.62	9.12	0.32	0.61		3.21
CSR018	0.72	75.84	20.84		60.95	7.19	1.87	1.75		312.25
	0.30	2.00	3.27		13.43	0.98	0.78	0.32		7.00
CSR019	1.69	37.64	22.46	1.67	18.94	7.99	2.77	1.01		182.01
	0.30	12.05	1.54	0.11	2.37	1.17	1.32	0.12		17.22
CSR020	8.32	118.35	26.29		12.64	9.97	0.94	1.11		408.77
	1.86	13.34	4.76		1.59	1.09	0.01	0.15		115.80
CSR021	0.70	42.50	18.95		21.76	9.41	1.40	1.25		344.73
	0.06	4.07	8.48		10.95	2.72	0.44	0.22		16.49
CSR118	0.86	94.05	24.72	4.35	69.08	6.31	1.35	1.03		265.00
	0.10	8.62	4.76	1.05	0.89	2.18	0.07	0.33		29.48
CSR119	1.77	106.24	30.68		13.67	10.57	0.98	1.22		259.19
	0.69	20.85	3.45		1.33	0.96	0.02	0.15		45.14
CSR120	1.23	48.34	20.91		30.84	7.68	0.88	1.22		324.67
	0.35	6.07	0.18		11.44	1.83	0.24	1.29		11.95
CSR121	1.76	16.95	18.33		41.74	9.04	1.17	1.32		328.37
	0.49	9.56	6.69		21.40	2.78	0.90	0.58		23.79

Tabel 10.1. Nivele compuși volatili Cabernet Sauvignon, varianta +SO₂ (CS1) și varianta –SO₂ (CS0) și Cabernet Sauvignon roze, variantele +SO₂ (CSR1) și respectiv –SO₂ (CSR0).

Table 10.1. Volatile compound levels Cabernet Sauvignon, variant +SO₂ (CS1) and variant –SO₂ (CS0) and Cabernet Sauvignon rosé, variants +SO₂ (CSR1) and –SO₂ (CSR0) respectively.

În contextul probelor aflate în lucru și contrar observațiilor, o descreștere ISA s-a constat doar în cazul FRF0 care a prezentat o evoluție negativă în sensul scăderii concentrațiilor monitorizate, coeficientul de corelație fiind de 0.54. Valoarea pozitivă este calculată pe baza probelor FRF021 care au fost considerate mai proaspete, iar pentru corelație s-a utilizat probele FRF020, FRF019 și respectiv FRF018.

Acetatul de izoamil (ISA), care poate contribui la o aromă fructată descrisă ca banană, a fost semnificativ crescut în tratamentele cu taninuri, unde concentrațiile au fost mai mici de 10 mg/L, dar totuși au depășit limita de percepție de 0.26 mg/L (Chen ș.a., 2016). Cele mai scăzute valori au fost obținute într-adevăr pentru ISA, nivelul concentrațiilor fiind între 1.48 ± 0.73 mg/L pentru CS0, 1.72 ± 0.58 mg/L CS1 și nivele de 4.80 ± 2.04 mg/L FRF0, respectiv 3.67 ± 2.41 mg/L pentru FRF1. Aceste niveluri se explică prin stabilizarea echilibrelor de esterificare care au dat reacții de hidroliză sau reacții chimice cu acizi organici (Makhotkina și Kilmartin, 2012). Prezența ISA nu a fost influențată de SO₂, singura diferență fiind dată de FRF pentru care diferența a fost semnificativă în evaluare la comparația bazată pe testul Tuckey HSD, $p < 0.05$. Pe de altă parte se observă că la evaluarea între tratamente, concentrațiile ISA au fost ușor superioare în cazul probelor la care s-a administrat SO₂ în raport cu probele fără sulfiți adăugați ceea ce a dat un caracter de prospețime ușor mai ridicat al vinurilor. Pe de altă parte, așa cum s-a menționat anterior, o probă unde s-a confirmat evoluția în sensul scăderii nivelelor de izoamil acetat a fost FRF0, în rest concentrațiile au prezentat evoluții diferite în sensul creșterii concentrațiilor pe perioada monitorizării.

Esterii acidului acetic, de exemplu, hidrolizează mai repede la pH 3.0 decât la pH 3.7. Din această cauză aroma fructuoasă de fermentație, datorată esterilor acidului acetic (acetat de izoamil, acetat de hexil, acetat de feniletil etc.) dispăre din vinul tânăr cu atât mai repede cu cât temperatura de păstrare în vederea maturării este mai ridicată. (Parker ș.a., 2018). În aceste condiții pentru studiul analizat, ca esteri ai acidului acetic s-au monitorizat ETA și respectiv ISA. Atât timp cât concluzia variației de pH determină modificări care au impact asupra calităților senzoriale, s-a constatat faptul că stabilitatea pH nu a determinat modificări importante ale conținuturilor celor 2 esteri incluși. În aceste condiții, după cum se observă în fig. 10.4 evoluțiile vinurilor au fost similare din punct de vedere a tipului de vin. S-a considerat că aroma caracteristică fructuoasă de fermentație are perspectiva de a se menține în cazul probelor analizate, atât timp cât evoluția ISA și respectiv ETA s-a menținut în limite cuprinse între 0.83 ± 0.2 mg/L și respectiv 7.04 ± 5.58 mg/L în cazul probelor fără SO₂ adăugat. În contextul evoluțiilor se constată că doar ISA a prezentat coeficient de corelație negativ în raport cu pH ceea ce a indicat o descreștere a valorilor în raport cu acest parametru.

Acidul lactic este însoțit în vin de esterii săi izoamilic, izobutilic și, în mod deosebit, etilic, cel care îi imprimă un miros fin și plăcut, întregindu-i subtil aroma.

M/SD	ACTAL	ETA	MeOH	2BTOH	1PROH	2M-1PROH	ISA	1BTOH	1PTOH	ETL
FR018	1.78	36.99	24.13		34.35	6.84	2.41	0.99		216.02
	0.68	5.00	4.05		24.66	5.83	1.38	0.28		0.99
FR019	0.25	38.11	47.83	3.31	17.71	8.21	4.12	0.65	3.75	111.89
	0.26	14.49	9.35	2.60	6.09	6.97	2.18	0.22	2.17	10.05
FR020	2.11	38.40	24.59		47.27	10.11	2.39	0.88		234.51
	1.39	12.79	7.38		7.54	2.61	1.37	0.20		26.27
FR021	8.08	38.22	39.32		22.73	10.15	0.83	0.56		259.34
	2.28	8.13	8.41		3.60	1.38	0.02	0.06		44.96
FR118	4.30	37.97	39.92		33.24	8.20	0.93	0.82		130.67
	0.69	5.94	6.52		4.62	1.01	0.03	0.08		4.06
FR119	0.82	32.98	48.44	4.54	16.37	9.55	2.15	0.83		91.54
	0.34	7.99	12.31	1.76	8.36	5.37	1.47	0.25		5.75
FR120	2.19	50.14	26.00		57.18	11.02	2.83	1.44		241.50
	1.21	18.96	14.23		10.82	0.62	0.42	0.43		3.02
FR121	1.00	46.61	21.99		52.51	12.41	2.22	0.68		239.48
	0.52	10.75	5.74		4.71	0.98	0.59	0.15		18.74
FRF018	3.55	50.92	35.00		10.59	7.82	2.89	0.57		130.49
	0.53	7.78	2.32		0.33	0.26	0.05	0.01		17.12
FRF019	5.24	49.66	36.84		11.13	8.09	3.04	0.56		140.62
	0.74	4.92	1.27		1.08	0.72	0.22	0.05		1.36
FRF020	8.02	43.82	29.04		20.11	8.59	7.04	2.84		257.19
	4.58	28.75	4.96		32.69	1.60	5.58	1.77		63.01
FRF021	4.99	39.37	29.12		11.45	7.96	7.23	1.85		275.34
	2.63	9.37	5.00		8.50	2.29	4.03	0.56		21.62
FRF118	1.88	59.03	31.53		63.34	9.82	0.85	1.10	0.16	181.16
	0.34	9.60	6.56		7.95	0.92	0.01	0.14	0.01	36.28
FRF119	2.51	50.50	31.71		20.81	36.49	9.41	2.45	1.07	292.11
	0.27	23.00	3.62		32.09	24.23	7.49	1.43	0.05	46.70
FRF120	1.18	36.45	27.92	2.24	47.63	10.81	2.46	0.93		267.22
	0.35	9.31	3.29	0.53	5.47	2.20	1.37	0.16		29.36
FRF121	1.02	33.44	26.56	3.50	60.35	7.62	1.86	0.69		286.15
	0.29	16.76	1.33	1.22	13.61	1.03	0.72	0.14		24.19

Tabel 10.2. Nivele compuși volatili Fetească regală, FR liniștit (FR1(+SO2)/FR0(-SO2)) și Fetească regală Frizzante (FRF1 (+SO2)/FRF0(-SO2)).

Table 10.2. Volatile compound levels Royal Feteasca, quiet FR (FR1(+SO2)/FR0(-SO2)) and Fetească regală Frizzante (FRF1 (+SO2)/FRF0(-SO2)).

Există părerea că, pe măsura creșterii conținutului de lactat de etil, în timpul maturării și învechirii vinului, calitatea acestuia se îmbunătățește (Maylona ș.a., 2016). Corecțiile de aciditate și respectiv valorile de pH ale vinurilor incluse în studiu au determinat valori constante ale parametrului pe perioada de monitorizare, valorile constante fiind proporționale cu variațiile de pH, lipsa de variabilitate fiind confirmată de coeficienții de corelație de 0.140 pentru probele la care nu s-a adăugat SO₂ (CS0, CSR0, FR0 și FRF0) și respectiv 0.077 (CS1, CSR1, FR1 și FRF1) pentru probele la care s-a administrat SO₂ ceea ce indică valori constante din punct de vedere a variației de pH și respectiv valori ale ETL.

Lactat de etil (ETL) a avut valori diferite de concentrație în raport cu soiurile incluse în studiu. Valorile mai mari în raport cu ceilalți esteri se explică prin faptul că vinurile fără SO₂ și vinurile roșii au suferit fermentație malolactică (Arapitsas ș.a., 2018). În ceea ce privește vinurile fără SO₂, valorile ETL sunt mai mari decât valorile pentru vinurile cu SO₂ FRF0 (199.14 ± 40.10 mg/L) și respectiv FRF1 (259.69 ±

55.20 mg/L) și respectiv Fetească regală FR0 (205.44 ± 35.62 mg/L), de asemenea FR1 (175.75 ± 14.22 mg/L) (fig. 10.4).

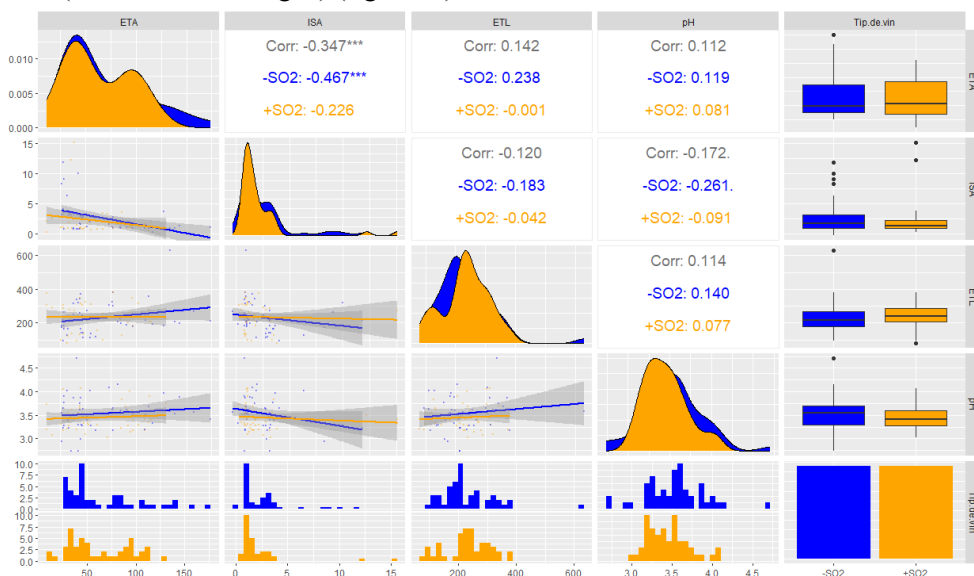


Figura 10.4. Variațiile corelate pentru acetat de etil (ETA), lactat de etil (ETL) și acetat de izoamil (ISA) în funcție de variația de pH.

Figure 10.4. Correlated variations for ethyl acetate (ETA), ethyl lactate (ETL) and isoamyl acetate (ISA) as a function of pH variation.

Cabernet Sauvignon rose a avut un comportament diferit, cu valori mai mari decât vinurile albe și CS, astfel s-au produs concentrații de 317.15 ± 76.15 mg/L (CSR0) și 324.46 ± 43.67 mg/L. Rezultatele mai ridicate obținute în cadrul probelor CSR pot fi explicate de utilizarea în faza fermentativă a unui amestec format de taninuri condensate provenite din specii exotice, taninuri extrase din semințe de struguri și taninuri extrase de castan. În combinație cu beta-glicozidaza, s-au creat condițiile pentru care s-a produs eliberarea de substanțe odorante din precursorii monoglicozilați incluși prin utilizarea amestecurilor taninice menționate (Harald și Kiro, 2018).

Literatura a raportat valori între 5.0 – 8.0 mg/L pentru ETL în cazul vinurilor fără fermentație malolactică (Lasik-Kurdyś ș.a., 2018), dar nivelurile găsite în acest experiment se pot explica prin corectarea acidității cu mai multe doze de acid lactic, astfel încât valorile ridicate de ETL pot fi asociate cu conținutul de acid lactic introdus în ultima etapă a vinificației.

Mai mult, aplicarea taninurilor oenologice poate fi considerată favorabilă pentru alcoolii superiori, unii având ca și sursă de proveniență aminoacizii corespunzători. Cu toate acestea, tratamentul cu taninuri a afectat dezvoltarea metanolului care a crescut peste limitele tolerante la 130 mg/L, respectiv 5 mg/L, și ar putea avea un impact ușor negativ asupra proprietăților olfactive (Benito ș.a., 2015).

Macerarea părților solide ale strugurilor și ale pielii în must, care au mai multe substanțe pectolitice decât sucul, duce la vinuri cu un conținut ridicat de metanol (Martínez-Pérez ș.a., 2020). În vinurile roșii, metanolul are valori mai mari pentru CS0 (172.04 ± 39.86 mg/L) și respectiv CS1 (168.96 ± 37.66 mg/L). Nivelurile sunt comparabile atât timp cât procesele de macerație și fermentație și fermentație alcoolică/malolactică sunt similare pentru ambele forme de vin. În același timp macerația a fost realizată și în prezență de taninuri cu rol antioxidant și respectiv taninuri cu rol în intensificarea culorii, dozele fiind de 30 g/hL. Nu a existat o corelație semnificativă între dozele utilizate și nivelul de metanol în probe. Singura diferență semnificativă a fost între soiuri, acest lucru fiind determinat de concentrația mai ridicată de metanol corespunzătoare vinurilor roșii. În aceste condiții, valorile pentru metanol în cazul vinurilor roze și respectiv albe, s-au situat la nivele net inferioare față de CS. Diferențele nu au fost semnificative la comparația între tratamente, astfel probele CSR au prezentat valori comparabile între 21.51 ± 4.65 mg/L și 22.73 ± 5.78 mg/L. Comparabil au fost valorile între FRF și FR ale căror valori medii au fost de 32.84 ± 6.96 mg/L. Valorile mai ridicate ale soiurilor albe, comparativ cu probele vinificate roze, atât timp cât conținutul de metanol nu este neapărat dependent de macerație ci mai mult de conținutul de substanțe pectice, este determinat de faptul că soiurile albe prezintă un conținut cuprins între 5.5 – 7.2%, iar soiurile roșii conțin aproximativ 4.4 – 5.9% (Sims ș.a., 1988).

Formarea mai multor alcooli este rezultatul unor produși intermediari rezultați din degradarea carbohidraților în timpul fermentației sau procese de dezaminare și hidroliză a aminoacizilor. În această situație, 2M-1PROH este rezultatul bio transformării valinei. Într-un alt studiu, s-a arătat că VAL avea valori mai mici decât dozele tipice de 50 mg/L pentru vinurile albe, 50 mg/L pentru vinurile roșii și 100 mg/L pentru vinurile frizzante (Zhang ș.a., 2015). Cu toate acestea, la corelația dintre nivelurile de valină și nivelul de 2M-1PROH, coeficientul a fost de doar $r=-0.28$, ceea ce arată că transformarea valinei în 2M-1PROH nu a prezentat o corelație foarte înaltă. În schimb, la evaluarea pe baza influenței tipurilor de antioxidanți s-au determinat efecte diferite care constau în influențe specifice fiecărui tip de tip de antioxidant și respectiv de soi. La evaluarea diferențiată considerând prezența SO₂ ca aditiv, s-a constatat formarea de nivelele ușor mai ridicate ale 2M-1PROH, pentru FRF, valoarea medie fiind dublă 16.67 ± 7.50 mg/L (FRF1) față de 8.10 ± 0.99 (FRF0). Influența acidului ascorbic și a taninurilor cu rol antioxidant și de îmbunătățire a structurii au prezentat influență diferită, nu în toate cazurile s-au putut raporta dependențe între l-valina și formarea de 2M-1PROH. Conținuturile de 2M-1PROH și l-VAL nu au prezentat corelație, doar în cazul amestecului de TVS-TVC-TG (Tanin VR Supra, Tanin galic) (Blateyron ș.a., 2001). Doar probele CS0 și respectiv FR1 au determinat în ambele cazuri corelații care au prezentat o dependență

invers proporțională cu l-valina. Astfel coeficientul de corelație este $r=-0.53$ ($p=0.077$), ceea ce indică posibilă sursă l-valina (Hernandez ș.a., 2002).

Nivelele mai ridicate de 1BTOH pentru vinurile roșii de tip Cabernet Sauvignon, soi care este predispus la nivele de alcooli superiori mai ridicate (Chira ș.a., 2011). Nivele care s-au situat la concentrații de 1.44 ± 0.48 mg/L (CS0) precum și nivele de 1.49 ± 0.41 mg/L (CS1). Regula de producere a nivelelor mai ridicate ca urmare și a specificității metodei de macerație-fermentație concomitente, precum și a caracteristicilor specifice de soi, a făcut ca nivele de 1BTOH să fie mai ridicate decât în cazul vinurilor albe și roze. În aceste condiții 1-butanolul (1BTOH) a avut niveluri mai scăzute decât ceilalți alcooli, cu concentrații medii între 1.49 ± 0.62 mg/L pentru FRF0 și 1.31 ± 0.48 mg/L pentru FRF1. Nu au fost diferențe semnificative între soiuri în ceea ce privește conținutul de dioxid de sulf, singura excepție fiind diferența dintre tipurile de vin liniștit 0.78 ± 0.20 mg/L (FR1) și respectiv 1.49 ± 0.62 mg/L (FRF1) pentru varianta frizzante ($p=0.0017$).

1BTOH cât și 1PROH prezintă nivele ridicate în cazul în care vinurile sunt alterate. Concentrațiile atinse ca urmare a alterării vinurilor pot fi determinate de diversele tipuri de procese degradante precum oxidare, încărcătură microbiană sau temperaturi ridicate și condiții necorespunzătoare de temperatură. Nivelele de 1BTOH corespunzătoare pentru vinurile degradate s-au raportat ca fiind cuprinse între 10 și 100 mg/L (Padilla ș.a., 2016).

Pe de altă parte, concentrațiile de 1PROH prezintă ca și sursă de produce biosinteza levuriană având ca sursă metabolizarea l-treoninei prin intermediul acidului ceto-butiric. Având în vedere variația monitorizată într-un interval de timp similar cu l-treonina, s-a constatat că nu în cazul tuturor soiurilor s-a putut efectua o corelație directă între nivelele de TRE și respectiv 1PROH. (Yin ș.a., 2021) Două situații particularizate s-au putut identifica, astfel soiurile CS și respectiv FRF au prezentat corelație directă, în schimb soiurile CSR și respectiv FR au prezentat corelație inversă. Doar în cazul FR coeficientul de corelație $r=-0.40$ a fost reprezentativ pentru tendința descrisă de modelul de variație invers proporțional stabilit între TRE și 1PROH. Pentru CS și FRF evoluțiile au fost pozitive, astfel creșterea 1PROH a avut aceeași tendință cu TRE, în condițiile în care coeficienții de corelație au fost de 0.51 ($p=0.009$) și respectiv 0.42 ($p=0.037$) (fig. 10.5).

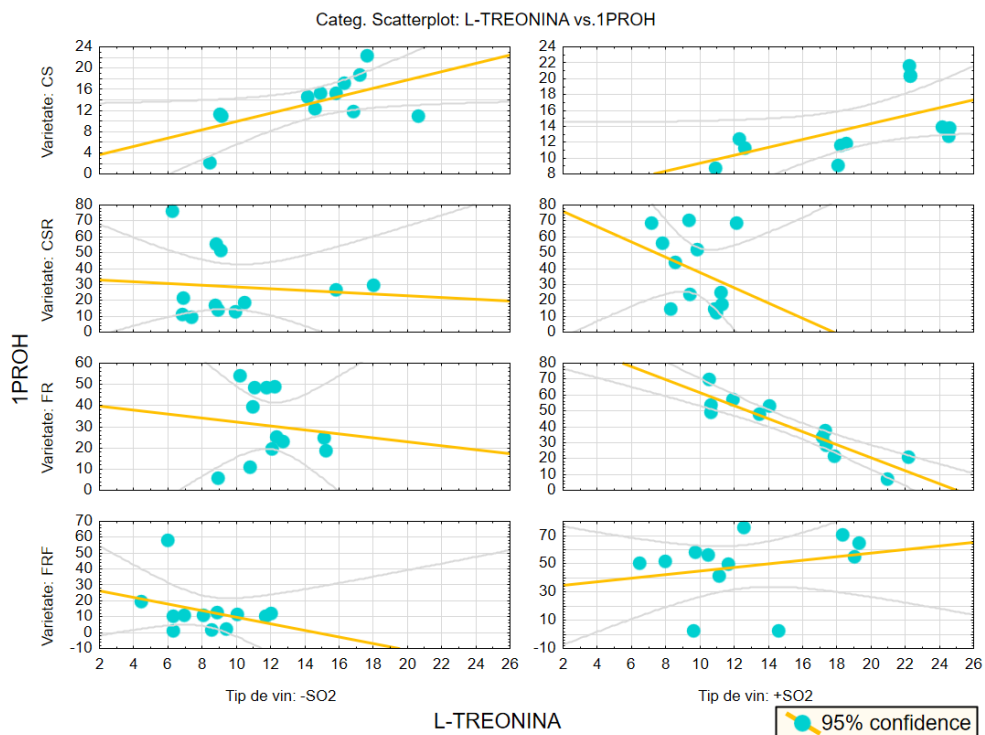


Figura 10.5. Variațiile corelate pentru 1- propanol (1PROH) în funcție de variațiile concentrațiilor de l-treonină.

Figure 10.5. Correlated variations for 1-propanol (1PROH) as a function of variations in l-threonine concentrations.

Factorii de corelație independenți arată posibila cale de formare prin fermentație heterolactică care poate fi explicată mai ales în cazul FRF în cadrul fermentației secundare.

De altfel nivelele pentru 1PROH s-au încadrat între limitele cuprinse între 10 – 40 mg/L corespunzătoare tipului de fermentație și a soiurilor incluse în analiză.

Conform datelor obținute, se remarcă concentrații medii de 14.26 ± 2.39 mg/L pentru CS, respectiv 35.15 ± 6.77 mg/L valoare medie obținută pentru CSR. Probele constituite din soiul de Fetească regală a prezentat concentrații mai mari decât Cabernet Sauvignon, astfel FR liniștit a avut valori de 33.37 ± 9.71 mg/L, respectiv FRF (Fetească regală frizzante) a avut valori de 30.19 ± 12.78 mg/L (Martínez-garcía ș.a., 2017).

De remarcat este faptul că valorile pentru probele care au prezentat sulfiți adăugați prin tratament antioxidant au avut valori mai ridicate decât probele care nu au avut concentrații de sulfiți suplimentare. În aceste condiții, valorile pentru CS au fost comparabile în valori medii. Astfel CS0 a avut concentrații de 14.06 ± 2.97 mg/L (CS0) respectiv 14.46 ± 1.80 mg/L (CS1). În schimb probe CSR au avut nivele de 34.12 ± 7.80 mg/L (CSR0) și respectiv 36.17 ± 5.72 mg/L (CSR1). Nivele aproximative comparabile au fost probele FR0 (30.51 ± 10.47 mg/L) și FR1 ($36.22 \pm$

8.94 mg/L), comparabil cu FRF0 (15.12 ± 10.26 mg/L) și respectiv FRF1 (45.26 ± 15.29 mg/L) (Lin ș.a., 2020).

În aceste condiții, pentru FRF, mediile inter-tratamente au prezentat diferențe semnificative la testul inter-comparativ ANOVA factorial pentru care valoarea parametrului de probabilitate $p < 0.05$. Pe de altă în ANOVA factorial, testarea inter-tratamente nu a prezentat probabilitate de diferențiere semnificativă, dar la testarea între soiuri s-au produs variații remarcabile. Considerând probele care au prezentat adaos de SO₂ s-au obținut diferențe reprezentative cu $P < 0.05$ între CS1 și CSR1 ($p = 0.015$), respectiv CS1 și FR1 ($p = 0.010$) și respectiv CS1 și FRF1 ($p = 0.00026$).

În diferențierea marcată de factorii de probabilitate p determinați, valorile 1PROH pentru CS1 au fost net inferioare față de cele obținute la CSR1, FR1 și respectiv FRF1. Cum dioxidul de sulf este considerat ca un factor favorizant de producere a 1PROH, acest fapt ar putea explica nivelele mai ridicate de 1PROH care s-au înregistrat în cazul probelor ce au prezentat sulfiți adăugați.

Mecanismul care a stat la baza efectului de promotor al 1PROH pentru probele sulfitate este explicat de combinațiile dioxidului de sulf cu diverși compuși, care odată ce se formează, pot crește necesitatea de sulfitare suplimentară, datorită mecanismelor de combinare cu diverși precursori. Având în vedere capacitatea de a combina a dioxidului de sulf cu produși cetonic precum acid ceto-2-gluconic, acid ceto-5-gluconic, ceto-butiric, dioxidul de sulf favorizează amplificarea formării de alcoolii superiori. În această categorie intră 1PROH, 2M-1PROH și 1BTOH. Cu cât lanțul catenar este mai lung, cu atât rapoartele dintre concentrațiile alcoolilor superiori pentru probele de tip sulfat și respectiv de tip nesulfat sunt mai apropiate de 1.0 (Moreno-Arribas ș.a., 2005).

Pentru a obține o înțelegere mai comprehensivă a compușilor volatili, analiza componentelor principale (PCA) (fig. 10.6) fost efectuată pentru a genera o evaluare a tratamentelor cu taninuri anti-oxidante precum și efectele celor trei tratamente individualizate la fiecare tip de vin asupra compușilor volatili. Cu o dimensiune standard unică, scalele au reflectat rezultatele mapării diferiților indici de evaluare (Uysal ș.a., 2017).

Ca rezultat, un număr de șase grupuri au putut fi individualizate care au fost incluse în categorii diferențiate pe gradul de contribuție la modelul statistic și considerând compușii volatili și tratamentul aplicat. În cadrul evaluărilor au fost considerate amestecurile de taninuri și produse antioxidante precum (TVS-TVC-TG) ($84.5 \text{ g} \pm 5.26 \text{ g/hL}$) taninuri cu proprietăți antioxidante și taninuri cu rol în menținerea culorii la vinuri roșii. Prezența tratamentului cu adaos de produse de tip SO₂/acid ascorbic (AA) este evidențiat prin grupa care este considerată ca fiind TVS-TVC-TG-AA ($64.08 \pm 6.23 \text{ g/hL}$) ce prezintă în componență taninuri galice cu rol în intensificarea aromelor și reducerea notelor reductive (Ozturk și Anli, 2014).

În ceea ce privește caracteristica vinurilor rose CSR1 și CSR0, tratamentele au fost diferențiate, astfel CSR0 a beneficiat de un amestec precursori de glutatation, taninuri condensate și tanin galic (GLC-TC-TB) (53.8 ± 3.5 g/hL), în timp ce tratamentul SO₂/acid ascorbic au beneficiat de un amestec de taninuri condensate și galice precum (TC) precum și taninuri hidrolizabile din clasa galotaninuri (TB) (TC-TB-AA) (14.08 ± 3.75 g/hL).

Formele FR au prezentat în mare măsură aceleași amestecuri specifice pentru vinuri albe (TG-TB) (10.5 ± 0.56 g/hL) (taninuri galice, taninuri condensate), diferența între probele cu SO₂ adăugat fiind compensată de nivelurile mai scăzute ale probelor fără SO₂ adăugat (TG-TB-AA) (9.08 ± 0.75 g/hL). Probele frizzante au prezentat doar amestecuri de taninuri galice și galotaninuri (TC-TB) (10.68 ± 1.52 g/hL) (FRF0) și respectiv (TC-TB-AA) (9.1 ± 2.5 g/hL)

În aceste condiții, analiza componentelor principale a fost efectuată pentru a oferi o descriere generală a distribuției celor 10 compuși volatili. În cadrul modelului s-au identificat până la 4 componente principale, dar a căror pondere în explicarea modelului este diferită și specifică. Astfel primele 2 componente produc o variație totală a modelului de 42.7% cu PC1 (Dim1 – 25.7%) respectiv PC2 (Dim2 – 16.6%). Nivele scăzute sunt determinate de numărul mare de componente individuale și componente de grupare care sunt implicate. Nivelele, respectiv concentrațiile, pentru compușii volatili sunt distribuite în special după componenta Dim1, aceasta fiind și determinantă în explicarea distribuției.

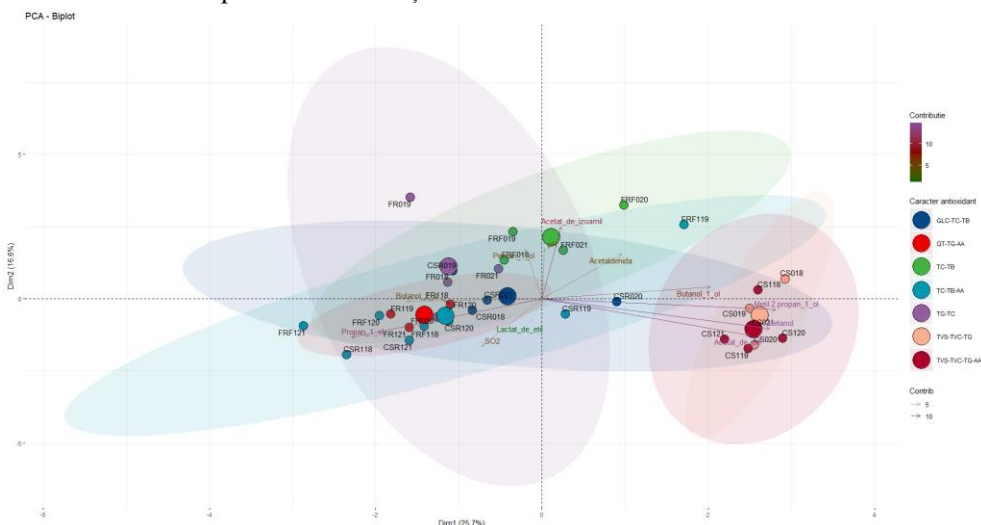


Figura 10.6. Analiza componentelor principale pentru evaluarea variațiilor multe în funcție de contribuția factorilor principali și complementari de grupare.

Figure 10.6. Principal component analysis to assess multiple variances due to the contribution of principal and complementary grouping factors.

În analiza componentelor principale, s-au evidențiat mai multe grupe pe baza similarităților și a asemănărilor în ceea ce privește distribuția variabilelor implicate și

a contribuției acestora la PC1 și respectiv PC2. Prima distribuție este influențată în cadrul pozitiv al PC1 și este formată din amestecurile TVS-TVC-TG și respectiv TVS-TVC-TG-AA. Aceste două tipuri de tratamente s-au aplicat în cazul vinurilor roșii, ceea ce indică o influență asupra acestor categorii de probe. O concluzie este determinată de specificitatea modelului care a validat faptul că tratamentele menționate sunt asociate cu probele CS. O altă grupă este individualizată de amestecurile TC-TB care au format o grupare cu un grad de generalizare mai ridicat ce se distribuie simetric între PC1 și respectiv PC2. Probele incluse au fost constituite din complexul testelor aplicate pentru FRF0 (FRF020, FRF021, FRF019 și FRF018) care s-au situat în poziție simetrică față de FR1 (FRF121, FRF120, FRF119, FRF118). În acest context s-a situat și analiza varietății FR care s-a intersectat cu clusterul format de FRF și respectiv CSR. Aceasta situație este determinată de taninurile condensate care au fost utilizate în cazul tuturor vinurilor care au fost analizate.

Pe de altă parte, analiza componentelor principale a fost efectuată pentru a oferi o descriere generală a distribuției a 16 compuși volatili. În cazul esterilor, inclusiv acetatul de etil și lactatul de etil au contribuit semnificativ la PC 2. În același timp, alcoolii au contribuit semnificativ la PC1, în special alcoolii superiori, cum ar fi MeOH, 2M1PROH, 1BTOH care au fost plasați pe partea pozitivă a PC1. În schimb, 1BTOH, 1PROH au fost distribuiți pe partea negativă a PC1 ceea ce indică faptul că aplicarea anumitor tratamente au influențat în mod negativ concentrațiile acestor compuși. În ceea ce privește ETL și ISA au fost influențate de PC2. Așa cum se observă, factorii care au influențat PC2 au fost pH și respectiv concentrațiile de SO₂. Astfel ETL a prezentat o corelație direct proporțională cu concentrațiile de SO₂, dar ISA a prezentat variație invers proporțională cu prezența SO₂ și direct proporțională cu pH-ului.

10.5 Concluzii

Nivelul unor compuși de aromă s-a dovedit a fi specific pentru fiecare varietate. Acetaldehida, acetatul de etil, 1-butanolul și lactatul de etil au prezentat valori constante. Pentru varietățile fără dioxid de sulf, valorile au fost ușor mai ridicate, dar probele și-au menținut aroma tipică.

Când testul Tukey HSD a fost aplicat, între probele cu SO₂ și fără SO₂, s-au obținut diferențe statistice pentru 1-propanol (Cabernet Sauvignon rosé), 2-metilpropan-1-ol, izoamil acetat și 1-butanol. Ultimii trei compuși au variat pentru Fetească regală Frizzante, varietatea care a avut cele mai semnificative variații, dar în acest caz valorile pentru probele fără dioxid de sulf au fost mai mari.

11 ANALIZA SENZORIALĂ ÎN ACORD CU EVOLUȚIA OXIDATIVĂ A VINURILOR

11. SENSORY ANALYSIS ACCORDING TO THE OXIDATIVE EVOLUTION OF WINES

11.1 Context

Intensitatea aromei este parametrul considerat cel mai important în acest studiu, deoarece fermentarea vinurilor în prezența formelor alternative de conservare a calităților generale a avut scopul de a îmbunătăți profilul aromatic al vinurilor produse în acest fel. De asemenea, tratamentul cu tanin a fost, de asemenea, un factor să conserve al aromei primare și aromei de fermentație a vinurilor, fără procese de oxidare suplimentare.

11.2 Materiale și metode

Pentru analizele senzoriale s-au folosit probe reprezentative din fiecare variantă. Analizele senzoriale au fost efectuate cu un panel de degustători format din 8 persoane, în conformitate cu metodologia dezvoltată și aprobată în prealabil.

De pe foaia de evaluare au fost selectați următorii parametri ca fiind reprezentativi pentru acest tip de mostre. Având în vedere caracterul vinurilor cu și fără adaos de sulfiți, s-au configurat 3 seturi de parametri care să cuprindă o gamă cât mai largă de evaluări. Descriptorii vizuali au urmărit variații de la aspectul specific de soi al fiecărui tip, variații care să urmărească eventuale modificări ale aspectului ca urmare a unor procese de oxidare, complexare proteică, depuneri tartrice, degradarea compușilor de culoare din vinuri. Parametrii olfactivi au fost selectați pentru a defini tipicitatea senzorială, regăsirea aromelor varietale dar și a eventualelor modificări specifice dezvoltate în urma utilizării substanțelor care au fost implicate în vinificație. S-au folosit termeni precum fructat, floral, condimentat, lemnos, mineral sau toate celelalte arome specifice fiecărui tip de vin. Parametrii gustativi au urmărit evaluarea dulceaței, astringenței, amărăciunii, persistență precum și intensitatea aromelor corespunzătoare. Parametrii sunt evaluați pe scale de intensitate continue cu o valoare maximă de 10, ancorate cu descriptorii corespunzători.

Semnificația valorilor obținute pentru diferiți parametri senzoriali a fost testată cu ajutorul analizei one-way ANOVA în TIBCO Statistica 14, iar pentru comparația multiplă a diferențelor medii s-a folosit analiza post-hoc Tukey. Media care diferă semnificativ față de celelalte este indicată cu litere diferite, în timp ce o literă similară înseamnă că nu există o diferență semnificativă între acele grupuri la $p > 0.05$.

Pentru ca degustătorii de vin să poată compara mostrele într-un mod semnificativ, variantele au fost grupate în funcție de componenta antioxidantă principală (SO₂). Astfel, au fost formate următoarele grupuri (tabel 11.1).

<i>Soi</i>	<i>Probe +SO₂</i>	<i>Probe - SO₂</i>
<i>Cabernet Sauvignon</i>	CS1	CS0
<i>Cabernet Sauvignon roze</i>	CSR1	CSR0
<i>Fetească regală</i>	FR1	FR0
<i>Fetească regală Frizzante</i>	FRF1	FRF0

Tabel 11.1. Codificarea probelor incluse în studiul de testare a poșilelor senzoriale.

Table 11.1. Coding of samples included in the sensory profile testing study.

11.3 Rezultate și discuții

Toți descriptorii corespunzători fiecărei serii pot fi consultați în tabelele 11.2 și respectiv 11.3. După cum se poate observa, profilurile corespunzătoare aceluiași vinuri sunt definite în funcție de tehnologia de vinificație, care este diferențiată prin utilizare de SO₂ /acid ascorbic și respectiv taninuri pentru stabilitate biochimică și antioxidantă. Pentru tehnologia secundară s-a considerat fermentația malolactică, vinificația vinurilor în sec și respectiv utilizare de taninuri cu caracter antioxidant.

În conformitate cu grupurile descrise în tabelul 11.1, au fost determinate profilurile senzoriale generale ale grupurilor, pe baza mediei fiecărui parametru pentru grupul respectiv. În plus, în tabelele 11.2 și 11.3 sunt incluse rezultatele testului post-hoc Tuckey. Al doilea obiectiv a fost de a compara analiza senzorială între vinurile fără sulfiți (-SO₂) și vinurile de referință (+SO₂), pentru a determina dacă vreunul dintre noile soiuri ar putea induce caracteristici organoleptice similare sau mai bune.

Pentru a verifica dacă diferențele detectate în profilul senzorial au rezultat în vinuri cu caracteristici senzoriale diferite, rezultatele analizei senzoriale s-au grupat în hărți radar. După cum se arată în fig. 11.1, vinurile din experimentele -SO₂ și +SO₂ au prezentat cele mai mari valori pentru descriptorii vizuali, în cazul tuturor tipurilor de probe. În ceea ce privește evaluarea culorii, se poate observa că probele -SO₂ au prezentat valori mai mari tonalităților care anticipau modificări de culoare caracteristice proceselor de oxidare. Astfel pentru CS s-a considerat tonalitatea roșu-brun, CSR (roz cupru), iar pentru FRF (galben-auriu) și respectiv FR (galben – miere). Profilurile generale ale grupurilor sunt prezentate în fig. 11.1 (a, g, d, j).

Caracteristica este relevantă de scorurile mai ridicate care au fost în favoarea probelor fără SO₂, CS0 (6.0 ± 0.2) în raport cu CS1 (5.5 ± 0.5); CSR0 (4.67 ± 0.6) în raport cu CSR1 (1.67 ± 0.2). În mod similar FR0 a prezentat o variație mult amplificată 6.60 ± 0.25 față de 2.67 ± 0.25 (FR1), similar pentru (FRF0) care a avut valori de 3.80 ± 1.2 față de FRF1 (2.00 ± 0.2). Datele sunt în acord cu tonalitățile de tip somon pal (6.88 ± 0.15) (CSR1), galben-verde pal 5.25 ± 0.2 (FRF1) și respectiv galben – verde pal (6.13 ± 0.5) (FR1). Aceste valori sunt în acord cu parametrii CIELab obținuți pentru vinurile fără SO₂, deoarece aceste vinuri au prezentat valori mai mari ale lui a* și b*.

<i>Cabernet Sauvignon Rose (CSR)</i>		<i>T-tests; Grouping: TIP DE VIN (CSR)</i>			<i>Cabernet Sauvignon (CS)</i>		<i>T-tests; Grouping: TIP DE VIN (CS)</i>		
		<i>Group 1: +SO2</i>					<i>Group 1: +SO2</i>		
		<i>Group 2: -SO2</i>					<i>Group 2: -SO2</i>		
		CSR1	CSR0	p			CS1	CS0	p
<i>Somon pal</i>	SP	6.88	4.00	0.12	<i>Rosu rubiniu</i>	RR	1.75	3.80	0.11
<i>Roz Piersică</i>	RP*	3.80	6.63	0.03	<i>Rosu violet</i>	RV	1.67	2.75	0.50
<i>Roz cupru</i>	RC	1.67	4.67	0.20	<i>Rosu brun</i>	RB	5.50	6.00	0.65
<i>Măr verde</i>	MV*	5.14	2.57	0.00	<i>Cireșe/vișine</i>	C/V	4.38	5.63	0.18
<i>Citric</i>	C	4.13	3.38	0.43	<i>Marmeladă</i>	M	4.00	3.13	0.51
<i>Vegetal</i>	V	3.50	3.71	0.86	<i>Fructe de pădure</i>	FP	4.63	5.25	0.52
<i>Mineral</i>	Mn	3.38	3.50	0.82	<i>Prune uscate</i>	PU	6.14	4.00	0.09
<i>Fructe exotice</i>	FE	4.71	4.43	0.80	<i>Condimente</i>	C	4.88	5.75	0.41
<i>Trandafir</i>	T	4.50	3.67	0.47	<i>Cafea</i>	Cf	4.00	3.80	0.83
<i>Flori de câmp</i>	FC	5.00	3.83	0.19	<i>Ciocolată</i>	Ci	4.38	4.67	0.79
<i>Ananas</i>	A	3.43	3.00	0.73	<i>Stejar/lemn</i>	S/L	4.88	4.00	0.50
<i>Piersică</i>	P	4.25	3.71	0.61	<i>Vegetal/Ierbos</i>	V/I	3.20	3.57	0.80
<i>Căpșuni</i>	Cp	3.50	3.67	0.89	<i>Piele tâbăcită</i>	PT	4.00	4.83	0.54
<i>Miere</i>	M	4.00	2.33	0.37	<i>Onctuos</i>	Onc	3.88	4.38	0.55
<i>Fân cosit</i>	FCs	2.80	2.83	0.97	<i>Acid</i>	A	5.25	4.00	0.10
<i>Acid</i>	A	4.63	5.13	0.55	<i>Dulce</i>	D	3.00	3.38	0.65
<i>Dulce</i>	D	4.29	2.75	0.08	<i>Amar</i>	Am	4.14	3.14	0.32
<i>Amar</i>	Am	2.71	4.29	0.08	<i>Astringent</i>	As	4.63	4.63	1.00
<i>Textură</i>	T	5.00	5.13	0.88	<i>Persistență</i>	P	6.50	6.13	0.58
<i>Persistentă</i>	P	6.43	6.13	0.48	<i>Structură</i>	S	5.63	6.38	0.25

* diferență statistică semnificativă ($p < 0.05$)

Tabel 11.2. Evaluarea parametrilor senzoriali pentru CSR (Cabernet Sauvignon Roze) și (CS) Cabernet Sauvignon

Table 11.2. Evaluation of sensory parameters for CSR (Cabernet Sauvignon Rose) and (CS) Cabernet Sauvignon

Conținutul total de fenoli (IFC), activitatea antiradicalară (IC50) și parametrii cromatici L, a*, b* au fost corelați în raport cu evaluarea nuanțelor caracteristice fiecărui tip de vin. Luminozitatea (L*) nu fost corelată pozitiv puternic cu parametrul cromatic b* și oxidarea, dar a prezentat câteva corelații în raport cu senzația de galben auriu (FRF0). Pe de altă parte, aceeași senzație de galben auriu s-a corelat cu dozele de taninuri adăugate ($r=0.94$) ceea ce este și de așteptat deoarece aceste amestecuri au rolul de a oferi prospețime vinurilor analizate. Aceeași variație s-a considerat în considerând parametrii de luminozitate a* în raport cu senzația de galben-verde pal și cu senzația de miere-auriu pentru FR0. Într-adevăr, dacă se consideră faptul că parametrul b* este corelat cu oxidarea, se poate observa corelația sa directă cu tonalitatea de auriu – miere, confirmată de un coeficient de corelație $r=0.890$. De remarcat este că luminozitatea s-a corelat și cu conținuturile de flavone la FR0 unde coeficientul de corelație au fost $r=0.74$ ($p < 0.05$) și în mod direct cu dozele de taninuri adăugate ($r=0.78$). Considerând dinamica de legătură cu parametrii de oxidare, se observă aceeași discuție a parametrului de tonalitate b* cu evaluările obținute cu aspectul de roz – piersică.

În ceea ce privește descriptorii olfactivi (fig. 11.1(b, c, h, k)), s-a efectuat încadrarea acestora pe grupe caracteristice. Astfel s-au grupat pe categorii ca și arome florale, arome vegetale, fructate (fructe exotice, fructe roșii și citrice și condimentate). Pe de altă parte s-a realizat și grupa aromelor secundare în care s-au introdus aromele autolizate (onctuos) și aromelor de stejar, dar și terțiare în categoria celor caracteristice maturării la siclă (marmeladă, piele tăbăcită, prune uscate) și respectiv oxidare deliberată (cafea, ciocolată).

<i>Fetească regală frizzante</i>		<i>T-tests; Grouping: TIP DE VIN (FRF)</i>			<i>Fetească regală</i>		<i>T-tests; Grouping: TIP DE VIN (FR)</i>		
		<i>Group 1: +SO2</i>					<i>Group 1: +SO2</i>		
		<i>Group 2: -SO2</i>					<i>Group 2: -SO2</i>		
		FRF1	FRF0	p			FR1	FR0	p
<i>Galben-verzui</i>	G/V	5.25	3.80	0.21	<i>Galben-verde pal</i>	G/V*	6.13	2.75	0.02
<i>Galben-auriu</i>	G/A*	2.67	6.60	0.00	<i>Galben-mediu</i>	G/M	3.00	5.13	0.19
<i>Galben-pai</i>	G/P	4.00	5.75	0.14	<i>Auriu - miere</i>	A/M	2.00	3.80	0.29
<i>Perlaj</i>	Pr*	4.13	6.13	0.03	<i>Verde/vegetal</i>	Vd/V	5.13	2.88	0.05
<i>Verde/vegetal</i>	V/G	3.86	4.29	0.74	<i>Mineral</i>	Mn	4.13	2.86	0.12
<i>Citrice</i>	C	4.25	5.75	0.14	<i>Citric</i>	C	4.50	2.71	0.06
<i>Bomboane/jeleu</i>	B/J	4.00	4.00	1.00	<i>Fructe coapte</i>	FfC	3.00	4.13	0.40
<i>Mar</i>	M	3.63	4.75	0.19	<i>Fructe exotice</i>	FE	4.67	3.57	0.41
<i>Piersica</i>	P	4.33	4.00	0.83	<i>Fructe uscate</i>	FU	3.20	3.88	0.45
<i>Pepene galben</i>	PG	4.00	4.00	1.00	<i>Fructe verzi</i>	FV	4.63	3.14	0.28
<i>Flori de soc</i>	FS	4.67	3.43	0.18	<i>Fân cosit</i>	FCs	3.75	3.50	0.83
<i>Maia</i>	Ma	3.33	5.71	0.06	<i>Flori de camp</i>	FC	4.86	3.13	0.15
<i>Banana verde</i>	BV	3.86	4.14	0.81	<i>Condimente</i>	C	2.83	3.17	0.70
<i>Acid</i>	A*	4.25	6.25	0.00	<i>Miere</i>	M	2.60	3.71	0.38
<i>Dulce</i>	D*	5.71	1.83	0.00	<i>Vanilie</i>	V	2.00	2.50	0.67
<i>Amar</i>	Am	4.00	3.00	0.43	<i>Migdale</i>	Mg	2.33	3.67	0.44
<i>Sarat</i>	S	2.29	3.33	0.27	<i>Cafea</i>	Cf	2.95	2.33	0.53
<i>Textură</i>	T	4.13	5.38	0.16	<i>Caramel</i>	C	2.50	2.40	0.93
<i>Persistență</i>	P*	4.38	6.25	0.01	<i>Acid</i>	A*	6.38	4.57	0.05
					<i>Dulce</i>	D*	3.63	1.83	0.04
					<i>Amar</i>	Am	2.71	4.43	0.05
					<i>Textură</i>	T	4.63	3.88	0.30
					<i>Persistență</i>	P	5.75	4.75	0.28

* diferență statistică semnificativă ($p < 0.05$)

Tabel 11.3. Evaluarea parametrilor senzoriali pentru FRF (Fetească regală Frizzante) și (FR) Fetească regală

Table 11.3. Evaluation of sensory parameters for FRF (Fetească regală Frizzante) and (FR) Fetească regală

Probele de vin supuse sulfitării au prezentat arome mai puternice pentru arome fructate în cazul tuturor tipurilor de varietăți incluse în studiu: CSR1 (3.95 ± 1.25), FR1 (4.27 ± 1.52) și respectiv FRF1 (4.58 ± 2.12). Cu toate că valorile notelor florale sunt mai scăzute, este de remarcat faptul că la valori medii nu reprezintă valori semnificativ statistice față de probele fără adaos de sulfiți.

Totodată, nota mai puternică de fructe coapte detectată în vinurile $-SO_2$ ar putea fi explicată prin conținutul mai mare de compuși volatili de oxidare caracteristici notelor fructate și în special fructe "prăjite" (Prida și Chatonnet, 2010).

Cu toate acestea, se remarcă valori mai ridicate ale probelor de tip FR0 de 4.13 ± 0.25 (fructe coapte/fructe verzi) și respectiv 3.00 ± 0.52 (FR1), în condițiile în care pentru valorile aferente Fetească regală Frizzante se remarcă superior percepția de măr copt pentru FRF1 (4.75 ± 0.23) în raport cu FRF0 (3.63 ± 0.25). Pentru varietatea de tip CSR, se remarcă valori superioare ale aromelor de tip căpșuni (3.67 ± 1.74) și respectiv piersică 3.71 ± 0.25 în raport cu 3.50 ± 0.74 pentru CSR1.

În schimb, multe proprietăți au fost promovate semnificativ prin adăugarea de taninuri, în special la nivelul percepțiilor privind corpul, astringența, intensitatea culorii și calitatea aromei, care contribuie pozitiv la aroma și senzația în gură a vinului. Kai Chen ș.a. (2016) au atribuit faptul că complexitatea aromei, aromele fructate și florale pot fi îmbunătățite în timpul procesului de maturare a vinului prin adăugarea de proantocianidine oligomerice, care sunt componente fenolice principale al taninurilor de sămburi de struguri. Acestea influențează pozitiv dezvoltarea alcoolilor superiori, fapt remarcat și de analiza compușilor volatili a căror valori au fost superioare față de probele care au avut administrat SO₂. Aspectul este explicat de faptul că alcoolii superiori considerați sunt arome de fermentație în condițiile în care doar pentru CS s-au adăugat taninuri stabilizatoare încă din timpul fermentației. În schimb, nivelele unor esteri, precum acetatul de etil, acetatul de izoamil și lactatul de etil au fost comparabile, doar valori mai ridicate s-au înregistrat pentru lactatul de etil.

Cu toate că aromele fructate au fost promovate semnificativ prin adăugarea de taninuri TG (taninuri galice), aroma vegetală a arătat un rezultat opus. În plus, taninul din coaja de strugure (TC) are efecte paralele cu tratamentele TG asupra fiecărui indicator. Comparând cu vinurile tratate exclusiv cu taninuri pentru tratamente antioxidante, aceste tratamente au crescut semnificativ astringența vinului, ceea ce ar afecta echilibrul. Rezultatele au indicat faptul că parametrii pentru probele tratate cu taninuri au prezentat evaluări ușor mai ridicate în raport cu probele la care s-a utilizat SO₂. Astfel pentru CS0 valoarea medie pentru parametrii corespunzători aromelor primare sunt de 5.44 ± 0.56 (CS0) în raport cu 4.51 ± 0.65 (CS1), dar la nivelul aromelor secundare 4.19 ± 1.32 (CS0) raportul a fost invers 4.38 ± 0.66 (CS1), tendința fiind remarcabilă și pentru aromele terțiare 4.09 ± 0.66 (CS0) în raport cu 4.50 ± 1.65 (CS1).

Evaluarea senzorială a indicat că momentul și metoda de inoculare a fermentației malolactice (MLB) au afectat semnificativ gustul și aroma vinurilor. În general, fermentația malolactică a diversificat profilul aromatic. Vinurile co-inoculate au fost observate să aibă niveluri mai ridicate de senzații fructate, proaspete și florale decât vinurile care au folosit fermentația malolactică secvențială. Procesul spontan a fost perceput ca producând vinuri cu arome mai untate și amăruie. Aromele plăcut echilibrate de unt și nucă au fost de asemenea găsite în vinurile co-inoculate (CS0 (4.38 ± 0.52)), FRF0 (5.71 ± 0.25). Vinurile după procesele secvențiale și spontane

nu au avut arome de nucă, dar au fost notate în schimb arome puternice de unt (Lloret ș.a., 2002).

Datele sunt în acord cu Li ș.a., (2020) care au investigat calitățile senzoriale ale adăugării de tanin în vinurile roșii și au concluzionat că vinul adăugat cu tanin hidrolizabil a obținut un scor mare în aroma și buchet, cu o echilibrare și un postgust bun; totuși, vinul avea un gust astringent și amarui, ceea ce era în concordanță cu proprietățile senzoriale ale elagitaninurilor.

Contribuția taninurilor aplicate, fiind în doze comparative, a determinat valori similare care nu au prezentat diferențe semnificative. În general valorile caracteristice probelor fără SO₂ reprezintă evaluări inferioare față de valorile probelor la care s-a efectuat adiția de SO₂, percepțiile fiind amplificate și de prezența conservantului. În acest fel, aromele florale caracteristice au fost în echilibru, pentru CSR0 cu 3.51 ± 0.85 și respectiv CSR1 cu 3.95 ± 0.65 .

O distribuție similară a fost determinată și pentru notele fructate, mai ales că s-au evaluat note de fructe proaspete care nu au fost asociate cu note de fructe coapte, oxidative ce pot să aducă note dezagreabile vinurilor. Valorile medii pentru aromele fructate au fost de 4.07 ± 1.25 (CSR1) în comparație cu 3.14 ± 0.99 (CSR0), dar diferențe semnificative au fost determinate pentru aroma de capșuni care a fost evaluată la valori de 3.50 ± 1.25 (CSR1) și respectiv 1.00 ± 0.21 (CSR0). În schimb au fost percepute note de condimente în raport superior pentru CSR0 (3.50 ± 0.21), iar datorită caracterului de vin sec, valorile pentru arome terțiare precum senzația de miere a fost de 2.33 ± 1.2 (CSR0) în raport cu 4.0 ± 0.21 (CSR1).

Degradarea oxidativă a vinurilor albe duce rapid la pierderea calităților lor senzoriale, în special la pierderea aromelor florale și fructate specifice vinurilor tinere sau la formarea unor arome noi neobișnuite asociate cu deteriorarea vinului și ulterior la schimbările cromatice nedorite (dezvoltarea culorii brune) (Ferreira ș.a., 2002).

Cu toate că este bine stabilit faptul că adăugarea de taninuri contribuie la structura vinului și îmbunătățește multe atribute senzoriale, acestea nu sunt întotdeauna perfect integrate și vinurile pot pierde echilibrul, rezultând într-o rigidizare și o creștere a senzațiilor amare. Compensarea cu tininuri oenologice a evitat degradarea vinurilor astfel că în cazul probelor de vin alb indiferent de forma vin liniștit sau frizzante, nivelele aromelor proaspete au fost comparative FRF1 (4.27 ± 0.52) în raport cu FRF0 (3.86 ± 0.62). Echilibrul s-a menținut și pentru notele fructate. O situație mai aparte, care a prezentat diferențe semnificative din punct de vedere a distribuției ANOVA, indică faptul că aromele fructate care dau prospețime și vigurozitate vinului au avut un nivel estompat (4.58 ± 0.52) (FR1) și respectiv (3.17 ± 0.6) (FR0) ($p < 0.05$).

Comparând evaluarea gustului a diferitelor probe de vin (fig.11.1(c, f, i, l), vinurile supuse tratamentelor fără SO₂ au prezentat un nivel ușor mai ridicat de amărăciune dar un nivel comparativ al corpului și echilibrului în raport cu celelalte

vinuri. Nu au fost observate diferențe semnificative în ceea ce privește gustul și aroma între cele două probe de vin. La evaluare, vinurile supuse tratamentului fără SO₂ au prezentat o evaluare globală mai mică, în special în ceea ce privește calitatea aromei și gustului, în comparație cu probele de vin de referință. În general, diferențele cele mai evidente sunt la nivelul percepției de acid pentru care CSR0 (5.13 ± 0.52) și FRF0 (6.25 ± 1.62) au avut valori ușor superioare față de probele de referință. În schimb, probele FR0 și CS0 au avut valori inferioare față de cele de referință; în cazul FR au diferențele semnificative 4.57 ± 0.52 (FR0) față de 6.38 ± 1.25 (FR1).

Corelații puternice au fost, de asemenea, observate între intensitatea culorii, fie pozitive cu amărăciunea, fie negative cu intensitatea mirosului. Calitatea aromei a fost corelată pozitiv puternic cu corpul și moderat cu post gustul și acceptarea generală. Corelațiile s-au produs în special în raport cu persistența care s-a menținut în ambele cazuri de vin la valori comparabile. În cazul tuturor varietăților de vin, valorile s-au menținut pe valori medii și fără diferență semnificativă, exemplu (4.75 ± 0.25 (FR0)) și respectiv 5.75 ± 0.66 (FR1). În aceste condiții, persistența s-a evaluat la valori mai ridicate pentru CS și respectiv CSR. Pentru CS, valorile s-au situat la 4.61 ± 0.85 (CS0) și 4.86 ± 0.12 (CS1), similar pentru CSR0 (4.61 ± 1.2) și CSR1 (4.69 ± 0.11). Textura vinurilor a inclus corpul, vâscozitatea și tăria alcoolică, valori care au fost superioare pentru tipurile de vin fără SO₂ adăugat. Situația ar putea fi determinată de corecțiile efectuate după procesele de fermentație. (5.63 ± 0.25 (CS1), respectiv 6.38 ± 0.55 (CS0), iar pentru CSR s-au determinat 5.00 ± 0.52 (CSR1) și 5.13 ± 0.66 (CSR0), aceleași evaluări pentru FRF (4.13 ± 0.82 și 5.38 ± 0.11). Așa cum s-a menționat și anterior valorile au fost inferioare pentru FR la care FR0 a prezentat valoarea de 3.88 ± 0.52 în raport cu FR1 pentru care evaluarea a indicat un scor de 4.63 ± 0.25 .

11.4 Concluzii

Eșantioanele de vin îmbogățite cu tanin și sulfitate au fost evaluate. Culoarea, intensitatea gustului, calitatea aromei și corpul eșantioanelor de vin au fost afectate semnificativ după adăugarea de tanin, mai ales la niveluri superioare de adăugare. Cu toate acestea, în rezultatele testului de oxidare, eșantioanele de vin îmbogățite cu tanin au primit scoruri mai mici decât vinul de control, totuși mai mari decât cele ale vinului sulfitat, indicând eficacitatea taninului ca agent antioxidant. Prin urmare, creșterea scorului de intensitate a mirosului în vinul sulfitat este posibil legată de prezența dioxidului de sulf. În ceea ce privește amărăciunea, s-a observat o diferență clară în vinurile îmbogățite cu tanin, în comparație cu vinul de control și vinul sulfitat, în timp ce echilibrul gustului din vinurile îmbogățite cu tanin a fost evaluat ca comparabil cu cele ale vinului de control și sulfitat. În final, calitatea aromei, corpul, postgustul și acceptarea generală a eșantioanelor de vin tratate cu taninuri au fost foarte apreciate și au primit cele mai mari scoruri de către evaluatori.

12 BIBLIOGRAFIE

1. Irwin, S.V., Fisher, P., Graham, E., Malek, A., & Robidoux, A. (2017). Sulfites inhibit the growth of four species of beneficial gut bacteria at concentrations regarded as safe for food. *PLoS One*, 12, e0186629.
2. Divol, B., du Toit, M., & Duckitt, E. (2012). Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 601–613.
3. Usseglio-Tomasset, L. (1995). *Chimie oenologique*. Tec and Doc Lavoisier, Paris.
4. Barbe, J.C., de Revel, G., & Bertrand, A. (2002). Gluconic Acid, Its Lactones, and SO₂ Binding Phenomena in Musts from Botrytized Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6408.
5. Barbe, J.C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., & Bertrand, A. (2000). Role of Carbonyl Compounds in SO₂ Binding Phenomena in Musts and Wines from Botrytized Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 34.
6. Jackowetz, J.N., & Mira de Orduña, R. (2013). Survey of SO₂ binding carbonyls in 237 red and white table wines. *Food Control*, 32(2), 687–692.
7. Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments*, vol. 2, 2nd edn. Wiley, Chichester.
8. Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. In G. H. Fleet (Ed.), *Wine microbiology and biotechnology* (pp. 373–393). Harwood Academic Publishers.
9. Walling, E., Gindreau, E., & Lonvaud-Funel, A. (2005). A putative glucan synthase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* strains isolated from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 53–62.
10. Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobben, G.J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12, 151–161.
11. Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
12. Vivas, N., Bellemere, L., Lonvaud-Funel, A., Glories, Y., & Augustin, M. (1995). Etudes sur la fermentation malolactique des vins rouges en barriques I. *Rev. Fr. Oenol.*, 151, 39–45.
13. Romano, P., & Suzzi, G. (1992). In *Wine Microbiology and Biotechnology* (ed. G.H. Fleet). Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

14. Ough, C.S., Kunkee, R.E., Vilas, M.R., Bordeu, E., & Huang, M.C. (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39(4), 279–282.
15. Divol, B., Tonon, T., Morichon, S., Gindreau, E., & Lonvaud-Funel, A. (2003). Molecular characterization of *Oenococcus oeni* genes encoding proteins involved in arginine transport. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 738.
16. Arapitsas, P., Guella, G., & Mattivi, F. (2018). The impact of SO₂ on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age. *Scientific Reports*, 8(1), 858.
17. Valera, M.J., Sainz, F., Mas, A., & Torija, M.J. (2017). Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 1–4.
18. Sudraud, P., & Chauvet, S. (1985). Activité antilevure de l'anhydride sulfureux moléculaire. *Conn. Vigne Vin*, 19, 31–40.
19. Elias, R.J., & Waterhouse, A.L. (2010). Controlling the fenton reaction in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1699–1707.
20. Jacobs, A.C., & Hatfield, K. (2013). History of Chronic Toxicity and Animal Carcinogenicity Studies for Pharmaceuticals. *Veterinary Pathology*, 50(2), 324–333.
21. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. John Wiley & Sons.
22. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., & Coimbra, M.A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234(1), 1–12.
23. OIV. (2018). SO₂ and Wine: A Review. Retrieved from <https://www.oiv.int/public/medias/7840/oiv-collective-expertise-document-so2-and-wine-a-review.pdf>
24. Fleet, G.H. (1993). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
25. Bartowsky, E.J., & Borneman, A.R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 441–447.
26. Bartowsky, E.J., & Henschke, P.A. (2004). The ‘buttery’ attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 235–252.
27. Bartowsky, E.J., Costello, P.J., Villa, A., & Henschke, P.A. (2004). The chemical and sensorial effects of lysozyme addition to red and white wines over six

- months' cellar storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(2), 143–150.
28. Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., & Bates, D. (2008). High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnology Letters*, 30, 1–6.
 29. McKenzie, H. A., & White, F. H. (1991). Lysozyme and algalactalbumin: Structure, function, and interrelationships. *Advances in Protein Chemistry*, 41, 173–315.
 30. Daudt, C. E., & Ough, C. S. (1980). Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31, 21–23.
 31. Delfini, C., Gaia, P., Schellino, R., Strano, M., Pagliara, A., & Ambr`o S. (2002). Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5605–5611.
 32. Costa, A., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2008). Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25, 422–427.
 33. Suarez, R., Su´arez-Lepe, J. A., Morata, A., & Calder´on, F. (2007). The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *rettanomyces* and *Dekkera*: A review. *Food Chemistry*, 102, 10–21.
 34. Ough, C. S., Kunkee, R. E., Vilas, M. R., Bordeu, E., & Huang M. C. (1988). The interaction of sulfur dioxide, pH, and dimethyl dicarbonate on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* Montrachet and *Leuconostoc oenos* MCW. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 279–282.
 35. Terrell, F. R., Morris, J. R., Johnson, M. G., Gbur, E. E., & Makus, D. J. (1993). Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid, and dimethyl dicarbonate. *Journal of Food Science*, 58, 1132–1134.
 36. Delfini, C., Cersosimo, M., Del Prete, V., Strano, M., Gaetano, G., Pagliara, A., Ambro, S. (2004). Resistance screening essay of wine lactic acid bacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1861–1866.
 37. Azzolini, M., Tosi, E., Veneri, G., Zapparoli, G. (2010). Evaluating the efficacy of lysozyme against lactic acid bacteria under different winemaking scenarios. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31, 99–105.
 38. Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonc,Alves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013a). Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 141, 2558–2566.
 39. Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential: A critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, 2, 186–201.

40. Valera, M.J., Sainz, F., Mas, A., Torija, M.J. (2017). Effect of chitosan and SO₂ on viability of *Acetobacter* strains in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 1–4.
41. Chorniak, J. (2007). A clearer understanding of fining agents. *Wine Maker Magazine*, Oct/Nov. <https://winemakermag.com/article/26-a-clearer-understanding-of-fining-agents>
42. Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2014). Efficacy of Chitosan in Inhibiting the Oxidation of (+)-Catechin in White Wine Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9868-9875.
43. Nunes, C., Maricato, É., Cunha, Â., Rocha, M., Santos, S., Ferreira, P., Silva, M.A., Rodrigues, A., Amado, O., Coimbra, J., Silva, D., Moreira, A., Mendo, S., Lopes Da Silva, J.A., Pereira, E., Rocha, S.M., Coimbra, M.A. (2016). Chitosan–genipin film, a sustainable methodology for wine preservation. *Green Chemistry*, 18, 5331–5341.
44. Oro, L., Ciani, M., Bizzaro, D., Comitini, F. (2016). Evaluation of damage induced by Kwkt and Pikt zymocins against *Brettanomyces/Dekkera* spoilage yeast as compared to sulphur dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 211, 207–214.
45. Yildirim, H.K., Altindişli A. (2015). Changes of Phenolic Compounds During Aging of Organic Wines. *International Journal of Food Properties*, 18, 1038-1045.
46. Sonni, F., Jesus, M., Bastante, C., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 688–696.
47. Silva, V., Igrejas, G., Falco, V., Santos, T.P., Torres, C., Oliveira, M.P., Pereira, J.E., Amaral, J.S., Poeta, (2018). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*, 92, 516-522.
48. Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11, 2–3, 153–177.
49. De Torres, C., Schumacher, R., Alañón, M.E., Pérez-Coello, M.S., Díaz-Maroto, M.C. (2015). Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. *Food Research International*, 69, 97–105.
50. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 579–590.
51. Sonni, F., Jesus, M., Bastante, C., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during

- fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 688–696.
52. García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M., Martín-Álvarez, P., Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 426-431.
 53. Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gomez-Alonso, S., García-Romero, E. (2017). Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26-32.
 54. Zamora, F. (2019). Chapter 9 - Barrel Aging; Types of Wood. In *Red Wine Technology* (Antonio Morata ed.). Academic Press, 125-147, 125-147.
 55. Alamo-Sanza, M., Nevares, I., Martínez-Gil, A., Rubio-Bretón, P., Garde-Cerdán, T. (2019). Impact of long bottle aging (10 years) on volatile composition of red wines micro-oxygenated with oak alternatives. *LWT - Food Science and Technology*, 101, 395-403.
 56. Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Cantos-Villar, E. (2016a). Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*, 197, 1102–1111.
 57. Raposo, R., Ruiz-Moreno, M.J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J.M., Zafrilla, P., Gonzalo, A. (2016c). Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 214–221.
 58. Fracassetti, D., Gabrielli, M., Costa, C., Tom, F.A., Tirelli, A. (2016). Characterization and suitability of polyphenols-based formulas to replace sulfur dioxide for storage of sparkling white wine. *Food Control*, 60, 606–614.
 59. Gambuti, A., Han, G., Peterson, A.L., Waterhouse, A.L. (2015). Sulfur Dioxide and Glutathione Alter the Outcome of Microoxygenation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66, 411–423.
 60. Webber, V., Valduga, S., Rodrigues, F., João, G., Cardozo, A., Vanderlinde, R. (2017). Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chemistry*, 216, 254–259.
 61. Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., Bosso, A. (2015). Effect of SO₂ reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research and Technology*, 240, 345–356.
 62. Kurtzman, C.; Fell, J.W.; Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
 63. Ciani, M.; Canonico, L.; Oro, L.; Comitini, F. (2020). Footprint of nonconventional yeasts and their contribution in alcoholic fermentations. In *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p435–465.

64. Gutiérrez, A.; Boekhout, T.; Gojkovic, Z.; Katz, M. (2018). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 124, 389–402.
65. Contreras, A.; Hidalgo, C.; Schmidt, S.; Henschke, P.; Curtin, C.; Varela, C. (2015). The application of non-Saccharomyces yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 7–15.
66. Dutraive, O.; Benito, S.; Fritsch, S.; Beisert, B.; Patz, C.-D.; Rauhut, D. (2019). Effect of Sequential Inoculation with Non-Saccharomyces and Saccharomyces Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*, 5, 79.
67. Anfang, N.; Brajkovich, M.; Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 15, 1–8.
68. Dutraive, O.; Benito, S.; Fritsch, S.; Beisert, B.; Patz, C.-D.; Rauhut, D. (2019). Effect of Sequential Inoculation with Non-Saccharomyces and Saccharomyces Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation*, 5, 79.
69. Lu, Y.; Voon, M.K.W.; Chua, J.-Y.; Huang, D.; Lee, P.-R.; Liu, S.-Q. (2017). The effects of co-and sequential inoculation of *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia kluyveri* on chemical compositions of durian wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 7853–7863.
70. Waterhouse, A.L.; Sacks, G.L.; Jeffery, D.W. (2016). *Understanding Wine Chemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA.
71. Anfang, N.; Brajkovich, M.; Goddard, M.R. (2009). Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 15, 1–8.
72. Belda, I.; Ruiz, J.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A. (2016). Improvement of aromatic thiol release through the selection of yeasts with increased β -lyase activity. *Int. J. Food Microbiol.*, 225, 1–8.
73. Ruiz, J.; Kiene, F.; Belda, I.; Fracassetti, D.; Marquina, D.; Navascues, E.; Calderon, F.; Benito, A.; Rauhut, D.; Santos, A.; *et al.* (2019). Effects on varietal aromas during wine making: A review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 103, 7425–7450.
74. Whitener, M.B.; Stanstrup, J.; Carlin, S.; Divol, B.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. (2017). Effect of non-Saccharomyces yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 23, 179–192.
75. Escribano, R.; González-Arenzana, L.; Garijo, P.; Berlanas, C.; López-Alfaro, I.; López, R.; Gutiérrez, A.R.; Santamaría, (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-Saccharomyces yeasts. *J. Food Sci. Technol.*, 54, 1555–1564.

76. Landete, J.; Ferrer, S.; Pardo, I. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, 18, 1569–1574.
77. Capece, A.; Pietrafesa, R.; Siesto, G.; Romano, (2020). Biotechnological Approach Based on Selected *Saccharomyces cerevisiae* Starters for Reducing the Use of Sulfur Dioxide in Wine. *Microorganisms*, 8, 738.
78. Labbani, F.-Z.K.; Turchetti, B.; Bennamoun, L.; Dakhmouche, S.; Roberti, R.; Corazzi, L.; Meraihi, Z.; Buzzini, (2015). A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: Purification and characterization of its in vitro activity against food and beverage spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 961–970.
79. Benito, S.; Morata, A.; Palomero, F.; González, M.; Suárez-Lepe, J. (2011). Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chem.*, 124, 15–23.
80. Domizio, P.; Liu, Y.; Bisson, L.; Barile, D. (2017). Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by *Schizosaccharomyces pombe* and *S. japonicus*: Quantification and characterization. *Food Microbiol.*, 61, 136–149.
81. Benito, A.; Calderon, F.; Benito, S. (2016). Combined Use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in Winemaking. Beneficial Effects Determined Through the Study of Wines' Analytical Characteristics. *Molecules*, 21, 1744.
82. El Darra, N.E., Grimi, N., Maroun, R.G., Louka, N., Vorobiev, E. (2013a). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research and Technology*, 236, 47–56.
83. Ševcech, J., Vicenová, L., Furdíková, K., Malík, F. (2015). Influence of thermal treatment on polyphenol extraction of wine cv. André. *Czech Journal of Food Science*, 33, 91–96.
84. Ševcech, J., Vicenová, L., Furdíková, K., Malík, F. (2015). Influence of thermal treatment on polyphenol extraction of wine cv. André. *Czech Journal of Food Science*, 33, 91–96.
85. Briones-Labarca, V., Perez-Wom, M., Habib, G., Giovagnoli-Vicuña, C., Cañas-Sarazua, R., Tabilo-Munizaga, G., Salazar, F.N. (2017). Oenological and Quality Characteristic on Young White Wines (Sauvignon Blanc): Effects of High Hydrostatic Pressure Processing. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-12.
86. Buzrul, S. (2012). High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 1–12.
87. Bermúdez-Aguirre, D., Barbosa-Cánovas, G.V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed

- and continuous thermo-sonication treatment. *Journal of Food Engineering*, 108, 383-392.
88. Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., Bates, D. (2008). High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol. Lett.*, 30, 1–6.
 89. Gracin, L., Jambrak, A.R., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., Smoljanić, G. (2016). Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics*, 103, 143–147.
 90. Pala, Ç.U., Toklucu, A.K. (2013). Effects of UV-C light processing on some quality characteristics of grape juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 719-725.
 91. Fredericks, I.N., Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, 28(3), 510–517.
 92. Abca, E.E., Evrendilek, G.A. (2015). Processing of red wine by pulsed electric fields with respect to quality parameters. *J. Food Process. Preserv.* 39, 758–767.
 93. Puertolas, E., Saldana, G., Alvarez, I., Raso, J. (2011). Experimental design approach for the evaluation of anthocyanin content of rose wines obtained by pulsed electric fields. Influence of temperature and time of maceration. *Food Chemistry*, 126, 1482–1487
 94. Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Ranalli, G. (2006). Scaling-up in industrial winemaking using low electric current as an alternative to sulfur dioxide addition. *J. Appl. Microbiol.*, 101(3), 682–690.
 95. Lustrato, G., Vigentini, I., Leonardis, A. De, Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., Ranalli, G. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts *Dekkera bruxellensis* using low electric current treatment (LEC). *J. Appl. Microbiol.*, 109, 594–604.
 96. Olteanu, I., Cichi, Daniela, Dolores, Costea, D.C., Mărăcineanu, L.C. (2002). *Viticultura specială. Zonare, Ampelografie, Tehnologii specifice*. Editura Universitaria, Craiova.
 97. Bucur, G.M. (2011). *Viticultură*. University of Agronomical Sciences and Veterinary Medicine București.
 98. Slave, Camelia. The wine road in Vrancea County. 5th International Scientific Conference EMAN 2021– Economics & Management: How to Cope with Disrupted Times, CONFERENCE PROCEEDINGS, Online/virtual, March 18, 2021.
 99. Focea, M.C., Niculaua, M., Macovicuic, S., Colibaba, Lucia Cintia, Hamburdă, Silvia Brîndușa, Cotea, V.V. (2015). Junimea vinului iași – a local group of oenological initiative and promotion. *Lucrări științifice Seria Horticultură*, vol. 58(2), U.S.A.M.V. IAȘI.

100. Popescu, C.F., Maul, E., Dejeu, L.C., Dinu, D., Gheorge, R.N., Laucou, V., Lacombe, T., Migliaro, D., Crespan, M. (2017). Identification and characterization of Romanian grapevine genetic resources. *Vitis*, 56, 173–180.
101. Antocea, Arina Oana, & Cojocaru, George Adrian. (2021). Evaluation by Flash GC Electronic Nose of the Effect of Combinations of Yeasts and Nutrients on the Aromatic Profiles of Feteasca Regala Wines after Two Years of Storage. *Fermentation*, 7(4), 223.
102. Popa, A., Tutulescu, F.D. (2010). Oenoclimate assets of viticultural regions and centers in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 202-208.
103. Ghiță, A.G., Dobrei, A., Mălăescu, M., Drăgunescu, A., Poiană, M. (2013). Research on the suitability of Fetească Regală variety for making sparkling wine, under the conditions in Buziaș-Silagiu viticultural area. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 17(1), 112-116.
104. Vișan, Luminița, Dobrinou, Ricuta, & Dumbrava, Marin. (2012). Study of chemical and aromatic composition in a Romanian wine Cabernet Sauvignon. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(1).
105. Popescu, Raluca, Costinel, Diana, Ionete, Roxana Elena, Stegarus, Diana Ionela, Marinescu, Adrian Cornelius, Tudorache, Aurelia. (2014). Aroma Profile of Young Wines from Ten Native and Foreign Varieties Grown in Romania. *Rev. Chim. (Bucharest)*, 65(2).
106. Chr. Hansen. (2019). Frootzen Product Cards. Retrieved from <https://www.chr-hansen.com/en/food-cultures-and-enzymes/fermented-beverages/cards/product-cards/frootzen>. (Accessed August 2019).
107. Novozymes. (2019). Vinozym FCE-G. Retrieved from <https://www.novozymes.com/en/products/wine/maceration/vinozym-fce-g>. (Accessed August 15, 2019).
108. Martin Vialatte. (2019). Nutricell Start. Retrieved from <https://www.martinvialatte.com/en/product/nutricell-start/>. (Accessed July 2019).
109. Martin Vialatte. (2020). Nutricell Initial. Retrieved from <https://www.martinvialatte.com/en/product/nutricell-initial/>. (Accessed August 2020).
110. Renaissance Yeast. (2019). Bella. Retrieved from <https://renaissanceyeast.com/en/products/bella/>. (Accessed May 2019).
111. Renaissance Yeast. (2019). Vivace-1. Retrieved from <https://renaissanceyeast.com/en/products/vivace-1/>. (Accessed April 2019).
112. ATP Group. (2019). Querca Tan MK. Retrieved from <https://atpgroup.com/product/querca-tan-mk/>. (Accessed March 2019).
113. Cotea, V.V., Cotea, V.D., & Zanoaga, C. (2015). *Tratat de oenochimie*, vol. I + II. Editura Academiei Române.

114. Lamothe-Abiet. (2020). Optiesters. Retrieved from <https://lamothe-abiet.com/en/nutrients/optiesters/>. (Accessed June 2020).
115. Enartis. (2020). Incanto Toffee Chips. Retrieved from <https://www.enartis.com/en/products/wine/oak-alternatives/chips-en/incanto-toffee/>. (Accessed March 2020).
116. Laffort. (2019). Produit de Levure. Retrieved from <https://laffort.com/gammes/produit-de-levure/>. (Accessed March 2019).
117. Enartis. (2020). EnartisTan Blanc. Retrieved from <https://www.enartis.com/en/products/wine/tannins/gallic-tannins/enartistan-blanc/>. (Accessed August 2020).
118. Max F. Keller GmbH. (2020). Produkte. Retrieved from <https://www.keller-mannheim.de/produkte/>. (Accessed April 2020).
119. Enartis. (2020). EnartisFerm ES181. Retrieved from <https://www.enartis.com/en/products/wine/yeast/enartisferm-es181/>. (Accessed July 2020).
120. Enartis. (2020). EnartisTan FruiTan. Retrieved from <https://www.enartis.com/en/products/wine/tannins/grape-tannins/enartistan-fruitan/>. (Accessed September 2020).
121. Martin Vialatte. (2020). Viazym Aroma. Retrieved from <https://www.martinvialatte.com/en/product/viazym-aroma/>. (Accessed July 2020).
122. Martin Vialatte. (2020). Viazym Extract. Retrieved from <https://www.martinvialatte.com/en/product/viazym-extract/>. (Accessed July 2020).
123. Laffort. (2020). Tanin VR Color. Retrieved from <https://laffort.com/en/products/tanin-vr-color/>. (Accessed May 2020).
124. Laffort. (2019). Tanin VR Supra. Retrieved from <https://laffort.com/en/products/tanin-vr-supra/>. (Accessed March 2019).
125. Enartis. (2021). EnartisFerm ES-488. Retrieved from <https://www.enartis.com/en/products/wine/yeast/enartisferm-es-488/>. (Accessed December 2021).
126. Martin Vialatte. (2020). Similioak Toasted. Retrieved from <https://www.martinvialatte.com/en/product/similioak-toasted/>. (Accessed May 2020).
127. Bauer, R., Nieuwoudt, H., Bauer, F. F., Kossmann, J., Koch, K. R., & Esbensen, K. H. (2008). FTIR Spectroscopy for Grape and Wine Analysis. *Analytical Chemistry*, 80(5), 1371–1379.
128. Flanzy, C. (2003). Vinificación por maceración carbónica. În: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos (Enologie, fondements scientifiques et technologiques)*, a doua ediție. Ed. C. Flanzy (A. Madrid Vicente și Mundi-Prensa: Madrid), pp. 478–484.
129. Zamora, F., (2009). Biochemistry of Alcoholic Fermentation. În *Wine Chemistry and Biochemistry*, editat de Victoria Moreno-Arribas și M. Carmen Polo, Springer: New York, SUA, pp. 3-26.

130. Cosme, F., Vilela, A. (2021). Chitin and chitosan in the alcoholic and non-alcoholic beverage industry: An overview. *Applied Sciences*, 11, 1-18.
131. López-Rituerto, E., Avenoz, A., Busto, J.H., Peregrina, J.M. (2010). Evidence of metabolic transformations of amino acids into higher alcohols through ¹³C NMR studies of wine alcoholic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4923–4927.
132. Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2006). The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Research*, 6, 726-743.
133. García-Ruiz, A., González-Rompinelli, E.M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas M.V. (2011). Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 115-120.
134. Yıldırım, H. (2020). Alternative methods of sulfur dioxide used in wine production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9, 675-687.
135. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, A.J., Coimbra J.A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, 234, 1-12.
136. Guo, Y.Y., Yang, Y.P., Peng, Q., Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 1523-1532.
137. Stojanović, Z., Kos, J. (2020). Detection of Metabolites of Microbial Origin in Beverages with Harmful Effect on Human Health—Biogenic Amines and Mycotoxins. In *Safety Issues in Beverage Production*, editat de A. Grumezescu și A.M. Holban, Elsevier: San Diego, SUA, pp. 39-77.
138. Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199, 9-13.
139. Casas-Godoy, L., Arellano-Plaza, M., Kirchmayr, M., Barrera-Martínez, I., Gschaedler-Mathis A. (2021). Preservation of non-Saccharomyces yeasts: Current technologies and challenges. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 3464-3503.
140. Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M.J., Suárez-Lepe J.A. (2017). Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 36-43.
141. Mendes Ferreira, A., Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, 9, 1231-1250.
142. Perestrelo, R., Silva, C., Gonçalves, C., Castillo, M., Câmara J.S. (2020). An approach of the madeira wine chemistry. *Beverages*, 6, 12-28.

143. Tedesco, F., Siesto, G., Pietrafesa, R., Romano, P., Salvia, R., Scieuzo, C., Falabella, P., Capece, A. (2022). Chemical methods for microbiological control of winemaking: An overview. *Beverages*, 8, 58-80.
144. Herbert, P., Cabrita, M.J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A. (2005). Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*, 66, 315-322.
145. Henríquez-Aedo, K., Galarce-Bustos, O., Aqueveque, P., García, A., Aranda, M. (2018). Dynamic of biogenic amines and precursor amino acids during cabernet sauvignon vinification. *LWT*, 97, 238-244.
146. Esposito, F., Montuori, P., Schettino, M., Velotto, S.T., Stasi, S., Romano, R., Cirillo, T. (2019). Level of biogenic amines in red and white wines, dietary exposure and histamine-mediated symptoms upon wine ingestion. *Molecules*, 24, 3629-3642.
147. Fracassetti, D., Vigentini, I., Lo Faro, A.F.F., De Nisi, P., Foschino, R., Tirelli, A., Orioli, M., Iriti, M. (2019). Assessment of tryptophan, tryptophan ethyl ester, and melatonin derivatives in red wine by SPE-HPLC-FL and SPE-HPLC-MS methods. *Foods*, 8, 99-111.
148. Płotka-Wasyłka, J., Simeonov, V., Morrison, C., Namieśnik, J. (2018). Impact of selected parameters of the fermentation process of wine and wine itself on the biogenic amines content: Evaluation by application of chemometric tools. *Microchemical Journal*, 142, 187-194.
149. Huang, Z., Ough, C.S. (1991). Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 261-267.
150. Anlı, R.E., Bayram, M. (2009). Biogenic Amines in Wines. *Food Reviews International*, 25, 86-102.
151. Molderings, G.J., Haenisch, B. (2012). Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacology and Therapeutics*, 133, 351-365.
152. Yu, Y., Yu, Y., Xu, Z. (2021). Evaluation of nitrite, ethyl carbamate, and biogenic amines in four types of fermented vegetables. *Foods*, 10, 3150-3166.
153. Petropoulos, S., Metafa, M., Kotseridis, Y., Paraskevopoulos, I., Kallithraka, S. (2018). Amino acid content of Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L. cv.) grape cultivar grown in representative regions of Nemea. *European Food Research and Technology*, 244, 2041-2050.
154. Smit, A.Y., du Toit, W.J., du Toit, M. (2008). Biogenic amines in wine: Understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 109-127.

155. Karamanidou, A., Kallithraka, S., Hatzidimitriou, E. (2010). Fining of red wines: effects on their analytical and sensory parameters. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 45, 47–60.
156. Espinase Nandorfy, D., Watson, F., Likos, D., Siebert, T., Bindon, K., Kassara, S., Shellie, R., Keast, R., Francis, I.L. (2022). Influence of amino acids, and their interaction with volatiles and polyphenols, on the sensory properties of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 28, 621-637.
157. Smit, A.Y., Engelbrecht, L., duToit, M. (2012). Managing your wine fermentation to reduce the risk of biogenic amine formation. *Frontiers in Microbiology*, 3, 76-86.
158. Jacob, F.F., Striegel, L., Rychlik, M., Hutzler, M., Methner, F.J. (2019). Spent yeast from brewing processes: a biodiverse starting material for yeast extract production. *Fermentation*, 5, 51-69.
159. Dimopoulou, M., Troianou, V., Paramithiotis, S., Proksenia, N., Kotseridis, Y. (2022). Evaluation of malolactic starters in white and rosé winemaking of Moschofilero wines. *Applied Sciences*, 12, 5722-5736.
160. Izquierdo Cañas, P.M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., Fernández González, M., Palop Herreros, M.L.L. (2008). Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 731-735.
161. Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2012). Sparkling wines: features and trends from tradition. *Advances in Food and Nutrition Research*, 66, 1-45.
162. Paramithiotis, S., Stasinou, V., Tzamourani, A., Kotseridis, Y., Dimopoulou, M. (2022). Malolactic fermentation—theoretical advances and practical considerations. *Fermentation*, 8, 521-542.
163. Beneduce, L., Romano, A., Capozzi, V., Lucas, P., Barnavon, L., Bach, B., Vuchot, P., Grieco, F., Spano, G. (2010). Biogenic amine in wines. *Annals of Microbiology*, 60, 573–578.
164. Ayestaran, B., Acin, C., Corroza, M., Garrido, J. (1996). Changes in free amino acid concentration during stabilization and aging of wines derived from garnacha and viura musts clarified by static sedimentation. *Food Chemistry*, 7, 157-163.
165. Héberger, K., Csomós, E., Simon-Sarkadi, L. (2003). Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 8055-8060.
166. International Organisation of Vine and Wine. (2007). *Compendium of International Analysis of Methods-HPLC-Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine*. Paris, France: ISBN 978-2-85038-033-4.
167. Deshaies, S., Cazals, G., Enjalbal, C., Constantin, T., Garcia, F., Mouls, L., & Saucier, C. (2020). Red Wine Oxidation: Accelerated Ageing Tests, Possible

- Reaction Mechanisms and Application to Syrah Red Wines. *Antioxidants*, 9(8), 663-677.
168. Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1), 1-15.
169. Obreque-Slier, E., Molina-Tejada, N., Medel-Marabolí, M., & López-Solís, R. (2023). Diverse phenolic responses of six varietal wines (*Vitis vinifera* L.) throughout ageing in contact with a single type of oak barrels. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(6).
170. He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601.
171. Pervaiz, T., Songtao, J., Faghihi, F., Haider, M. S., & Fang, J. (2017). Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 5(2), 187-196.
172. Vejarano, R., & Gil-Calderón, A. (2021). Commercially Available Non-Saccharomyces Yeasts for Winemaking: Current Market, Advantages over Saccharomyces, Biocompatibility, and Safety. *Fermentation*, 7(3), 171 – 194.
173. Vejarano, R. (2020). Non-Saccharomyces in Winemaking: Source of Mannoproteins, Nitrogen, Enzymes, and Antimicrobial Compounds. *Fermentation*, 6(3), 76-94.
174. Vicente, J., Baran, Y., Navascués, E., Santos, A., Calderón, F., Marquina, D., Rauhut, D., & Benito, S. (2022). Biological management of acidity in wine industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726.
175. Vicente, J., Calderón, F., & Santos, A. (2021). High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196-1211.
176. Cotea, V. V., Zanoaga, V. C., & Cotea, V. V. (2009). *Treatise of Oenochemistry*. Bucharest, RO: The Publishing House of Romanian Academy.
177. Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H., & Ramelan, A. H. (2016). The effect of pH and color stability of anthocyanin on food colorant. *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 193, 012047.
178. Pezley, M. E. (2023). Production of Free Sulfur Dioxide by Wine Yeasts. University of Illinois at Chicago. Journal contribution.
179. Harbertson, J. F., Parpinello, G. P., Heymann, H., & Downey, M. O. (2012). Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, 131, 999–1008.
180. Keulder, D. B. (2005). The influence of commercial tannin additions on wine composition and quality. Thesis, Stellenbosch University.

181. Kahn, N., & Bertrand, A. (2005). Caractérisation des tannins de pépins de raisin: une diversité au sein des préparations commerciales. *Revue Française d'Oenologie*, 211, 6–9.
182. Obreque-Slér, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Ramírez-Escudero, C., & Zamora-Marín, F. (2009). Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology*, 229, 859–866.
183. Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67–87.
184. Manfroi, V., Rizzon, L. A., Guerra, C. C., Fialho, F. B., Dall'Agnol, I., Ferri, V. C., & Rombaldi, C. V. (2010). Influence of different doses and distinct times of application of enological tannins on the physicochemical characteristics of the Cabernet Sauvignon wine. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30, 127–135.
185. Rinaldi, A., Gambuti, A., Moine-Ledoux, V., & Moio, L. (2010). Evaluation of the astringency of commercial tannins by means of the SDS–PAGE-based method. *Food Chemistry*, 122, 951–956.
186. Callemien, D., & Collin, S. (2009). Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer – a review. *Food Reviews International*, 26, 1–84.
187. Ayala, F., Echávarri, J., & Negueruela, A. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 357–363.
188. Martínez, J., Melgosa, M., Pérez, M., Hita, E., & Negueruela, A. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.*, 7, 439–444.
189. Gambuti, A., Stollo, D., Erbaggio, A., Lecce, L., & Moio, L. (2007). Effect of winemaking practices on color indexes and selected bioactive phenolics of Aglianico wine. *J. Food Sci.*, 72, S623–S628.
190. Pelonnier-Magimel, E., Windholtz, S., Pomarède, I. M., & Barbe, J.-C. (2020). Sensory characterisation of wines without added sulfites via specific and adapted sensory profile. *OENO One*, 54, 671–685.
191. Cheynier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., & Fulcrand, H. (2006). Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 298–305.
192. Zhang, J., Barhomi, Y., & Serre, T. (2012). A New Biologically Inspired Color Image Descriptor. *European Conference on Computer Vision*, pages 312–324.
193. Byers, J. A. (2006). Analysis of Insect and Plant Colors in Digital Images Using Java Software on the Internet Analysis of Insect and Plant Colors in Digital Images Using Java. *Arthropod Biology*, 366 99(5), 865–874.

194. Phung, S. L., Bouzerdoum, A., Chai, D., & Member, S. (2005). Skin Segmentation Using Color Pixel Classification: Analysis and Comparison. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 27(1), 148–154.
195. Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 28:25–30.
196. [CRAN (2023). Linear-Plateau Model Tutorial. *soiltestcorr: An R package for Soil Test Data Visualisation and Soil Nutrient Correlation Analysis*. Available at: https://cran.r-project.org/web/packages/soiltestcorr/vignettes/linear_plateau_tutorial.html. Accessed on September 2023.]
197. Garaguso, I., & Nardini, M. (2015). Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. *Food Chemistry*, 179, 336-342.
198. Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., & Câmara, J.S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105, 204-214.
199. Fernández-Pachón, M.S., Villaño, D., García-Parrilla, M.C., & Troncoso, A.M. (2004). Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513, 113-118.
200. Gabriele, M., Gerardi, C., Lucejko, J.J., Longo, V., Pucci, L., & Domenici, V. (2009). Effects of low sulfur dioxide concentrations on bioactive compounds and antioxidant properties of Aglianico red wine. *Food Chemistry*, 115(1), 54-60.
201. Rivero-Pérez, M.D., Muñiz, P., & González-Sanjosé, M.L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant activity, scavenger capacity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5476-5483.
202. Arnous, A., Makris, D.P., & Kefalas, P. (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655-665.
203. Di Majo, D., La Guardia, M., Giammanco, S., La Neve, L., & Giammanco, M. (2008). The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chemistry*, 111, 45-49.
204. Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
205. Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). In Vitro Antibacterial Activity of Flavonoid Extracts of Two Selected Libyan Algae against Multi-Drug Resistant Bacteria Isolated from Food Products. *Food Chemistry*, 64, 555.

206. Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599.
207. Canuti, V., Piccioni, S., Giovani, G., Salmi, M., Rosi, I., & Bertuccioli, M. (2012). Effect of oenotannin addition on the composition of Sangiovese wines from grapes with different characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 220–231.
208. Tinttunen, S., & Lehtonen, P. (2001). Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. *European Food Research and Technology*, 212, 390-394.
209. Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85-118.
210. Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., & Hermosin-Gutierrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618-626.
211. Pérez-Magariño, S., & González-San José, M.L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96, 197-208.
212. Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
213. Rastija, V., Srečnik, G., & Medić-Šarić, M. (2009). Polyphenolic composition of Croatian wines with different geographical origins. *Food Chemistry*, 115, 54-60.
214. Bai, B., He, F., Yang, L., Chen, F., Reeves, M.J., & Li, J. (2013). Comparative study of phenolic compounds in Cabernet Sauvignon wines made in traditional and Ganimede fermenters. *Food Chemistry*, 141, 3984-3992.
215. Ionete, R.E., Stegarus, D.I., Geana, E.I., Botoran, O.R., Sandru, C., & Miricioiu, M.G. (2019). Characterization and classification of Romanian wines by origin. *Revista de Chimie*, 70(11), 3761-3768.
216. Rivero-Pérez MD, Muñoz P, González-SanJosé ML (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant activity, scavenger capacity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:5476-5483.
217. Raposo R., Chinnici F., Ruiz-Moreno M.J., Puertas B., Cuevas F.J., Carbú M., Guerrero R.F., Ortíz-Somovilla V., Moreno-Rojas J.M., Cantos-Villar E. (2018), Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: Impact on the wine quality. *Food Chemistry*, 243:453–460.

218. Grbin, P., Costello, P., Herderich, M., Markides, A., Henschke, P., & Lee, T. (1996). Developments in the sensory, chemical and microbiological basis of mousy taint in wine. [https:// digital. library.adelaide. edu.au/dspace /handle/ 2440 / 40834](https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/40834).
219. Ochando, T., Mouret, J.-R., Humbert-Goffard, A., Aguera, E., Sablayrolles, J.-M., & Farines, V. (2020). Comprehensive Study of the Dynamic Interaction between SO₂ and Acetaldehyde during Alcoholic Fermentation. *Food Research International*, 136, 109607.
220. Van Dijken, J.P., & Scheffers, W.A. (1986). Redox Balances in the Metabolism of Sugars by Yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1, 199–224.
221. Li, E., & Mira de Orduña, R. (2011). Evaluation of the Acetaldehyde Production and Degradation Potential of 26 Enological *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeast Strains in a Resting Cell Model System. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1391–1398.
222. Bosso, A., & Guaita, M. (2008). Study of Some Factors Involved in Ethanol Production during Alcoholic Fermentation. *European Food Research and Technology*, 227, 911–917.
223. Gomez Garcia-Carpintero, E., Sanchez-Palomo, E., & González Vinas, M.A. (2014). Volatile composition of Bobal red wines subjected to alcoholic/malolactic fermentation with oak chips. *LWT-Food Science and Technology*, 55, 586–594.
224. Julien, A., Roustan, J.L., Dulau, L., & Sablayrolles, J.M. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 215–222.
225. Lasanta, C., Roldan, A., Caro, I., Pérez, L., & Palacios, V.C. (2010). Use of lysozyme for the prevention and treatment of heterolactic fermentation in the biological aging of Sherry wines. *Food Control*, 21, 1442–1447.
226. Vashakidze, P., & Bezhuashvili, M. (2020). Higher alcohols of wine-transformation regulation of intermediate products in alcoholic fermentation. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 8(5), 455–461.
227. Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5):1115–1126.
228. Clemente-Jimenez, J.M.A.; Mingorance-Cazorla, L.; Martínez-Rodríguez, S.; Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology*, 21, 149–155.
229. Romano, P.; Fiore, C.; Paraggio, M.; Caruso, M.; Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169–180.

230. Horvat, I.; Radeka, S.; Plavša, T.; Lukić, I. (2019). Bentonite fining during fermentation reduces the dosage required and exhibits significant side effects on phenols, free and bound aromas, and sensory quality of white wine. *Food Chemistry*, 285, 305–315.
231. Parker, M.; Capone, D.L.; Francis, I.L.; Herderich, M.J. (2018). Aroma Precursors in Grapes and Wine: Flavor Release during Wine Production and Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 2281–2286.
232. Mylona, A.E.; Fresno, J.M.D.; Palomero, F.; Loira, I.; Bañuelos, M.A.; Morata, A.; Calderón, F.; Benito, S.; Suárez-Lepe, J.A. (2016). Use of *Schizosaccharomyces* strains for Wine Fermentation—Effect on the Wine Composition and Food Safety. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 63–72.
233. Claus, H., Mojsov, K. (2018). Enzymes for Wine Fermentation: Current and Perspective Applications, *Fermentation*, 4(3), 52;
234. Lasik-Kurdyś, M., Majcher, M., Nowak, J. (2018). Effects of Different Techniques of Malolactic Fermentation Induction on Diacetyl Metabolism and Biosynthesis of Selected Aromatic Esters in Cool Climate Grape Wines, *Molecules*, 23, 2549.
235. Benito, Á., Palomero, F., Calderón, F., Benito, S. (2015). Quality and Composition of Airen Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 542, 135–144.
236. Martínez-Pérez, M.P., Bautista-Ortín, A.B., Pérez-Porras, P., Jurado, R., Gómez-Plaza, E. (2020). A new approach to the reduction of alcohol content in red wines: the use of high-power ultrasounds. *Foods*, 9(6), 726-743
237. Sims, C. A., Lee, C. Y., & Morris, E. R. (1988). Extraction and characterization of pectic substances from the pulp of grape berries. *Carbohydrate Research*, 182(1), 63-78.
238. Zhang, S.; Petersen, M.A.; Liu, J.; Toldam-Andersen, T.B.; Ebeler, S.E.; Hopfer, H. (2015). Influence of pre-fermentation treatments on wine volatile and sensory profile of the new disease tolerant cultivar solaris. *Molecules*, 20, 21609–21625
239. Hernandez Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891–2899.
240. Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 184–189.

241. Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. (2016). Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.
242. Yajie Yin, Xinglin Han, Yifan Lu, Jinshan Li, Zongjie Zhang, Xian Xia, Shumiao Zhao, Yunxiang Liang, Baoguo Sun, and Yuanliang Hu. (2021). Control of N-Propanol Production in Simulated Liquid State Fermentation of Chinese Baijiu by Response Surface Methodology. *Fermentation*, 7(2), 85.
243. Lin, J., Massonnet, M., Cantu, D. (2019). The genetic basis of grape and wine aroma. *Horticulture Research*, 6, 1–24.
244. Ozturk, B., Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web Conference*, 3, 02012.
245. Hernandez Orte, P., Cacho, J., & Ferreira, V. (2002). Relationship between varietal amino acid profile of grapes and wine aromatic composition. Experiments with model solutions and chemometric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2891–2899.
246. Blateyron, L., & Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: Statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91, 184–189.
247. Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. (2016). Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.
248. Yin, Y., Han, X., Lu, Y., Li, J., Zhang, Z., Xia, X., Zhao, S., Liang, Y., Sun, B., & Hu, Y. (2021). Control of N-Propanol Production in Simulated Liquid State Fermentation of Chinese Baijiu by Response Surface Methodology. *Fermentation*, 7(2), 85.
249. Martínez-García, R., García-Martínez, T., Puig-Pujol, A., Carlos, J., & Moreno, J. (2017). Changes in sparkling wine aroma during the second fermentation under CO₂ pressure in sealed bottle. *Food Chemistry*, 237, 1030–1040.
250. Lin, J., Massonnet, M., & Cantu, D. (2019). The genetic basis of grape and wine aroma. *Horticulture Research*, 6, 1–24.
251. Ozturk, B., & Anli, E. (2014). Different techniques for reducing alcohol levels in wine: A review. *BIO Web Conference*, 3, 02012.
252. Uysal, S., Cvetanović, A., Zengin, G., Đurović, S., & Aktumsek, A. (2017). Optimization of the extraction process of antioxidants from loquat leaves using response surface methodology. *Journal of Food Process and Preservation*, 41, e13185.
253. Chen, K., Han, S.Y., Li, M., Sheng, W.J. (2016). Use of lysozyme and oligomeric proanthocyanidin to reduce sulfur dioxide and the evolution of volatile

- compounds in italian riesling ice wine during aging process. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), 1-13.
254. Sonni, F., Bastante, M.J.C., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: Influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 688–696.
255. Li, L., Li, Z., Wei, Z., Yud, W., Cui, Y. (2020). Effect of tannin addition on chromatic characteristics, sensory qualities and antioxidant activities of red wines. *RSC Advances*, 10, 7108.
256. Ferreira, A.C.S., De Pinho, P.G., Rodrigues, P., Hogg, T. (2002). Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (21), 5919–5924.
257. Ruiz-Perez, P., Izquierdo Canas, P.M., Sesena Prieto, S., Garcia Romero, E., Palop Herreros, M.I.I. (2012). Malolactic fermentation and secondary metabolite production by *Oenococcus oeni* strains in low pH wines. *Journal of Food Science*, 77, 579–585.
258. Lloret, A., Boido, E., Lorenzo, D., Medina, K., Carrau, F., Dellacassa, E. (2002). Aroma variation in Tannat wines: Effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution. *Italian Journal of Food Science*, 14, 175–180.
259. Sánchez-Palomo, E., Alonso-Villegas, R., González-Viñas, M.A. (2015). Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of la Mancha Verdejo white wines. *Food Chemistry*, 173, 1195–120

LISTA FIGURILOR

LIST OF FIGURES

- Figura 2.1. Diagrama principalelor procese metabolice în condiții de fermentație la P. kluyveri..... 51
- Figura 5.2. Schemele tehnologice pentru vinurile Fetească regală frizzante a) Fetească regală frizzante fără adaos de dioxid de sulf (FRF0); b) Fetească regală Frizzante cu adaos de dioxid de sulf (FRF1). 81
- Figura 5.3. Schemele tehnologice pentru vinurile Cabernet Sauvignon roze a) Cabernet Sauvignon roze fără adaos de dioxid de sulf (CSR0); b) Cabernet Sauvignon roze cu adaos de dioxid de sulf (CSR1). 82
- Figura 5.4. Schemele tehnologice pentru vinurile Cabernet Sauvignon: a) Cabernet Sauvignon fără adaos de dioxid de sulf (CS0); b) Cabernet Sauvignon cu adaos de dioxid de sulf (CS1). 83
- Figura 6.1. Evoluția parametrilor fizico-chimici pe perioada fermentației alcoolice/malolactice. 92
- Figura 7.1. Soluție standard 20 mg/L (distribuția aminelor biogene și a aminoacizilor în cadrul metodei de determinare). 103
- Figura 7.2. Coeficienții de corelație pentru multiple evaluări ale evoluției continue a concentrațiilor de amine biogene (BAs) în raport cu aminoacizii corespunzători (AAs). (a) CS, Pres: -SO₂ GLU:SPD: $r = -0.99$; $p < 0.05$; (b) FRF, Pres: +SO₂ ARG:SPD: $r = 0.98$; $p < 0.05$; (c) CSR, Pres: -SO₂ PUT:GLU: $r = -0.95$; $p < 0.05$; (d) CSR, Pres: -SO₂ PUT:SPD: $r = -0.96$; $p < 0.05$ 108
- Figura 7.3. Raportul concentrațiilor (mg/L) pentru AA în vinurile brute (RW) și în vinurile stabilizate (RS). 109
- Figura 7.4. Analiza componentelor principale. (a) Corelația dintre variabile și componentele principale (PC) PC1 (26,1%) vs. PC2 (17,1%). (b) Biplot al distribuției eșantioanelor pe harta factorilor de variație. 111
- Figura 7.5. Mecanismul propus de decarboxilare și dezaminare pentru a converti aminoacizii în amine biogene. 113
- Figura 8.1. Distribuția antocianilor în cadrul metodei de determinare cromatografică utilizând detecția la lungimea de undă de 515 nm (a) – Cy3gl ($T_r = 2.261$); (b) – Dp ($T_r = 2.714$), (c) – Po3gl ($T_r = 3.321$), Mv3gl ($T_r = 3.739$); (d) – Pt ($T_r = 4.260$); (e) – Pg ($T_r = 4.640$); (f) – Mv ($T_r = 5.777$)..... 121
- Figura 8.2. a) Evoluția concentrațiilor de antociani pe perioada de monitorizare (2018 – 2021) pentru Cabernet Sauvignon Roze..... 127
- Figura 8.2. b) Evoluția concentrațiilor de antociani pe perioada de monitorizare (2018 – 2021) pentru Cabernet Sauvignon. 127

Figura 8.3. (a) Distribuția analizei discriminante conform LD1 (98.02%) și LD2 (1.77%) (b) Distribuție conform LD2 (1.77%) și LD3 (0.2%) și respective (c) LD2 (1.77%) și LD3 (0.2%) prezentate pentru categoriile de vinuri realizate prin diferite tehnologii de vinificație, respectiv utilizând amestecuri de antioxidanți.	133
Figura 9.1. Distribuția valorilor CIELab pentru vinurile incluse în studiu a) parametri categoriali (tehnologia aplicată +SO ₂ /-SO ₂); b) Varietate vin; c) perioadă de maturare.	136
Figura 9.2. Variația pentru cromaticitate a* în cazul probelor studiate pe parcursul intervalului de maturare. a) monitorizare CS și CSR; b) monitorizare FR și FRF.	137
Figura 9.3. Evaluări diferențelor de culoare în cazul probelor CS, CSR, FR și FRF vinificate pe baza celor două tehnologii de vinificație +SO ₂ /-SO ₂ precum și pe baza perioadei de monitorizare.	141
Figura 9.4. Determinarea răspunsului liniar probe CS018 . Proba CS018-1 corespunde diluției raport 1/250, CS018-2 diluție 1/100 și respectiv CS018-3 corespunde diluției 1/50. CS018 – dependența liniară a valorilor determinate pentru model raspuns liniar – platou în funcție de diluție.	145
Figura 9.5. Liniaritate probe (+)-catechină (μg/mL).	152
Figura 9.6. Matricea de corelație pentru relația interdependentă dintre conținuturile de compuși fenolici (IFC), flavone, taninuri și activitate anti-radicalică, în raport cu perioada de stabilitate a probelor, dozele de antioxidanți, pe fiecare veritate de vin și pe fiecare tip conform metodei de vinificație.	159
Figura 10.1. Cromatograma pentru FRF118 (S4) (Tr (minute) – Timp de retenție) (ACTAL (acetaldehidă) – (Tr – 3.86); ETA (acetat de etil)– (Tr – 7.35); MEOH (metanol)– (Tr – 7.87); 1PROH (n-propanol) – (Tr – 14.24); 2M-1PROH (isobutanol) – (Tr – 17.45); ISA (acetat de isoamil)– (Tr – 18.71); 1BTOH (n-butanol) – (Tr – 20.36); ETL (lactat de etil) – (Tr – 33.27).	162
Figura 10.3. Distribuția concentrațiilor de acetaldehidă (ACTAL) în funcție de perioada de maturare a vinurilor.	167
Figura 10.4. Variațiile corelate pentru acetat de etil (ETA), lactat de etil (ETL) și acetat de izoamil (ISA) în funcție de variația de pH.	172
Figura 10.5. Variațiile corelate pentru 1- propanol (1PROH) în funcție de variațiile concentrațiilor de l-treonină.	175
Figura 10.6. Analiza componentelor principale pentru evaluarea variațiilor multe în funcție de contribuția factorilor principali și complementari de grupare.	177

Figura 11.1. Graficele hărților radar corespunzătoare rezultatelor analizelor senzoriale pentru vinurile incluse în studiu. 181

LISTA TABELELOR

LIST OF TABLES

Tabel 1.1	Proporțiile dintre conținutul de SO ₂ liber și bisulfid HSO ₃ ⁻ la diverse valori de pH.....	30
Tabel 1.2.	Valori pentru constanta pK ₁ pentru SO ₂ în funcție de tăria alcoolică și temperatură.	30
Tabel 1.3.	Concentrații ale SO ₂ liber necesare în vinuri pentru a menține activitatea antiseptică egală cu 2 mg/L SO ₂ activ.	34
Tabel 1.4.	Protecția culorii vinului roșu vinificat din struguri botirizați prin sulfitare (Sudraud, 1985).....	37
Tabel 1.5.	Reglementări OIV și ale Uniunii Europene pentru limite pentru SO ₂ în vinuri convenționale.....	40
Tabel 1.6.	Compuși de alterare a vinului ca urmare a metabolismului bacterian în timpul vinificației (*LAB, bacterii lactice; include specii din Lactobacillus, Oenococcus și Pediococcus).....	42
Tabel 2.1.	Contribuția extractelor de plante naturale la calitatea vinurilor convenționale și activitățile lor antimicrobiene și antioxidante.	47
Tabel 2.2.	Principali compuși de aromă influențați de P. kluyveri, descriptorul aromatic și pragul de percepție.	55
Tabel 5.1.	Codificarea probelor incluse în studiu	79
Figura 5.1.	Schemele tehnologice pentru vinurile Fetească regală liniștit a) Fetească regală fără adaos de dioxid de sulf (FR0); b) Fetească regală cu adaos de dioxid de sulf (FR1).	80
Tabel 6.1.	Parametrii de calibrare pentru sistemul de analiza parametri de calitate vinuri.	85
Tabel 6.2.	Parametrii de calitate pentru varietatea Fetească regală (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire – deburbare - flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – intervenție pe perioada de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbuteliere; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT - aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L).	93
Tabel 6.3.	Parametrii de calitate pentru varietatea Fetească regală frizzante (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire – deburbare - flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – finalizare etapă de fermentație; A3 –	

tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – transfer pentru fermentație secundară; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT - aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L). 94

Tabel 6.4. Parametrii de calitate pentru varietatea Cabernet Sauvignon roze (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire – deburbare - flotație must; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – finalizare etapă de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbuteliere; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT - aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L). 95

Tabel 6.5. Parametrii de calitate pentru varietatea Cabernet Sauvignon (Act. – denumire activitate la care s-a efectuat evaluarea parametrilor fizico-chimici: A1 – zdrobire - inițiere etapă de macerație; A2-1 – Fermentație alcoolică / malolactică; A2-2 – transfer în altă cisternă după presare; finalizare etapă de fermentație; A3 – tratament după fermentație (antioxidant, corecție de aciditate, stabilizare tartrică) A4 – filtrare îmbuteliere; zile – numărul de zile înregistrate între etapele esențiale specificate; TA – tărie alcoolică (vol%); AT - aciditate totală (g/L (acid tartric)); AV – aciditate volatilă (g/L (acid acetic)); ZR – zaharuri reducătoare (g/L); D - densitate specifică (g/mL); ES - Extract sec nereducător (g/L). 96

Tabel 7.1. Condiții de spectrometrie de masă pentru determinarea aminoacizilor și aminelor biogene. Ion molecular $[M+H]^+$ (m/z), $[M-N]^+$ fragment caracteristic (m/z), energia de coliziune optimizată CE (V) în Q2. 100

Tabel 7.2. Distribuția aminelor biogene și a aminoacizilor pe durata cromatogramei în condițiile de eluție (compus, calibrare- curba de calibrare si coeficient de corelație, conținut regăsit in probe fortificate; DIFF-eroare procentuală; TR- timp de retenție). 101

Tabel 7.3. Distribuția aminelor biogenice și aminoacizilor în funcție de tip de vin (CS,CSR, FR și FRF) în funcție de tratament cu dioxid de sulf (T – tip de fermentație; V – varietate de vin). 104

Tabel 7.4. Valorile medii pentru aminele biogene și aminoacizii în funcție de variația în timpul perioadei de maturare a vinului. 106

Tabel 7.5. Valorile medii pentru aminele biogene și aminoacizii în funcție de variația în timpul perioadei de învechire a vinului (* $p < 0.05$).....	107
Tabel 7.6. Valori medii pentru AT - aciditate totală (g acid tartric/L), TA – conținut de alcool (g/L), VA – aciditate volatilă (g acid acetic/L), SO ₂ liber – conținut de dioxid de sulf liber (mg /L); SO ₂ total - conținut de dioxid de sulf total (mg/L); RS – zahăr rezidual (g/L).	110
Tabel 8.1. Parametri metoda cromatografică pentru determinarea antocianilor la lungimea de 515 nm.....	119
Tabel 8.2. Parametrii de validare parțială ai metodei de determinare. L1 – concentrația maximă din domeniul de liniaritate (mg/L); L2 - Concentrație minimă (mg/L), L3 – panta curbei de calibrare; L4 – Interceptul curbelor de calibrare; L5 – coeficient de corelație pentru variația liniară; L6 - grad de recuperare (%); L7 – deviația standard relativă pentru probele în triplicat efectuate la exactitatea metodei; L8 – Eroarea standard a pantei; L9 - Limita minimă de cuantificare (mg/L); L10 - limita minimă de cuantificare (mmol); L11 – limita minimă de identificare (mg/L); L12 - limita minimă de identificare (mmol).	120
Tabel 8.3. Nivele de antociani pentru probele Cabernet Sauvignon (CS) (#1' – CS018, #2' – CS019, #3' – CS020, #4' – CS021, #5' – CS118, #6' – CS119, #7' – CS120, #8' – CS121; Av – average value, St- standard deviation).	123
Tabel 8.4. Nivele de antociani pentru probele Cabernet Sauvignon roz CSR (#1 – CSR018, #2 – CSR019, #3 – CSR020, #4– CSR021, #5 – CSR118, #6 – CSR119, #7 – CSR120, #8 – CSR121; Av (CSR0 and CSR1)– valoare medie, St- deviație standard).....	124
Tabel 8.5. Tipuri de taninuri și concentrații utilizate în metodele de vinificație pentru vinurile Cabernet Sauvignon CS1-CS0 și Cabernet Sauvignon Roze CSR1-CSR0.	128
Tabel 8.6. Valorile coeficienților de corelație stabiliți între variabilele continue în cadrul fiecărui grup Varietate CSR (superior) și Varietate CS (inferior) Corelațiile marcate sunt semnificative pentru $p < 0.05$	129
Tabel 8.7. Contribuția fiecărui compus de tip antocian la diferențierea claselor incluse în analiza discriminantă.	131
Tabel 9.1. Valori ale analizelor spectrofotometrice pentru vinuri experimentale cu și fără SO ₂ (evaluare pentru CS și CSR).	139
Tabel 9.1(cont). Valori ale analizelor spectrofotometrice pentru vinuri experimentale cu și fără SO ₂ (evaluare pentru FR și FRF).	140
Tabel 9.2. Valori CSTV – (valoare critică de testare) este reprezentată de momentul de timp când concentrațiile DPPH au fost considerate constante pe baza	

	valorilor pantelor 0x de tip 0x și a coeficienților de corelație (R^2). Evaluare pentru CS1 și CS0.	147
Tabel 9.3.	Valorile IC50 pentru probele incluse în studiu (X – valoare medie, SD – deviație standard, X – valoare mediană, CI(95%) – interval de confidență (95%)).	148
Tabel 9.4.	Testul Tukey HSD; variabila IC50 Probabilități Aproximative pentru Testele Post Hoc Eroare: Între MS = 2980.4, df = 88.000.	150
Tabel 9.5	Liniaritate metodă de analiză pentru testarea flavonelor prin derivatizare cu clorură de aluminiu.	152
Tabel 9.6.	Valorile Indicelui Folin Ciocalteu (EAG mg/L), Flavonelor (ECA mg/L) și respectiv Taninuri (mg/L) pentru fiecare tip de vin, în funcție de varietate (CS, CSR, FR, FRF) și metoda de vinificație ($-SO_2$ / $+SO_2$) (valori medii / deviații standard).	153
Tabel 9.7.	Valorile medii ale compușilor fenolici (mg EAG/L) , flavone (mg EQ/L), taninuri (mg ECA/L), valori medii ale dozelor de antioxidanți (g/hL).156	
Tabel 10.1.	Nivele compuși volatili Cabernet Sauvignon, varianta $+SO_2$ (CS1) și varianta $-SO_2$ (CS0) și Cabernet Sauvignon roze, variantele $+SO_2$ (CSR1) și respectiv $-SO_2$ (CSR0).	169
Tabel 10.2.	Nivele compuși volatili Fetească regală, FR liniștit (FR1($+SO_2$)/FR0($-SO_2$)) și Fetească regală Frizzante (FRF1 ($+SO_2$)/FRF0($-SO_2$)).	171
Tabel 11.1.	Codificarea probelor incluse în studiul de testare a poșilelor senzoriale.	180
Tabel 11.2.	Evaluarea parametrilor senzoriali pentru CSR (Cabernet Sauvignon Roze) și (CS) Cabernet Sauvignon	182
	* diferență statistică semnificativă ($p < 0.05$)	183
Tabel 11.3.	Evaluarea parametrilor senzoriali pentru FRF (Fetească regală Frizzante) și (FR) Fetească regală.....	183

LISTA LUCRĂRILOR LIST OF PUBLICATIONS

Lucrari BDI

Focea, M. C., Nicolaua, M., Macoviciuc, S., Colibaba, L. C., Hamburdă, S. B., & Cotea, V. V. (2015). Junimea vinului Iași – A local group of oenological initiative and promotion. *Lucrări științifice Seria Horticultură*, 58(2).

Macoviciuc, S., Nechita, C. B., Cioroiu, I. B., Cotea, V., & Nicolaua, M. (2022). Effect of added sulphur dioxide levels on the aroma characteristics of wines from Panciu wine region. *Știința agricolă*, 1, 73-77.

Lucrari ISI

Macoviciuc, S., Cioroiu, B.-I., Nicolaua, M., Nechita, C.-B., & Cotea, V. V. (2023). Anthocyanins levels modification on wines without sulfur dioxide: New perspective. *Scientific Papers. Series B. Horticulture*, 67(2), 249-254.

Macoviciuc, S., Nicolaua, M., Nechita, C.-B., Cioroiu, B.-I., & Cotea, V. V. (2024). The correlation between amino acids and biogenic amines in wines without added sulfur dioxide. *Fermentation*, 10(6), 302-322.