

**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI MEDICINĂ  
VETERINARĂ CLUJ-NAPOCA  
ȘCOALA DOCTORALĂ DE ȘTIINȚE AGRICOLE INGINEREȘTI  
DOMENIUL BIOTEHNOLOGII**

**Rezumat al tezei de doctorat**

**Identificarea și cuantificarea unor „markeri” de aromă din  
vin**

**PROF. LUMINIȚA-ADRIANA POP(VÂRVA)**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:  
Prof. univ. dr. MARIA TOFANĂ**

**Cluj-Napoca**

**2015**

## CUPRINS:

INTRODUCERE .....	2
SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....	3
STRUCTURA TEZEI.....	4
MATERIAL BIOLOGIC ȘI DESIGN EXPERIMENTAL .....	5
DETERMINAREA CLASELOR DE COMPUȘI VOLATILI DE AROMĂ .....	6
IDENTIFICAREA UNOR MARKERI VOLATILI DE AUTENTIFICARE PENTRU CELE TREI SORTIMENTE DE VINURI AUTENTICE: SAUVIGNON BLANC, TRAMINER ȘI PINOT GRI.....	12
TRASABILITATEA COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN SORTIMENTUL TRAMINER 2011 ÎN EPISCOPAL 2011 .....	12
EVALUAREA INFLUENȚEI ANULUI VITICOL ASUPRA COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN VIN .....	14
STUDIUL COMPARATIV AL COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN CUPAJUL EPISCOPAL OBȚINUT ÎN TREI ANI CONSECUTIVI 2009, 2010 ȘI 2011 .....	16
EVALUAREA STATISTICĂ A DATELOR PRIN ANALIZA COMPONENTELOR PRINCIPALE (PCA) .....	17
CONCLUZII.....	21
ELEMENTE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI .....	25
PERSPECTIVE.....	25
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ .....	26

## INTRODUCERE

Vinul reprezintă una dintre cele mai sănătoase și apreciate băuturi cu origini foarte vechi. Acesta este rezultatul împletirii tehnicii, tehnologiei și artei. De-a lungul timpului vinul a primit o notorietate extraordinară, iar cunoașterea valorii unui vin face parte din educație. Preocupările pentru o alimentație sănătoasă accentuează rolul cercetărilor științifice, a tehnologiilor moderne în obținerea unor vinuri de calitate care să asigure o serie de beneficii pentru organismul uman.

Aroma este unul dintre cei mai importanți factori legați de calitatea unui vin și pentru a caracteriza aroma, compușii volatili joacă un rol important. În vin, pot fi găsiți mai mult de 1000 de compuși volatili, dar numai, mai puțin de 10% pot contribui la aroma acestuia (Vilanova, Oliveira 2012).

Pragurile olfactive a acestor compuși pot să difere considerabil, astfel încât unii compuși prezenți în urme pot juca un rol-cheie în aroma unui vin, în timp ce alții, deși mai abundenti, pot să o facă într-o măsură mai mică. Mulți dintre compușii chimici volatili conținuți în vin pot fi utilizați ca parametri de diferențiere pentru determinarea originii vinului.

Profilul volatil a unui vin este influențat de mai mulți factori: soiul de struguri, sol, condiții climatice, procesul de vinificație, pe parcursul căruia se poate interveni în orice etapă și condițiile de păstrare a vinului.

Aceste arome sunt atribuite în cea mai mare parte unor clase de compuși ca: alcooli superiori, aldehide, esteri etilici ai acizilor grași, acizi grași, cetone, monoterpene și fenoli volatili (Andujar-Ortiz și colab., 2009).

Aroma s-a dovedit unul dintre cele mai importante atribute când este vorba de preferința consumatorului, motiv pentru care compuși volatili responsabili au fost separați și cuantificați prin tehnici moderne, HS-ITEX/GS-MS.

## SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Scopul cercetărilor efectuate în cadrul tezei de doctorat constă în evaluarea compușilor volatili de aromă din sortimente autentice de vinuri, în vederea stabilirii unor markeri de diferențiere și autentificare.

În vederea evaluării compușilor de aromă din sortimentele de vin și evidențierea celor care sunt reprezentativi în caracterizarea soiurilor și a calității vinului au fost abordate două direcții majore de cercetare:

- I. Caracterizarea cupajului Episcopal și a sortimentelor din care acesta provine sub aspectul unor parametri de calitate.
- II. Evaluarea compușilor volatili din sortimentele de vin luate în studiu și trasabilitatea lor în cupajul "Episcopal" .

Pornind de la aceste direcții principale de cercetare, au fost conturate următoarele obiective:

1. Determinarea principalilor parametri de calitate : proprietățile senzoriale și fizico-chimice.
2. Identificarea și cuantificarea zaharurilor din struguri și sortimentele de vin prin metoda HPLC.
3. Identificarea și cuantificarea compușilor de aromă din sortimentele de vin selectate, prin GC-MS, respectiv tehnica HS/ITEX/GC-MS.
4. Compararea compușilor volatili de aromă pentru sortimentele de vin care intră în cupaj pe parcursul a doi ani viticoli 2010/2011.
5. Identificarea și cuantificarea compușilor de aromă din cupajul Episcopal prin GC-MS, respectiv tehnica HS/ITEX/GC-MS.
6. Compararea compușilor volatili de aromă din cupajul Episcopal 2009, 2010, 2011.
7. Analiza statistică a datelor ce caracterizează sortimentele de vin prina analiza componentelor principale (PCA)

## STRUCTURA TEZEI

Teza este structurată în două părți principale, prima incluzând studiul de literatură, iar cea de a doua parte cercetări proprii, rezultate, discuții, concluzii și perspective.

**PARTEA ÎNTÂI: STUDIU DE LITERATURĂ**, cuprinde trei capitole:

**Capitolul I. PREZENTAREA ȘI CARACTERIZAREA VINULUI** , descrie în patru subcapitole principalele etape ale procesului de obținere a vinului, compoziția chimică a vinului, formarea, clasificarea aromelor și caracterizarea unor compuși de aroma din vin.

**Capitolul II. METODOLOGII ANALITICE UTILIZATE LA DETERMINAREA COMPUȘILOR DE AROMĂ**, cuprinde metodele fizico-chimice de analiză (cromatografia gazului), combinate cu diferite posibilități de identificare a structurii spectroscopice (cromatografia gazului-spectrometria de masă) și tehnici de extracție care oferă posibilitatea determinării de compuși aflați în concentrații foarte mici în matricea de analizat.

**Capitolul III. PREZENTAREA PODGORIEI CIUMBRUD**, descrie în patru subcapitole zona geografică din care au fost selectate vinurile, condițiile pedo-climatiche, solurile zonei de cultură , caracterizarea sortimentelor de vin luate în studiu, a condițiilor de depozitare și a posibilității de cupajare.

**PARTEA DOUA: CERCETĂRI PROPRII**, cuprinde patru capitole.

**Capitolul IV. SCOP, OBIECTIVE ȘI DESIGN EXPERIMENTAL**, cuprinde scopul și obiectivele specifice tezei, precum și prezentarea materialului experimental și a celor două protocoale de lucru aferente cercetărilor.

**Capitolul V. EVALUAREA PARAMETRILOR DE CALITATE**, prezintă în două subcapitole, determinarea parametrilor de calitate obișnuită,: analiza senzorială, fizico-chimică a sortimentelor de vin și rezultatele obținute în urma analizei acestora.

**Capitolul VI. DETERMINAREA SPECTRULUI GLUCIDIC PRIN CROMATOGRAFIE DE LICHIDE DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ (HPLC) CU DETECȚIE A INDICELUI DE REFRAȚIE (IR)**, descrie în trei subcapitole determinarea spectrului glucidic al strugurilor și sortimentelor de vin, metoda folosită fiind cea descrisă de Bonta și col.,2007.

**Capitolul VII. ANALIZA COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN VIN PRIN TEHNICA ITEX/GC-MS**, descrie pe parcursul a șase subcapitole tehnicile și rezultatele referitoare la identificarea, cuantificarea, și monitorizarea trasabilității compușilor de aromă din sortimentele de vin în cupajul Episcopal, precum și interpretarea chemometrică prin analiza componentelor principale.

**CERCETĂRI PROPRII:**

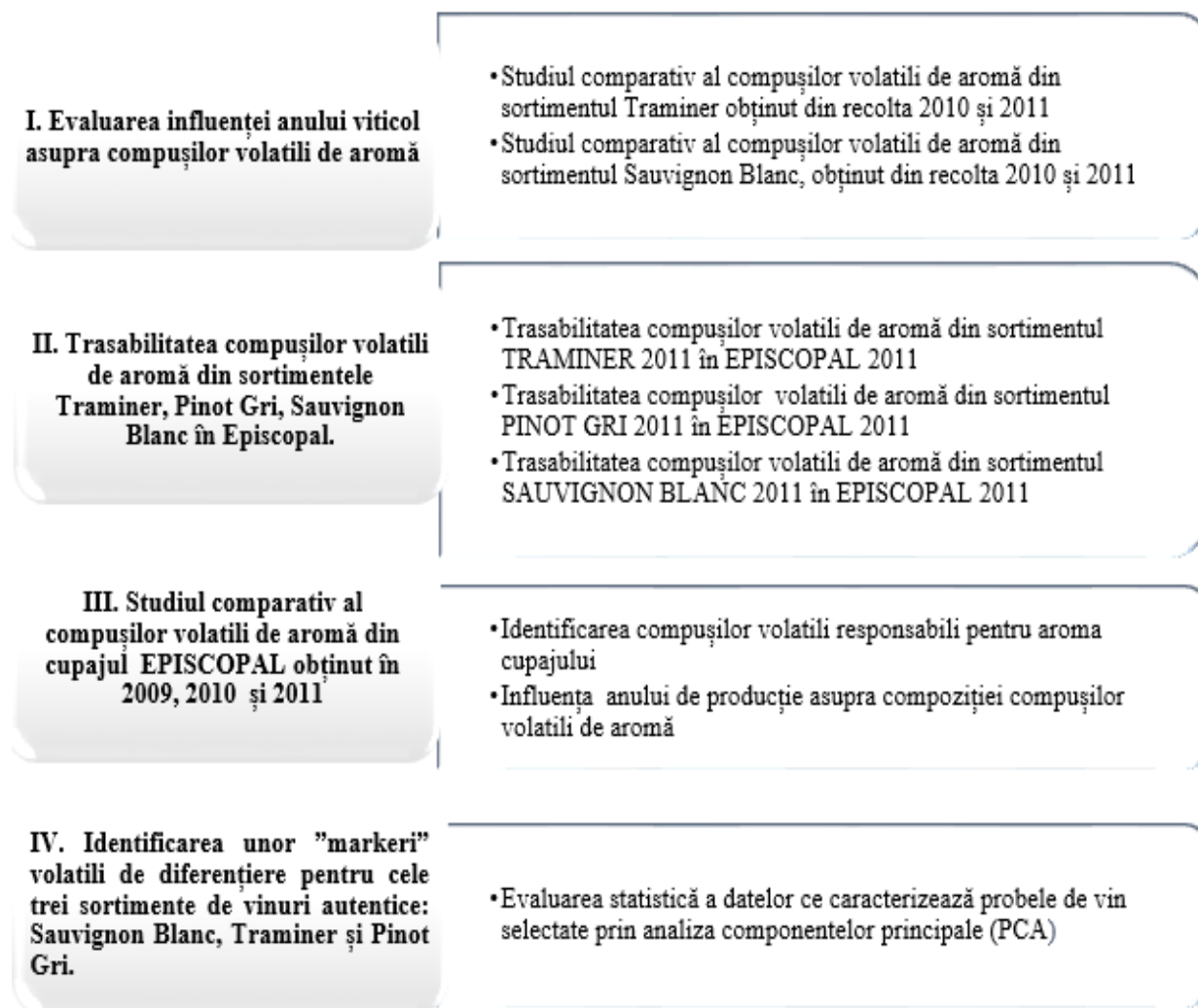
**MATERIAL BIOLOGIC ȘI DESIGN EXPERIMENTAL**

În vederea identificării unor caracteristici calitative specifice cu utilitate în autentificare, au fost caracterizate patru sortimente de vin din podgoria Ciombrud, trei autentice : Sauvignon Blanc, Traminer și Pinot Gri, iar cel de-al patrulea ”Episcopal”, fiind obținut prin cupajarea celor trei, printr-o rețetă proprie procesatorului. Acest cupaj se bucură de o deosebită apreciere din partea consumatorilor, obținând medalia de aur la ediția a VI-a a Concursului Internațional de Vinuri și Băuturi Alcoolice VinVest, în 2011.

În scopul realizării obiectivelor propuse au fost modelate două protocoale experimentale, structurate conform celor două direcții majore de cercetare.

MATERII PRIME			
ANALIZĂ SENZORIALĂ	ANALIZĂ FIZICO-CHIMICĂ	CROMATOGRAFIE LICHIDE HPLC	METODE CROMATOGRAFICE GC-MS și ITEX/GC-MS
CULOARE GUST MIROS	-CONCENTRAȚIE ALCOOLICĂ %VOL. -ACIDITATE TOTALĂ g/l acid tartric -DENSITATE RELATIVĂ g/cm <sup>3</sup> -DIOXID DE SULF mg/l	-ZAHARURI	-COMPUȘI DE AROMĂ

**Fig. 1** Protocolul experimental al cercetărilor privind caracterizarea cupajului Episcopal și a sortimentelor din care acesta provine: Sauvignon Blanc, Traminer, Pinot Gri, sub aspectul unor parametrii de calitate.



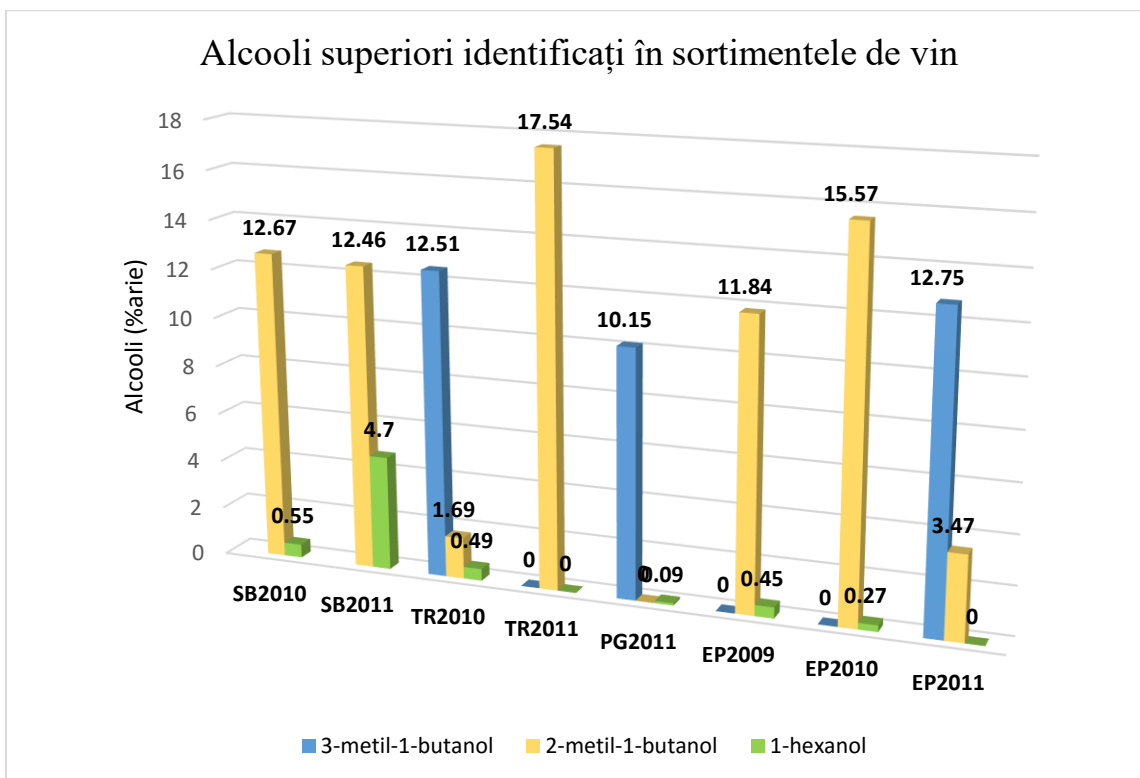
**Fig. 2** Protocolul experimental privind evaluarea compușilor volatili din sortimentelor de vin luate în studiu și trasabilitatea lor în cupajul Episcopal

## **DETERMINAREA CLASELOR DE COMPUȘI DE AROMĂ**

Cei 50 de compuși volatili de aromă separați prin tehnica HS/ITEX/GC-MS, urmărind metoda de lucru descrisă de Socaci și colab.,2014, au fost grupați pe clase de compuși și sunt raportați sub formă de procente de arie (% Arie). Reprezentativi s-au dovedit a fi: alcoolii superiori (fig.3), esterii etilici (fig.4), acetații alcoolilor superiori (fig 5), dar și compuși volatili aflați în cantități mai mici :monoterpene,norizoprenoizi, care contribuie la aroma finală.

Compușii identificați au fost în concordanță cu alte rezultate obținute în ultimii ani de diverși autori, esterii fiind prezenți în numărul cel mai mare (Welke și colab.,2012).

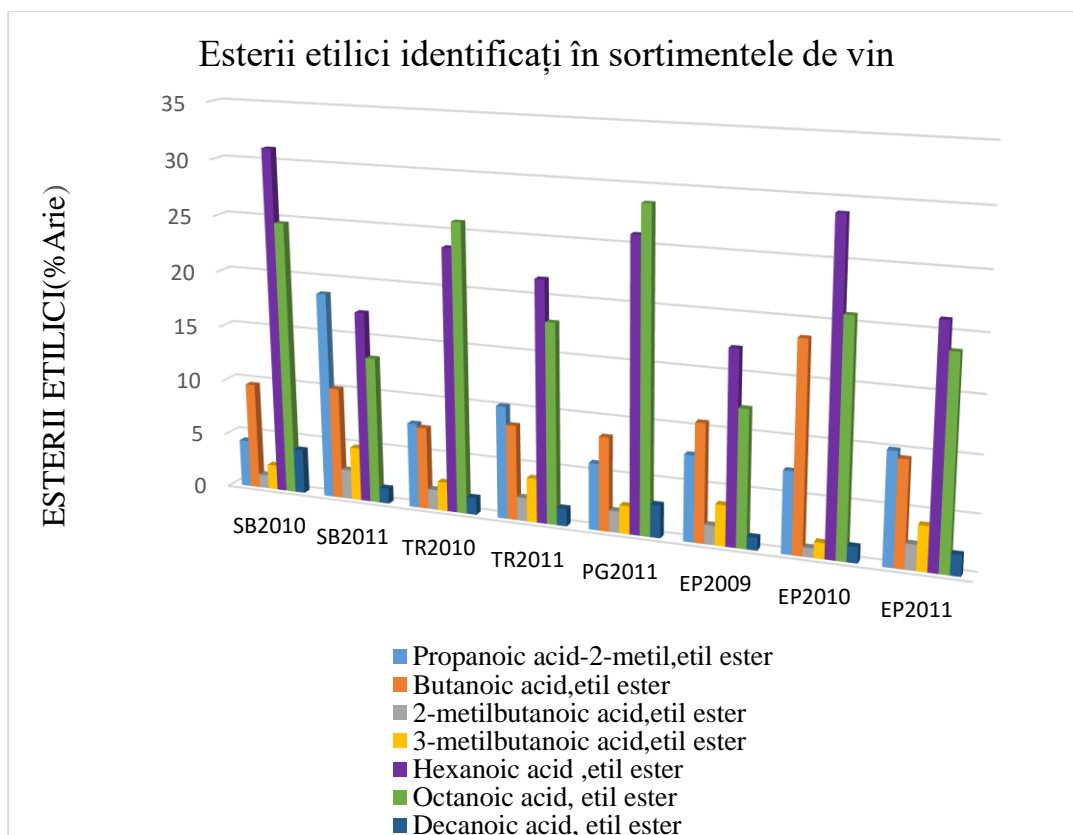
Esterii etilici și alcoolii superiori reprezintă cel mai important grup de compuși volatili, reprezentând peste 90% din fracția volatilă, în vinurile analizate, situație raportată și de alți autori (Losada și colab.,2012)



**Fig. 3** Cantitatea de alcoolii superiori determinată pentru soiurile de vin : Sauvignon Blanc, Traminer, Pinot Gri și Episcopal

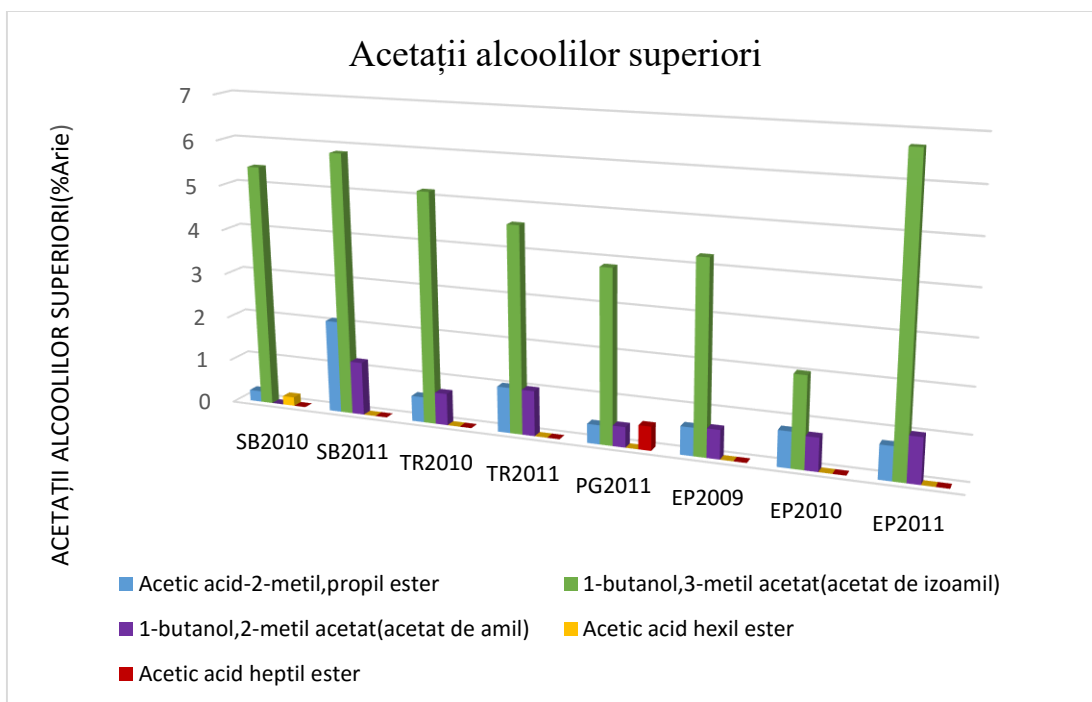
**Alcoolii superiori.** Principalii alcoolii identificați în studiu sunt: 2-metil-1-butanol (alcoolul amilic), 3-metil-1-butanol (alcoolul izoamilic) și în cantități mult mai mici în unele sortimente 1-hexanol.





**Fig. 4** Cantitatea de esteri etilici ai acizilor grași determinată pentru soiurile de vin:  
Sauvignon Blanc, Traminer, Pinot Gri și Episcopcal

**Esteri etilici.** În probele de vinuri investigate au fost identificați 11 esteri etilici dintre care 8 sunt esteri etilici ai acizilor grași, doi ai acizilor carboxilici (succinic, lactic), iar unul este esterul etilic al acidului 2,4-hexadienoic. Dintre esterii etilici ai acizilor grași cu lanț mediu ( $C_6-C_{12}$ ), au fost identificați în proporție mai mare etil hexanoatul și etil octanoatul, care au un rol important la aroma vinurilor, contribuind prin mirosul de mere verzi respectiv pere, ananas la aroma și buchetul vinului (Goméz, 2012). Nivelul esterilor a fost similar în majoritatea vinurilor investigate, fiind cel mai scăzut în Episcopcal 2009, iar cel mai ridicat nivel în Episcopcal 2010.



**Fig. 5** Cantitatea de acetați ai alcoolilor superiori determinată pentru soiurile de vin : Sauvignon Blanc, Traminer, Pinot Gri și Episcopai

**Acetații alcoolilor superiori.** În studiul de față s-au identificat cinci acetați, dintre care cel mai abundent este acetatul de izoamil cu miros puternic de banane și pere, fig. 5. Acetații de 2-metil-propil, 3-metil-butil și 2-metil-butil obținuți în cantități mai semnificative au pragurile de diferență olfactivă foarte apropiate și însumate pot depăși pragul lor de recunoștere contribuind la aroma vinului. Concentrația cea mai mare de acetați s-a înregistrat în Sauvignon Blanc din 2011, 9.15% și Episcopaiul din 2011, 8.47%.

**Esteri identificați în cantități reduse. Dietil succinatul,** rezultatul activității bacteriei lactice, proces care are loc în timpul fermentației malolactice (Tufariello, 2012) apare în cantități mai semnificative în Sauvignon Blanc și Episcopai 2010.

**2,4-hexadienoic acid etil ester**(etil sorbat) a fost identificat în cantități mai ridicate în Episcopai 2009 și în Pinot Gri 2011. Bacteriile lactice pot metaboliza acidul sorbic și produc în afară compuși aromați. Adăosul de acid sorbic are adesea ca rezultat formarea ethylsorbitului, care se spune că ar importa un miros neplăcut atunci când este prezent la un nivel semnificativ (<http://www.extension.iastate.edu/wine/antimicrobial-agents>).

**Lactatul de etil** apare în cantitate scăzută, 0,72% în Sauvignon Blanc 2010. Conform datelor de specialitate apare, de obicei, în timpul îmbătrânirii, în urma fermentației malolactice.

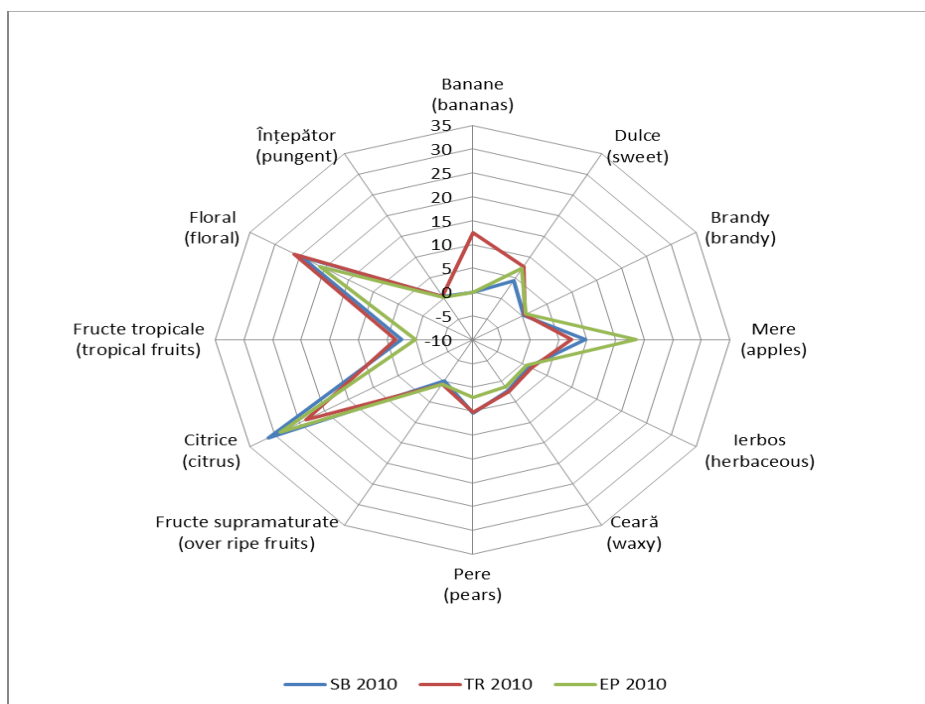
**Compuși terpenici.** Limonene, o-Cymen, 4-Carene au fost identificați în sortimentele Traminer și Episcopal.

**Norizoprenoizi**, compuși ai acizilor hidrolizați cum ar fi 1,1,6-trimetil-1,2-dyhidronaftalen și 2-Eteniltetrahydro-2,6,6-trimetil-2HPyran au fost, de asemenea, identificați în probele de vin studiate, mai puțin în Episcopal 2010, cel de-al doilea și în Pinot Gri, Episcopal 2010/2011, TDN-ul.

Aceștia sunt posibili contribuitori la calitatea vinului, menționați în studii de specialitate.

**Alte clase de compuși.** 3-Decyne și 3-Undecyne sunt prezenți în majoritatea sortimentelor mai puțin, Sauvignon Blanc, Episcopal 2010 și Pinot Gri 2011.

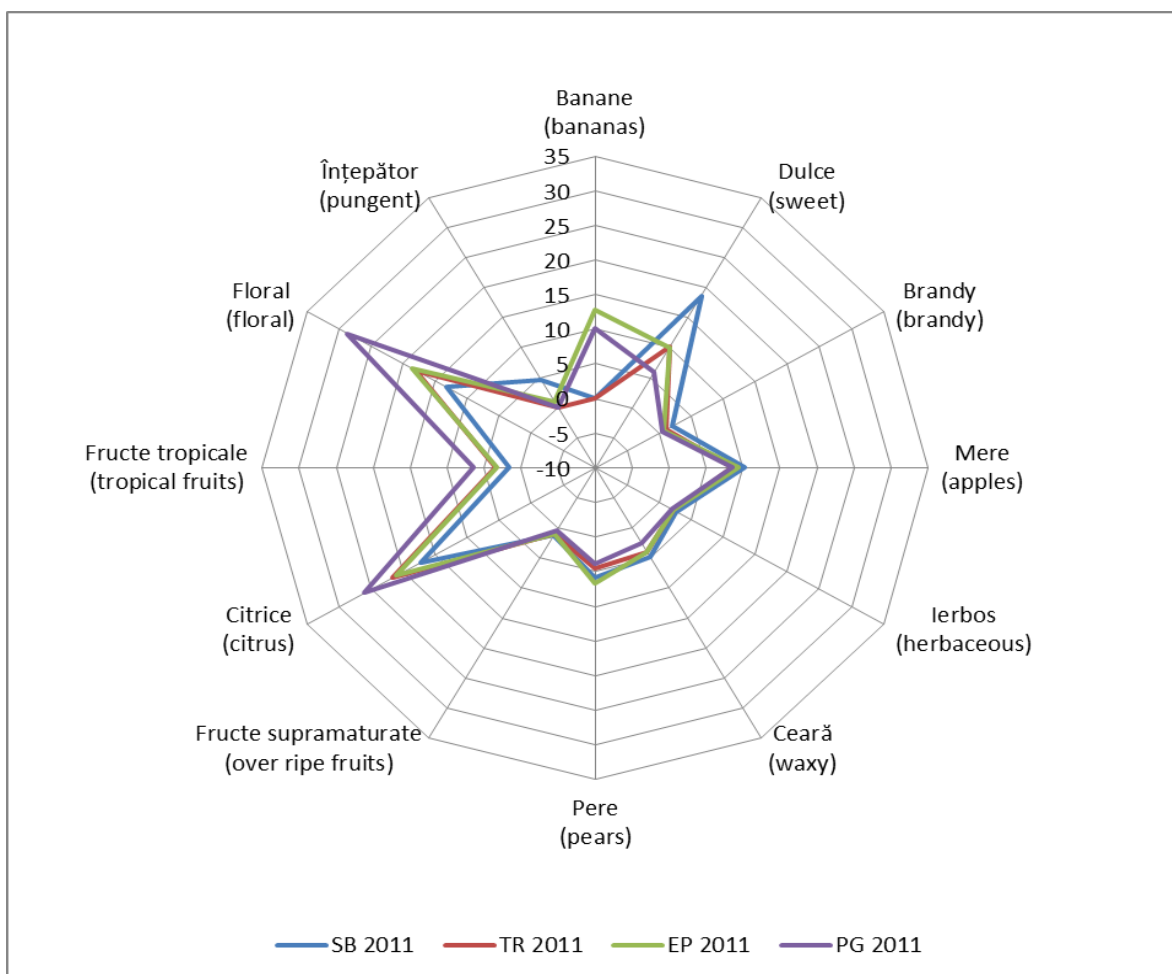
Pe baza compușilor volatili cuantificați în probele de vin analizate, s-a construit harta profilului de aroma, fig.6 și 7. Aromele percepute, asociate fiecărui compus volatil în parte au fost identificate cu ajutorul bazei de date [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com) și [www.flavornet.org](http://www.flavornet.org).



**Fig.6** Harta profilului de aromă pentru probele de vin din anul 2010

Se distinge tipicitatea soiului Traminer prin prezența alcoolului izoamilic în proporție de 12.51% și a acetatului de izoamil 5.16%.

În figura 6 este prezentat profilul de aromă al sortimentelor investigate în anul 2010. Pe o scara de 35 de puncte de aromă, se poate observa că notele dominante sunt cele florale(25 de puncte) și de citrice(30 puncte) pentru toate cele trei sortimente de vin, singurele diferențe se întâlnesc la sortimentul Traminer 2010 care are o nota destul de pregnantă de banană(12 puncte) iar Episcopal 2010 o nota particulara mai pregnantă de mere(20 puncte). Ca o nota generală, se poate afirma ca profilul de aromă al sortimentului Episcopal este mult mai echilibrat decat al celorlalte doua sortimente.



**Fig. 7** Harta profilului de aromă pentru probele de vin din anul 2011

În figura 7, este prezentat profilul de aromă al sortimentelor de vin din recolta 2011. Pe o scară de 35 de puncte de aromă, se poate observa că notele dominante sunt și în acest an cele florale (30 de puncte) și de citrice (25 puncte) pentru toate cele trei sortimente de vin. Diferențele față de anul anterior apar la sortimentul Traminer 2011 care nu mai prezintă nota de banane, respectiv Episcopul 2011, dimpotrivă, are o notă destul de pregnantă de banană (12 puncte), acesta din urmă păstrând aproape constantă nota de dulce și de mere similar anului 2010. Și în 2011, similar cu anul anterior, se poate afirma că profilul de aromă al sortimentului Episcopul este mult mai echilibrat decât al celorlalte trei sortimente ceea ce demonstrează faptul că soiul obținut prin cupajare este superior în ceea ce privește aroma față de cele din care provine.

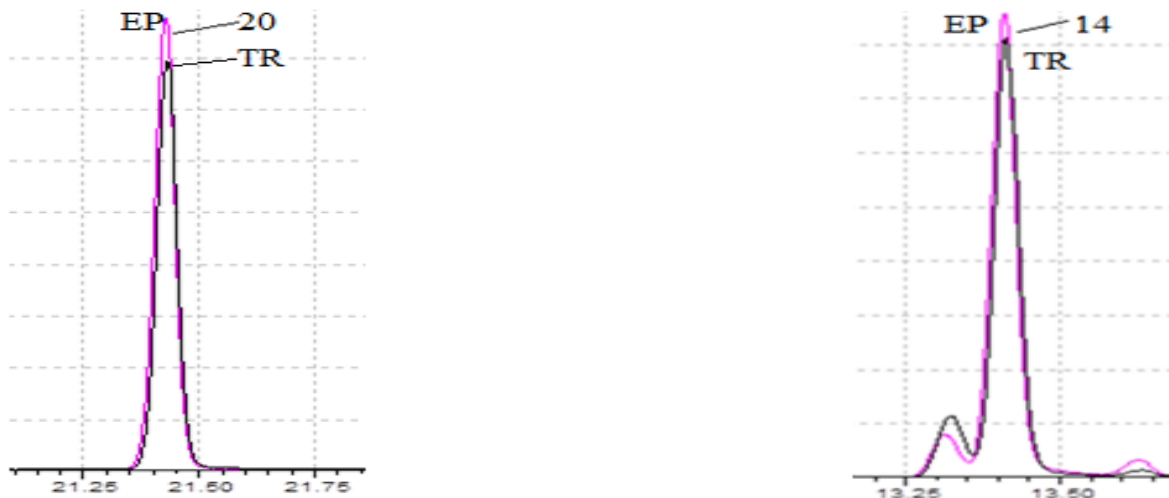
## **IDENTIFICAREA UNOR MARKERI VOLATILI DE AUTENTIFICARE PENTRU CELE TREI SORTIMENTE DE VINURI AUTENTICE: SAUVIGNON BLANC, TRAMINER ȘI PINOT GRI**

Comparând cele trei sortimente de vin din 2011 cu Episcopul 2011, se constată că o serie de compuși sunt tipici soiului și se regăsesc în cupaj, într-o proporție mai mare sau mai mică sau alți compuși ne semnificativi din punct de vedere al aromei nu se regăsesc în Episcopul.

### **STUDIUL COMPARATIV AL COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN SORTIMENTUL TRAMINER 2011 ȘI EPISCOPAL 2011**

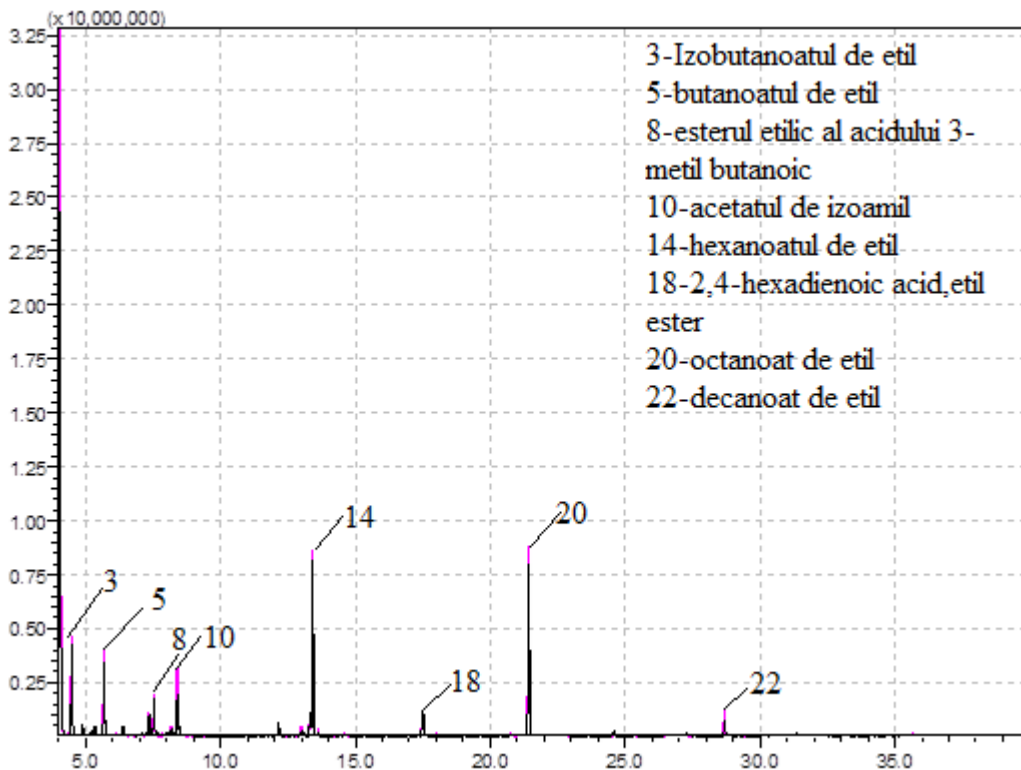
Din compușii potențiali de aromă în soiul Traminer 2011 s-au identificat 18 compuși iar în cupajul Episcopul 20 de compuși. Compoziția celor două vinuri analizate nu este foarte diferită, majoritatea compușilor de aromă din Traminer regăsindu-se aproape în totalitate în cupajul Episcopul în proporții destul de asemănătoare, se pot observa suprapunerea picurilor în cromatograma fig. 9. Concentrația de alcooli superiori este de 17.54% în Traminer 2010 și 17.23 % în Episcopul.

Există, totuși diferențe în ceea ce privește alcool izoamilic prezent în Episcopal în proporție de 12.75% și nefiind identificat în Traminer. De asemenea, conținutul terpenic este mai ridicat în Episcopal 2011, 0.43% față de Traminer 2011, 0.27%. Conținutul de norizoprenoizi este mai ridicat în Traminer, 1.84% față de Episcopal, 0.73%.



**Fig.8** Diferențele în conținutul de ester etilic al acidului octanoic (20) și ester etilic al acidului hexanoic (14) în TRAMINER 2011(negru)-EPISCOPAL 2011(roz)

Semnificativ rămâne concentrația celor doi esteri : hexanoatul de etil și octanoatul de etil cuprinsă între 21.10% -21.62% pentru primul și 17.98%-18.64% pentru al doilea, fiind mai mare în cupaj decât în Traminer , după cum se poate observa din cromatograma, fig 8 .



**Fig. 9** Suprapunerea cromatogramelor ITEX/GC-MS pentru compușii volatili din vinul TRAMINER 2011(negru)-EPISCOPAL 2011(roz)

Hydrocarburile aromatice, fracția C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub>, prezente în Traminer 2011(1.15%), lipsesc total în Episcopal, 2011.

## EVALUAREA INFLUENȚEI ANULUI VITICOL ASUPRA COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ

Pentru a evidenția evoluția compușilor de aromă, influența climatică, de la un an la altul asupra fracției volatile din vinuri, am comparat sortimentele de vin Traminer, Sauvignon Blanc din doi ani consecutivi 2010/2011.

Pentru sortimentele Traminer 2010/2011 au fost identificați 21, respectiv 18 compuși volatili de aroma.

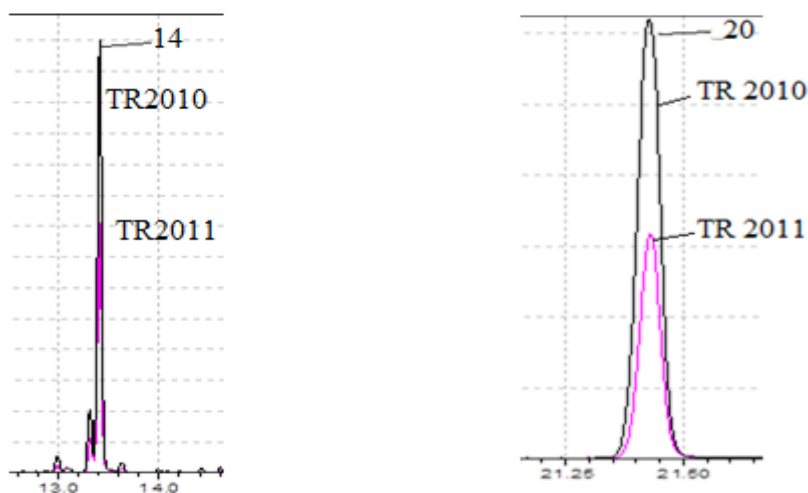
În sortimentul Traminer 2010 determinanți în ceea ce privește aroma sunt: 3-metil-1-butanol, octanoat de etil, hexanoatul de etil, acetatul de izoamil, sugerând arome de fructe, flori și conținutul de monoterpene 0.50% (4-caren, limonene, o-cimen) cu arome

florale. Concentrația în monoterpene este scăzută fiind însă concordanță cu datele raportate în literatură (Vilanova, 2010).

Pentru Traminer 2011 semnificativi au fost: 2-metil-1-butanol, hexanoatul de etil, octanoatul de etil, acetatul de izoamil.

Diferențe între cele două probe de vin s-au semnalat la Traminer 2010 prin prezența celor două terpenoide: limonene 0.225% și carene 0.08% și a hidrocarburilor volatile aromatice C<sub>8</sub>-C<sub>9</sub> în Traminer 2011: mesitilen, o-xilen, etil benzen. Izobutanoatul de etil și izopentanoatul se găsesc în proporție mai mare în Traminer 2011.

Rezultatele au arătat similitudini semnificative în ceea ce privește compoziția unor compuși majori ca esterii etilici, acetatul de izoamil. Din punct de vedere cantitativ esterii etilici, fig.10, în special, ai acidului octanoic (2) și hexanoic (1) reprezintă cel mai important grup de compuși volatili determinați, alcătuind mai mult de 50% din componentele volatile din vin.



**Fig. 10** Diferențele în conținutul de ester etilic al acidului octanoic (20) și ester etilic al acidului hexanoic(14) la sortimentul de vin TRAMINER 2010(negru) și TRAMINER 2011(roz)

În concluzie diferențele privind cantitatea de compuși de aromă acumulați în cele două vinuri analizate se datorează atât fluctuațiilor din climatul anual cât și formării de compuși de aromă în timpul învechirii.



Analiza celor două probe de vin Sauvignon Blanc din recolta 2010/2011 prin tehnica HS-ITEX-GC/MS a arătat că deși profilul de aromă stabilit pe baza compoziției volatile este asemănător fiind vorba de același sortiment, există diferențe în ceea ce privește numărul de compuși identificați, fiind mai mic în 2010 și lipsa terpenelor în 2010.

Diferențele care apar în ceea ce privește proporția acestora în vinurile analizate, la majoritate compușilor nesemnificativă, se poate pune pe seama fluctuațiilor de temperatură.

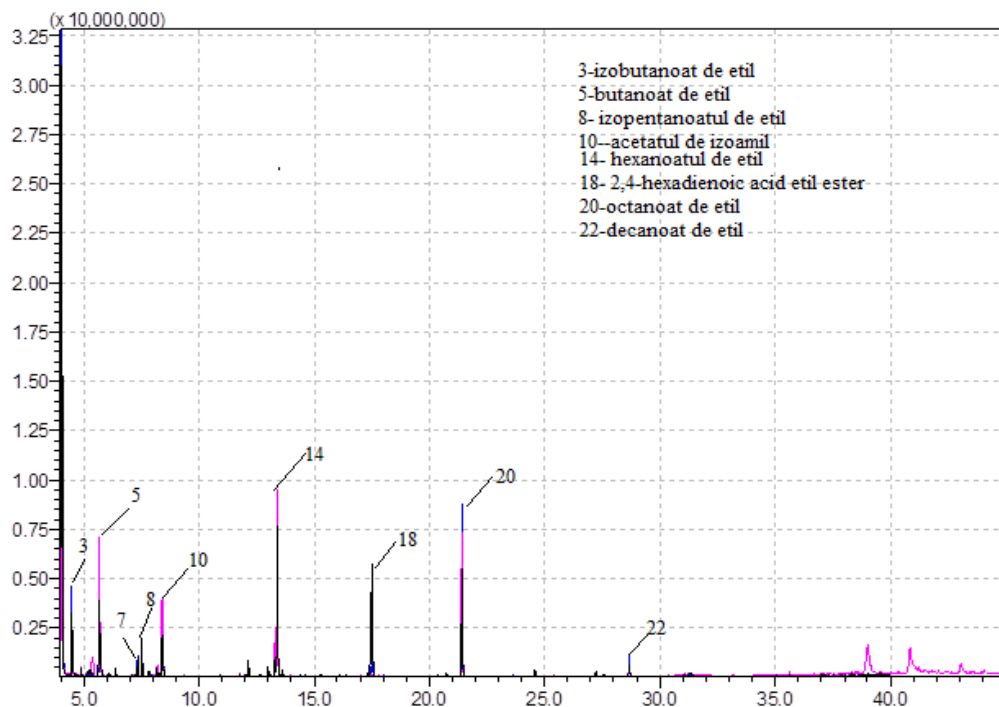
Caracterizând cei doi ani experimentali anul 2011 este un an normal, din punct de vedere al precipitațiilor căzute, mai secetos spre sfârșit, iar anul 2010 este unul excesiv de ploios.

## STUDIUL COMPARATIV AL COMPUȘILOR VOLATILI DE AROMĂ DIN CUPAJUL EPISCOPAL OBȚINUT DIN RECOLTA 2009, 2010 ȘI 2011

Din cupajarea celor trei soiuri de vinuri: Traminer, Sauvignon Blanc, Pinot Gri caracterizate fiecare în parte de arome deosebite nu se poate obține decât un vin care reușește să exprime mai mult decăt valoarea cumulată a soiurilor intrate în amestec așa cum de altfel a dovedit cupajul "Episcopal".

Compușii volatili identificați în urma separării cu tehnica ITEX-GC/MS, în cei trei ani de producție sunt : 20 în Episcopal din 2009, 12 în Episcopal din 2010 și 20 în 2011.

Unii compuși care au o contribuție importantă la notele de aromă se pot observa în aceste picuri suprapuse, fig.11. Compușii principali găsiți în toți cei trei ani investigați, în fiecare probă sunt: 2-metil-1-butanol, 3metil-1-butanol, acid butanoic etil ester, acid hexanoic etil ester, acid octanoic etil ester, cu variații foarte importante în special în cazul prezenței sau absenței alcoolului izoamilic, a unui număr mai mic de compuși volatili în Episcopalul din 2010 și a prezenței esterului etilic al acidului 2,4 hexadienoic în concentrație mult mai ridicată în Episcopalul din 2009.



**Fig.11** Suprapunerea cromatogramelor ITEX/GC-MS pentru compușii volatili din vinul EPISCOPAL 2009(negru)-EPISCOPAL 2010(roz)-EPISCOPAL 2011(albastru)

Compușii volatili detectați în proporție mai mare în cele trei sortimente de vin autentice: Sauvignon Blanc, Traminer, Pinot Gri, aromate se regăsesc și în cupajul realizat din acestea ”Episcopal”, diferențe în afară de cele menționate, mai sus, semnalându-se doar la concentrația compușilor.

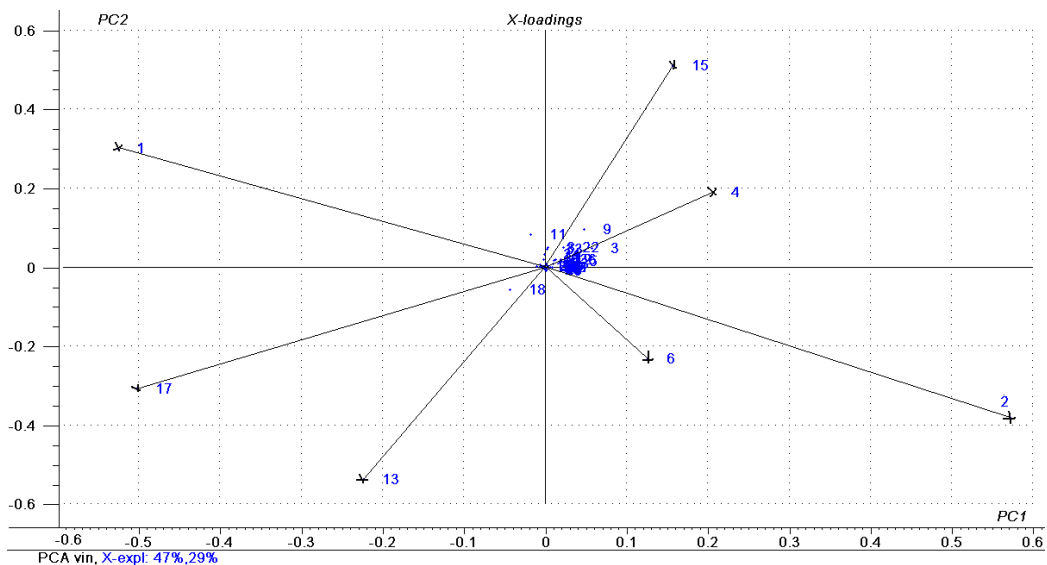
## EVALUAREA STATISTICĂ A DATELOR PRIN ANALIZA COMPONENTELOR PRINCIPALE (PCA)

Analiza componentilor principali (PCA) este o metodă chemometrică care are ca scop evidențierea interrelațiilor dintre diferite variabile precum și a similitudinilor și diferențelor caracteristice probelor analizate. Analiza PCA pentru datele experimentale s-a efectuat prin utilizarea programului Unscrambler X, versiunea 10.1 (CAMO Software AS, Oslo, Norway).

Rezultatele analizei PCA evidențiază similitudinile și diferențele între sortimentele de vin analizate. Astfel, în funcție de profilul volatil obținut în urma analizei ITEX/GC-MS, s-a reușit diferențierea probelor de vin luate în studiu în funcție de soi și de anul de proveniență. După cum se poate observa în Figura 12, primii doi componente (PC1 și PC2) explică 76% din varianța datelor. Probele analizate pot fi grupate în trei grupuri, astfel: primul grup: EP2011, PG2011, TR2010; al 2-lea grup: SB2010, EP2010; al 3-lea grup: EP2009, SB2011 și TR2011.

Pentru a vizualiza mai clar rolul/importanța fiecărei variabile în discriminarea probelor analizate s-au realizat graficele “correlation-loadings” (Figura 13). Compușii regăsiți în elipsa interioară explică 50% din varianța datelor în timp ce compușii aflați în elipsa exterioară explică 100% din varianța datelor. Printre compușii volatili care pot fi considerați ca și constituenți cheie pot fi menționați: 3-metil-1-butanol (1), 2-metil-1-butanol (2), etil-3-metil-butanoat (9), etil hexanoatul (13), 2,4-hexadienoic acid etil ester (15), etil octanoatul (17). Aceștia pot fi folosiți în diferențierea sortimentelor, în special prin valorile diferite de la un an la altul chiar și în cadrul aceluiași sortiment sau, prin diferențele de la un sortiment la altul.

Distribuția de tip “evantai” a vectorilor variabilelor (Figura 14), arată că sortimentele de vin din cei trei ani investigați nu se diferențiază major prin profilul compușilor volatili cât, mai ales, prin distribuția diferită a concentrațiilor acestora atât în interiorul aceluiași soi cât și de la un an la altul.



**Fig. 12** Graficul de tip biplot al analizei PCA a compusilor volatili din sortimentele de vin

Din graficele prezentate, s-a analizat asocierea/gruparea variabilelor, precum și a probelor, pentru a determina care grupări ale variabilelor sunt dominante pentru fiecare grupare a probelor(Tabelul 1).

Tabelul/Table 1

Schema grupării Probelor și a Variabilelor care le discriminează

<b>Nr. grupare</b> <i>Group No.</i>	<b>Probele din grupare</b> <i>Samples of the group</i>	<b>Variabilele dominante</b> <i>Dominant variables</i>
<b>1</b>	TR2010; PG2011; EP2011	1, 25, 30, 11,16
<b>2</b>	SB2010; EP2010	2, 6, 13, 14, 21
<b>3</b>	TR2011; SB2011; EP2010	3, 4, 9, 15, 27

Astfel, prima grupare a variabilelor, corespunzătoare primei grupări a probelor (TR2010, PG2011 și EP2011) este puternic corelată negativ cu prima axă principală PC1 și mediu corelată pozitiv cu cea de-a doua axă principală PC2.

Cea de-a doua grupare de variabile (Tab.1), corespunzătoare grupării a 2-a a probelor (SB2010 și EP2010) este corelată mediu pozitiv cu prima axă principală PC1 și corelată negativ cu a doua axă principală PC2.

A treia grupare de variabile, corespunzătoare celei de a treia grupări a probelor (TR2011, SB2011 și Ep2009), este puternic corelată pozitiv cu axa principală PC1 și puternic corelată pozitiv cu axa principală PC2.

Se poate constata că analiza PCA confirmă concluziile desprinse din analiza rezultatelor anterioare și anume că, diferențele în compoziția compușilor volatili din sortimentele de vin analizate depind atât de anul climatic cât și de varietate. Compușii care pot fi folosiți în diferențierea soiurilor sunt: 3-metil-1-butanol (1), 2-metil-1-butanol (2), etil-3-metil-butanoat (9), etil hexanoatul (13), 2,4-hexadienoic acid etil ester (15), etil octanoatul (17).

## CONCLUZII

Concluziile care au rezultat în urma studiilor efectuate în cadrul tezei de doctorat cu titlul **“Identificarea și cuantificarea unor markeri de aromă din vin”** sunt formulate din perspectiva celor două direcții majore de cercetare și sunt prezentate în cele ce urmează:

I.În raport cu obiectivele aferente primei direcții de cercetare ”Caracterizarea cupajului Episcopal și a sortimentelor din care acesta provine sub aspectul unor parametrii de calitate”, în urma analizei proprietățile senzoriale și fizico-chimice s-au formulat următoarele concluzii generale:

- Vinurile luate în studiu corespund din punct de vedere a analizei senzoriale, atât ca și aspect cât și ca gust, culoare și miros.
- Concentrația alcoolică determinată ( STAS 6182/6-70) este cuprinsă între 11-13% vol., conform reglementărilor din Legea viei și a vinului ,fiind mai mare la soiurile Traminer și Sauvignon Blanc , vinuri albe, demiseci iar în Pinot Gri(dulce) și Episcopal (demidulce) a fost mai scăzută.
- Vinurile au dobândit o aciditate echilibrată (5,16 – 5,94g/L C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub>) ce indică o stare de sănătate și evoluție bună a vinului. STASUL 6182/1 prevede o aciditatea totală, exprimată în acid tartric , g/l (miliechivalenți), min. de 4.5. Cea mai mare aciditate a fost găsită în vinul dulce Pinot Gri (Cardinal) 2009 și anume 5.94 g/l acid tartric, iar cea mai mică în vinul demisec Traminer 2010, 5.16 g/l acid tartric.
- Densitatea relativă determinată( STAS 6182/8-71) este cuprinsă între 0.99-1g/cm<sup>3</sup> .
- Conținutul în SO<sub>2</sub> total identificat în probele analizate este variabil între 72,96 și 151,04 mg/L, confirmă faptul că se pot obține vinuri de calitate superioară, cu conținut scăzut în SO<sub>2</sub>, prin aplicarea unei tehnologii adecvate. La momentul punerii în consum, doza maximă permisă este de 160 mg / l pentru vinurile roșii și 200 mg / l pentru albe și roze.

În urma identificării și cuantificarea zaharurilor din struguri și sortimentele de vin selectate, prin metoda HPLC s-au formulat următoarele concluzii:

- Glucoza și fructoza s-au detectat ca fiind cele mai importante zaharuri care contribuie la gustul dulce, fructat al strugurilor. Conținutul de glucoză este cuprins între 117,2 și 136,7 g/l iar cel de fructoză între 116,6 și 126,9 g/l, pentru struguri din același an de recoltă, 2010. Conținutul de zaharoză este cuprins între 0,7-1,6g/l, mai ridicat la strugurele Sauvignon Blanc.
- S-a identificat un conținut de glicerol cuprins între 6,9-9,2 g/l valori care se încadrează în limitele precizate în literatură de specialitate, 5-15g/l (Banu,2009).
- Probele de vin au o concentrație de glucide cuprinsă între 10,3g/l (la soiul Traminer) -54,2 g/l(la soiul Pinot Gri), ceea ce corespunde cantității de zaharuri prevăzute pentru vinurile demiseci, demidulci și dulci conform rețetei de fabricație.
- Trehaloza un dizaharid a fost identificată doar în anul viticol 2009, la soiul Pinot Gri și cupajul Episcopal, în cantități foarte scăzute, 0,1-0,2 g/l.

În urma identificării și cuantificării compușilor de aromă din sortimentele de vin selectate, prin tehnica HS/ITEX/GC-MS s-au desprins următoarele concluzii:

- Din cele 8 probe de vin analizate s-au separat 50 de compuși volatili. Dintre aceștia au fost identificați 34 de compuși prin comparare cu spectrele obținute cu cele din bibliotecile de spectre NIST 147 și NIST 27 ale soft-ului, precum și pe baza indicilor de retenție Kovats din bazele de date [www.pherobase.com](http://www.pherobase.com) și [www.flavornet.org](http://www.flavornet.org) (pentru coloane cu fază staționară similară cu cea a coloanei ZB-5ms)
- Principalii compuși identificați aparțin următoarelor clase de compuși : alcooli superiori, esteri etilici, aldehide, cetone, terpene, norizoprenoide, compuși aromatici, hidrocarburi nesaturate și sunt raportați sub procente % Arie.

- Principalii alcooli identificați în studiu sunt: 2-metil-1-butanol (alcoolul amilic), 3-metil-1-butanol (alcoolul izoamilic) și în cantități mult mai mici în unele soiuri 1-hexanol.
- În probele de vinuri investigate au fost identificați 11 esteri etilici dintre care 8 sunt esteri etilici ai acizilor grași, doi ai acizilor carboxilici (succinic, lactic), iar unul este esterul etilic al acidului 2,4-hexadienoic. Dintre esterii etilici ai acizilor grași cu lanț mediu (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>), au fost identificați în proporție mai mare etil hexanoatul și etil octanoatul care au un rol important la aroma vinurilor.
- În studiul de față s-au identificat cinci acetati, dintre care cel mai abundent este acetatul de izoamil cu miros puternic de banane și pere.
- Concentrația cea mai mare de acetati s-a înregistrat în Sauvignon Blanc din 2011, 9,15% și Episcopalul din 2011, 8,47%, compensând ,probabil, concentrația de esteri etilici mai scăzută.
- Compuși ai acizilor hidrolizați cum ar fi 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen au fost, de asemenea identificați în probele de vin studiate, mai puțin în Pinot Gri 2011, Episcopal 2010 și 2011. Aceștia sunt posibili contribuitori la calitatea vinului, menționați în studii de specialitate în vinurile Riesling (Simpson 1978a, Winterhalter și colab., 1990b).
- Dietil succinatul apar în cantități reduse în aproape toate soiurile studiate, cu excepția Sauvignon Blanc și Episcopal 2010 fiind rezultatul activității bacteriei lactice, proces care are loc în timpul fermentației malolactice (Tufariello, 2012).
- 2,4-hexadienoic acid etil ester (etil sorbat) a fost identificat în cantități mai ridicate în Episcopal 2009, 19.93% și în Pinot Gri 2011, 6.36%. Provine din acidul sorbic care inhibă drojdiile și mucegaiurile, dar nu bacteriile acidului acetic și lactic.
- Terpenele au fost identificate în Traminer 2010, 0.5%, Traminer 2011, 0.27% și Episcopal 2009, 0.25% ; Episcopal 2011, 0.43%.
- Dintre aldehide, benzaldehida s-a identificat doar în Episcopal 2010 iar dintre cetone, acetofenona s-a semnalat în Episcopal 2009 și 2010 ,în cantități reduse.



- Hidrocarburile aromatice identificate: etil-benzen, o-xilen, mezitilen apar în proporție mai mare în Traminer 2011, 1.15%.
- Acizii hidroxiilați: 2-eteniltetrahidro-2,6,6-trimetil-2HPyran și 1,2-dihidro 1,1,6 – trimetil naftalen sunt prezenți în proporție de 0.09-2.11%, în cantitate mai ridicată în Episcopal 2009.
- Dintre alți esteri identificați : lactatul de etil apare în cantitate scăzută, 0,72% în Sauvignon Blanc 2010. Conform datelor de specialitate apare, de obicei, în timpul îmbătrânirii, în urma fermentației malolactice.

II.În raport cu obiectivele aferente celei de-a doua direcții de cercetare ”Evaluarea compușilor volatili din sortimentele de vin luate în studiu și trăsabilitatea lor în cupajul Episcopal” s-au formulat următoarele concluzii generale:

- Din cei 18-21 de compuși identificați în soiurile de vin studiate determinanți în ceea ce privește aroma sunt: 3-metil-1-butanol,2-metil-1-butanol, octanoat de etil, hexanoatul de etil, acetatul de izoamil, butanoatul și izopentanoații de etil, decanoatul de etil.
- Compușii enumerați mai sus, s-au înregistrat în probele de vin în proporții asemănătoare, cu excepția conținutul de alcooli superiori, mai mare în Traminer 2011, Episcopal 2011 și a conținutului de esteri, mai ridicată în Pinot 2011.
- Conținutul terpenic, tipic sortimentului Traminer s-a înregistrat și în cupajul Episcopal.
- Componentele norizoprenoidice s-au identificat în toate cele trei sortimente de vin:0.82% SB 2011; 1.84% TR2011; 0.09% PG 2011 iar în cupaj apar ca o medie a lor, 0.73% .
- Hidrocarburile aromatice, fracția C8-C9 prezente în proporție mai mare în SB 2011 și TR 2011 nu se regăsesc în cupaj.

- Diferențele privind cantitatea de compuși de aromă acumulați în vinuri analizate se datorează atât fluctuațiilor din climatul anual cât și formării de compuși de aromă în timpul învechirii.
- Unii compuși care își pun amprenta în tipicitatea soiului reușesc să atingă prin cumularea lor pragul de recunoaștere senzorială.
- S-au remarcat șase compuși care pot fi folosiți în diferențierea soiurilor: doi alcooli și patru esteri etilici.

## **ELEMENTE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI**

Originalitatea cercetărilor efectuate constă în:

- Identificarea unor markeri volatili determinanți pentru caracterizarea și diferențierea sortimentelor de vin din Podgoria Ciumbrud, în vederea autentificării acestora.
- Utilizarea unor tehnici avansate GC-MS, HS/ITEX/GC-MS pentru analiza calitativă a compușilor de aroma.
- Monitorizarea trasabilității unor compuși volatili de interes din sortimentele de vin care intră în cupajul Episcopal și evaluarea impactului pe care îl are anul de producție asupra lor.

## **PERSPECTIVE**

- Comportamentul divers al compușilor volatili poate fi utilizat pe viitor pentru stabilirea unor criterii de diferențiere a vinurilor în funcție de proveniența geografică, condițiile climatice sau de tehnologia de vinificație, în urma unui studiu susținut efectuat de-a lungul anilor și prin dezvoltarea unei baze de date la nivel național.
- Utilizarea unor „markeri” volatili de aroma în vederea autentificării sortimentelor de vinuri investigate de la podgoria Ciumbrud.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **Câmara J. S., Arminda Alves M. and Marques J. C.**, 2006, Development of headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry methodology for analysis of terpenoids in Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 555:191–200.
2. **Robinson A.L., Boss P.K., Solomon P.S., Trengove R.D., Heymann H., Ebeler S.E.**, 2014. Origins of Grape and Wine Aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65:1
3. **Salanță L.C., Tofană M., Socaci S., Pop C., Michiu D., Fărcaș A.**, 2012, Determination of the volatile compounds from hop and hop products using ITEX/GC-MS technique. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 18(2):110-115.
4. **Sánchez-Palomo E., Díaz-Maroto M.C., González Vinãs M.A., Soriano-Pérez A., and Pérez-Coello M.S.**, 2007, Aroma profile of wines from Albillo and Muscat grape varieties at different stages of ripening. *Food Control*, 18:398-403.
5. **Socaci S.A., Socaciu C., Mureșan C., Fărcaș A., Tofană M., Vicaș S., Pinteș A.**, 2014, Chemometric Discrimination of Different Tomato Cultivars Based on Their Volatile Fingerprint in Relation to Lycopene and Total Phenolics Content. *Phytochem. Anal.*, 25(2), 161–169.
6. **Vilanova M. and Oliveira J.M.**, 2012, Application of Gas Chromatography on the Evaluation of Grape and Wine Aroma in Atlantic Viticulture (NW Iberian Peninsula)
7. **Welke J. E., Manfroi V. , Zanusi M., Lazzarotto M., Zini A.**, 2013, Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data, *Food Chemistry*, 141:3897-3905

8. **Welke J. E., Manfroi V., Zanús M.,** Lazarotto M. and Alcaraz Zini C.. Characterization of the volatile profile of brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1226:124–139, 2012.
9. **Losada M. M., Lopez J. F., Anon A., Andres J. and Revilla E.,**2012. Influence of some oenological practices on the aromatic and sensorial characteristics of white Verdejo wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 47:1826–1834.