

UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI

Cu titlu de manuscris
C.Z.U: 663.2:634.85(478.9)

YAO Meiling

**DIVERSITATEA MICROBIANĂ A SOIURILOR DE STRUGURI DIN
TREI REGIUNI CU INDICAȚII GEOGRAFICE ALE REPUBLICII
MOLDOVA**

**253.03 - TEHNOLOGIA BĂUTURILOR ALCOOLICE ȘI
NEALCOOLICE**

Rezumatul tezei de doctor în științe inginerești

CHIȘINĂU, 2025

Teza a fost elaborată în cadrul Departamentului Oenologie și Chimie a Universității Tehnice a Moldovei și în condiții de producere la fabrica de vinuri ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L.

Conducător științific: Gheorghe ARPENTIN, dr. hab.

Referenți oficiali: Boris GĂINĂ, acad., dr. hab., prof.univ.
Nicolae TARAN, dr. hab., prof. univ.
Liliana CEPOI, dr., cercetător științific

Componența CSP a TD:

Președinte Rodica STURZA, dr. hab., prof. univ., m.c. AȘM
Membri Victoria ADAJUC, dr., conferențiar cercetător
Gheorghe ARPENTIN, dr. hab.

Susținerea va avea loc la 16.05.2025, orele 14.00 în incinta FTA/UTM, str. Studenților 9/9, aula 5-1, în ședința Comisiei de Susținere Publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific UTM din 03.03.2025 (proces verbal nr.4). din cadrul Universității Tehnice a Moldovei, bd. Ștefan cel Mare și Șfint, 168, MD-2004, Chișinău.

Teza de doctor și rezumatele pot fi consultate la biblioteca științifică a Universității Tehnice a Moldovei, la pagina web a ANACEC – <http://www.anacec.md> și repozitoriul UTM.

Rezumatul a fost expediat la 04 Aprilie 2025

Secretar științific al CSP a TD
Ecaterina COVACI, dr., conf. univ.



Conducător științific
ARPENTIN Gheorghe, dr. hab. în științe ingineresti

Autor
Meiling YAO



CUPRINS

I. REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	9
III. DIVERSITATEA MICROORGANISMELOR ÎN ZONELE IGP ALE REPUBLICII MOLDOVA	14
3.1. Studiul microorganismelor prin metode de cultură	14
3.2. Studiul diversității microbiene folosind secvențierea NGS	16
IV. IMPLEMENTAREA TEHNOLOGIEI DE BIOPROTECȚIE ȘI OPTIMIZAREA PREGĂTIRII MAIELEI DE LEVURI INDIGENE PENTRU ASIGURAREA FERMENTAȚIEI ALCOOLICE SUB CERTIFICAREA ECOLOGICĂ	21
4.1. Implementarea tehnologiei de bioprotecție la elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică	21
4.2 Implementarea procesului de pregătire a maielei de levuri indigene optimizate la elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică	23
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	28
BIBLIOGRAFIE	29
LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPAREA LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE	31
ADNOTARE	32

I. REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei abordate: Organizația Internațională a Viei și Vinului (OIV) definește „*terroir-ul*” ca o zonă în care cunoștințele colective despre interacțiunile dintre factorii umani și naturali conturează caracteristicile unice ale vinului produs. Diversitatea microbiană, cunoscută și sub denumirea de „*terroir microbial*”, este un component important al *terroir-ului* vinului. Acest concept a fost introdus în domeniul oenologiei acum câțiva ani, datorită dezvoltării tehnicilor de secvențiere de nouă generație (NGS), care permit identificarea ecosistemului microbian din diferite regiuni viticole prin tehnici de analiză specifice.

Soiurile și locația de origine au fost întotdeauna considerate cei mai importanți factori care determină diversitatea microbiană a strugurilor. Sub conceptul de „*terroir microbial*” a fost identificată diversitatea microbiană a unui număr de soiuri autohtone, spre exemplu: Barbera d' Asti DOC [1], Zinfandel din California [2], unele soiuri internaționale, precum, soiul roșu Cabernet Sauvignon și cel alb Chardonnay fiind, de asemenea, populare în acest context.

Pe plan național industria vitivinicolă este un sector esențial din punct de vedere economic, strategic, social și cultural pentru Republica Moldova. Aceasta constituie cea mai importantă parte a sectorului agricol și alimentar, constituind peste 16% din valoarea totală produsă în agricultură. Conform biroul național de statistică al RM (BNS) exporturile de vin moldovenesc au adus un venit de 3,1 miliarde lei în anul 2019, reprezentând circa 12% din balanța comercială externă și 3% din produsul intern brut (PIB).

În prezent, plantațiile de viță-de-vie ocupă 7% din totalul terenurilor agricole din Republica Moldova și 3,8% din suprafața totală a țării, demonstrând cea mai mare densitate a podgoriilor din lume, estimată la 3,44 ha/100 locuitori. Sectorul cuprinde estimativ peste 50 000 de fermieri și gospodării țărănești, 250 întreprinderi agricole, 181 vinării și 10 cooperative agricole. În cadrul acestui sector sunt angajați direct sau indirect peste 150 000 de persoane, ceea ce constituie peste 15% din forța de muncă activă a țării.

În acest context, cercetările recente în domeniul microbiologiei vinului au început să se concentreze pe izolarea și utilizarea tulpinilor/speciilor locale de levuri la elaborarea vinurilor naturale, ecologice, sustenabile cu caracteristici organoleptice tipice podgoriilor în care au fost crescuți strugurii. De exemplu, studiile efectuate de Taran, N. et al. pe soiul autohton *Codrinschii* au condus la selectarea a 9 tulpini de levuri cu potențial biotehnologic ridicat pentru producerea vinurilor roșii seci [3]. Aceste tulpini locale de levuri sunt capabile să se adapteze la condițiile specifice mediului, să fermenteze glucidele din must și să contribuie la obținerea unor vinuri cu tipicitate și calități organoleptice înalte.

Studiul realizat de Wang et al. aduce o contribuție la înțelegerea „*terroir-ului microbial*” moldovenesc, explorând vinul Fetească Neagră din Republica Moldova. Rezultatele cercetărilor au demonstrat diferențe notabile între micro- și macro-terroir, evidențiind influența factorilor locali asupra compoziției microbiene și asupra caracteristicilor unice ale vinului [4].

Elaborarea vinurilor s-a bazat în ultimele decenii pe levuri comerciale de tip *Saccharomyces cerevisiae* ca cultură starter, iar rolul levurilor non-*Saccharomyces* a fost ignorat. Recent, cercetătorii Roudil L., și Russo P., au descoperit că levurile non-*Saccharomyces* pot contribui pozitiv la aroma, calitatea și siguranța alimentară a vinului. Speciile non-*Saccharomyces* din tipul *Torulasporea delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces pombe* și *Pichia kluyveri* sunt deja disponibile pe piață sub formă de culturi comerciale și potrivite pentru diferite necesități de vinificație [5].

Concomitent, bacteriile nu au fost studiate atât de mult precum fungii, iar interesul pentru aceste s-a concentrat în principal pe bacteriile lactice (LAB) și pe bacteriile acetice (AAB). LAB reprezintă genuri precum *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weisella* și *Oenococcus oeni*, care sunt frecvent utilizate în vinificație. AAB reprezintă genuri precum

Acetobacter și *Gluconobacter*, care au fost identificate în diferite studii [6]. Într-un studiu realizat de Zgardan D., et al. în vinurile din RM a fost raportată prezența AAB, în special a speciei *Acetobacter pasteurianus*, la toate etapele vinificației, determinând o creștere a acidității volatile peste limitele acceptabile [7].

Este bine cunoscut faptul că, fermentația mustului de struguri și producția de vin reprezintă un proces complex, care implică activități metabolice ale microorganismelor de diferit tip. În timpul fermentației alcoolice a vinului, cea mai mare parte a conținutului de zahăr este metabolizată de levuri pentru a produce etanol și dioxid de carbon, făcând din levuri jucătorul-cheie în acest proces tehnologic. Cu toate acestea, descoperirile recente ale Roudil, L. sugerează că rolul levurilor non-*Saccharomyces* și al unor specii de bacterii în procesul fermentației alcoolice a fost subestimat, iar interesul atât pentru levurile non-*Saccharomyces* ca culturi starter potențial, cât și pentru diversitatea bacteriană este în creștere, având în vedere că acestea contribuie la proprietățile senzoriale ale vinului prin producerea de diverși metaboliți [5].

Multă vreme, un microorganism se considera viabil doar dacă era cultivabil, adică plasat în condiții optime formând un inocul cultivat în mediu lichid sau colonii crescute pe medii nutritive pe bază de agar-agar. Există, însă, microorganismele incapabile să formeze colonii pe medii de cultură nutritive, dar ale căror celule rămân biochimic active, ceea ce le face să se numească microorganismele viabile, dar nu cultivabile (VBNC).

Suprafața bobului strugurilor este un habitat instabil, ce se schimbă în funcție de condițiile climatice, care la rândul lor depind de mai mulți factori naturali, precum: temperatura, umiditatea și radiațiile UV [7]. Yao a stabilit că indicele temperaturilor nocturne în timpul maturării strugurilor (Cool night index) afectează cel mai mult populația de levuri de pe suprafața bobului [8]. În timp ce Combina et al. a confirmat că precipitațiile aproape de timpul recoltării strugurilor afectează cantitatea și calitatea levurilor de pe suprafața bobului de strugure [9].

Deși s-au realizat numeroase cercetări până în prezent, rezultatele disponibile nu permit aprecierea profundă a influenței factorilor climaterici asupra eco-sistemului microbial caracteristic podgoriilor vitivinicole din RM.

Un alt impact îl realizează, factorii umani cum ar fi lucrările agricole, folosirea fertilizanților, irigații, modul de gestionare a buruienilor, utilizarea produselor fitosanitare (pesticide, insecticide și ierbicide) influențează în mod fundamental nivelul calitativ și cantitativ al ecosistemului levurian/microbial al strugurilor. Utilizarea produselor fitosanitare cauzează probleme de calitate și de igienă alimentară, astfel: reziduuri excesive în vin, modificări ale caracteristicilor organoleptice ale vinului și efect toxicologic asupra consumatorului. Etienne et al. au descoperit că tratamentul cu fungicide afectează comunitatea de levuri de pe suprafața bobului strugurelui [10].

Utilizarea resurselor microbiene la elaborarea vinului reprezintă un factor semnificativ de inovare și îmbunătățire a calității în industria vinicolă. Explorarea în prezent a unei game variate de specii atât *Saccharomyces cerevisiae*, cât și non-*Saccharomyces*, pentru a îmbunătăți caracteristicile vinului și a răspunde preferințelor în continuă evoluție ale consumatorilor generează o industrie vitivinicolă competitivă și sustenabilă [11].

Maiaua de levuri indigene (MLI) este o tehnică tradițională de vinificație, care utilizează o cantitate mică de must parțial fermentat ca inocul pentru a iniția o nouă fermentație într-un alt volum de must sau mustuală. Această metodă urmărește să asigure stabilitatea și eficiența procesului de fermentație prin proliferarea rapidă a populației microbiene aflate la stadiile inițiale. MLI poate proveni fie din culturi de levuri selecționate în laborator, fie din musturi supuse unei fermentații spontane, iar caracteristicile microbiomului de la această etapă influențează direct aroma și caracterul final al vinului produs finit. De exemplu, utilizarea tulpinilor de *Saccharomyces cerevisiae* selectate în laborator poate garanta o rată constantă de fermentație și un control mai precis al procesului. Pe

de altă parte, folosirea unei MLI derivate din fermentații spontane poate păstra autenticitatea microorganismelor din *terroir*, conferind vinului o complexitate aromatică și o expresie regională distinctă. Totuși, aplicarea cu succes a MLI necesită un control riguros al diversității microbiene și al condițiilor de fermentație pentru a evita proliferarea levurilor sălbatice sau a altor microorganisme nedorite care pot afecta calitățile produsului finit.

Bioprotecția reprezintă o tehnologie emergentă în domeniul vinificației, având ca scop inhibarea dezvoltării microorganismelor dăunătoare prin introducerea unor levuri non-*Saccharomyces* sau altor microorganisme benefice, reducând astfel necesitatea utilizării dioxidului de sulf (SO₂). Studii recente realizate de Rubio-Breton P., et al., au arătat că levurile precum, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulaspora delbrueckii* și *Lachancea thermotolerans* pot limita creșterea microorganismelor nedorite în stadiile timpurii ale fermentației alcoolice prin mecanisme de inhibare competitivă și secreția de substanțe antimicrobiene. Aceste levuri nu doar că asigură stabilitatea microbiologică a vinului, dar contribuie și la complexitatea aromatică prin producerea unor metaboliți unici (esteri aromatici și acizi organici). În plus, tehnologia de bioprotecție contribuie la reducerea cantității de SO₂ utilizată, răspunzând astfel cerințelor consumatorilor pentru vinuri mai naturale și celor din categoria eco și bio. Totuși, similar cu MLI, eficacitatea procedurii prin bioprotecție depinde de selecția adecvată a tulpinilor, de doza de inoculare și de gestionarea precisă a condițiilor de fermentație.

Scopul lucrării constă în studierea diversității microbiene asociate strugurilor produși în cele trei zone cu indicație geografică din Republica Moldova și aplicarea microorganismelor comerciale și/sau indigene în procesul de elaborare a vinurilor tipice, prin intervenție minimă, în particular a vinurilor ecologice.

În vederea realizării scopului propus, au fost marcate următoarele obiective specifice:

- cuantificarea microorganismelor prezente pe strugurii produși în cele trei zone IGP a RM;
- studierea factorilor care influențează diversitatea microbială a strugurilor cultivați în cele trei zone IGP;
- izolarea și multiplicarea microorganismelor selectate pe diferite medii de cultură;
- utilizarea tehnologiei de secvențiere de tip amplicon (NGS) pentru analiza calitativă a comunității microbiene asociate strugurilor cultivați în cele trei zone IGP;
- dezvoltarea unei strategii inovatoare de producere a vinului cu aplicarea microorganismelor comerciale și/sau indigene la elaborarea unor loturi de vinuri ecologice.

Ipotezele de cercetare preliminare:

1. Cantitatea de levuri de pe suprafața bobului de struguri și din must este influențată de climă (factorul natural) și de practicile de gestionare a podgoriilor de viță-de-vie (factorul uman).
2. Republica Moldova deține o structură unică a microbiomului strugurilor cu variații diferențiale în cele trei zone IGP și la soiurile de struguri cultivate în aceste podgorii.
3. Particularitățile diversității microbiene pot fi aplicate la definirea și elaborarea tipicității și autenticității produselor vitivinicole din podgoriile de viță-de-vie a Republicii Moldova.

II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Studiul lucrării a fost realizat în cadrul proiectului „*Struguri de calitate*” din cadrul Oficiului Național al Viei și Vinului (ONVV) în laboratorul SARCO/EXCELL (Franța). Cercetările privind calitatea microbială au fost realizate în cadrul companiei Tinygene, Ltd. (Shanghai, China). Validarea rezultatelor cercetărilor și implementarea tehnologiei de valorificare a comunității microbiene la producerea vinurilor ecologice a fost realizată la ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L. pe durata stagiului practic al autoarei. De asemenea autoarea acestei lucrări a fost susținut de către Consiliul Chinez prin Bursă de Studii. În rezultatul implementării tehnologiei inovative în baza rezultatelor a fost obținut vinului „Native de Purcari”.

Studierea specificului organoleptic, dinamica parametrilor fizico-chimici și organoleptici a fost realizată în laboratoarele specializate din cadrul: ÎM moldo-franceză LACO-ALFATEC S.R.L., „Verificarea calității producției alcoolice” al INCAAMV, Centrului de Cercetări Oenologice al Facultății Tehnologia Alimentelor/UTM, precum și la Institutul de Cercetare al Plantelor și Animalelor Speciale al Academiei de Științe Agricole din China.

2.1. Caracteristica generală a metodologiei de cercetare microbiologice a florei indigene a strugurilor

Pentru studiul microbiologic au fost selectate 38 de probe de struguri, fiecare având o importanță specifică în cadrul analizei. Aceste probe au fost colectate din diverse locații și 3 ani de recoltă consecutivă (2018-2020), astfel încât a oferit o imagine cât mai completă asupra variabilității microbiomului asociat cu vița-de-vie. Mostrele de studiu au fost grupate pe baza a trei criterii principale: soiul de struguri, anul recoltei și regiunea IGP din care au fost prelevate. Această clasificare a permite o analiză detaliată a modului în care diferiți factori influențează diversitatea și compoziția microbiomului asociat cu strugurii.

Pentru secvențierea NGS, au fost selectate 9 probe (CCS, CCH, CFN, SCS, SCH, SFN, VCS, VCH, VFN) din trei soiuri de struguri din cele trei regiuni IGP. Aceste mostre au permis obținerea unei imagini detaliate a diversității microbiene la nivel molecular și identificarea specificității microbiene care pot influența caracteristicile terroir-ului.

Metodele de cuantificare a microorganismelor au fost cea prin microscopia cu epifluorescență (MEF) și cea de analiză cantitativă pe medii de cultură specifice (MCS). Prin metoda MEF microorganismele viabile sunt numărate folosind un protocol și materiale dezvoltate de Chemunex. Mostrele de la apa de spălare a strugurilor și cele de must sunt filtrate printr-o membrană Chemfilter CB04, care apoi este incubată la 30°C timp de 30 minute în obscuritate. Substratul inițial non-fluorescent este scindat de un sistem enzimatic celular ce eliberează fluorocrom. Acesta din urmă

excitată de radiația luminii din domeniul ultraviolet la 480 nm emite fluorescență verde. Membrana Chemfilter fiind plasată între lamă și lamela microscopului epifluorescent (Olympus BX51) dotat cu filtru adecvat (Olympus 467803) interpretează rezultatele cu o mărire de 1000. La metoda de analiză cantitativă MCS pentru numărarea drojdiilor, mostrele de la apa de spălare a strugurilor și cele de must sunt plasate pe plăci Petri cu 10 g/dm³ extract de levuri, 10 g/dm³ bacteripton, 20 g/dm³ glucoză, 25 g/dm³ agar și 0,015% biphenil. Pentru bacteriile LAB, mediul conține 500 ml/dm³ suc de struguri, 5 g/dm³ extract de drojdii, 2 ml/dm³ L Tween 80 și 20 g/dm³ agar. Pentru creșterea bacteriilor AAB, s-a folosit un mediu similar, suplimentat cu 30 mg/dm³ penicilină.

2.2. Protocolul experimental folosit la elaborarea vinurilor în bioprotecție și la pregătirea MLI

În perioada 2021-2023 s-au desfășurat practici oenologice, axate pe procedeul de bioprotecție și dezvoltarea de vinurilor cu MDI. Scopul acestei cercetări a inclus utilizarea levurilor non-*Saccharomyces* ca instrumente de bioprotecție pentru producția de vin, pentru a reduce utilizarea dioxidului de sulf, precum și utilizarea MLI în locul levurilor comerciale pentru a explora și valorifica *terroir-ul* moldovenesc.

Probele de studiu au fost soiul Rară Neagră, proveniți dintr-o vie organică din Olănești, Ștefan Vodă, Republica Moldova. Strugurii au fost culeși manual la maturare tehnologică deplină (conținutul sumar al zaharurilor de 255 g/dm³, aciditate titrabilă 4,65 g/dm³ acid tartric) și în condiții igienice perfecte. Schema de procesare a strugurilor a fost metoda clasică de procesare din care au fost elaborate 2 loturi de studiu: 2 rezervoare de 160 dal ca probă de control (grupul C1) și 2 rezervoare cu bioprotecție (grupul BP). În grupul de control C1 s-au adăugat 100 mg/dm³ de metabisulfid de potasiu (PMS) și 12 mg/dm³ de enzimă pectolitică (LAFFORT LAFAZYM). În același timp, în grupul BP s-au adăugat două tipuri de levuri non-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*) și enzimi pectolitice. Pe durata

fermentației alcoolice, pigeage-ul și remontarea s-au efectuat de două ori pe zi, iar densitatea a fost măsurată de două ori (dimineața și după-amiaza). În faza finală a fermentației, la densitate de aproximativ 1010-1020 kg/m³, s-au adăugat 25 mg/dm³ de LAFFORT LACTOENOS. La conținutul zahărului sub 4 mg/dm³ a fost realizată presarea hidraulică a boștinei fermentate. Vinurile experimentale, după decantarea de pe sedimentul de levuri, au fost transferate în butoaie de 22,5 dal pentru maturare timp de 6 luni. Înainte de îmbuteliere, vinurile au fost sulfitate cu 50 mg/dm³ de PMS.

Pentru elaborarea maiei MLI tradiționale strugurii au fost presați fără decantare, mustul obținut a fost sulfitat la 20-30 mg/dm³ SO₂ și menținut la temperatura de 25°C până la începerea fermentației spontane a acestuia. Pentru modulul cu MLI tradițională strugurii din soiul Pinot Noir au fost procesați conform procedurii descris mai sus. Conținutul a fost grupat în 2 loturi de studiu: 2 rezervoare de 160 dal ca probă de control (grupul C 2) și 2 rezervoare cu MLI (grupul MLI). În grupul de control C 2 și grupul MLI s-au adăugat 100 mg/dm³ PMS și 12 mg/dm³ enzimă pectolitică (LAFFORT LAFAZYM™ CL, France). După clarificarea mustului, levuri comerciale (LAFFORT ZYMAFLORE™ 011 BIO, France) 80 mg/dm³ au fost inoculate în grupul de control, iar în grupul MLI s-a inoculat MLI în proporție de 3% din volum. Ulterior, procedeele tehnologice au fost similare cu cele descrise în cazul C 1 și BP.

În studiul cu MLI optimat a fost utilizată varietatea locală Fetească Neagră pentru a produce vinuri mai apropiate de caracteristicile locale. Vinificația experimentală a constat în trei etape tehnologice: (1) pregătirea mediului de bază pentru MLI-T (MLI tradițional)/ MLI-O (MLI optimat) prin adăugarea de vin astfel ca concentrația finală de etanol în must să fie 1,5% vol. (MLI-O) sau apă (MLI-T) la must; (2) fermentație spontană timp de 3 zile pentru a obține MLI-O și MLI-T; (3) inocularea MLI-O, MLI-T și levuri comercială (grupul de control) în must proaspăt. Toate

schemele tehnologice aplicate au fost realizate în triplicat cu același lot de struguri (trei vase pentru fiecare încercare), drept probă de control a servit tulpina comercială de *S. cerevisiae* (LAFFORT ZYMAFLORE).

2.3. Metode analitice de studiu a calității și compoziției probelor experimentale

În vederea unei caracterizări cât mai detaliate a vinurilor au fost utilizate mai multe metode, precum: cromatografia în fază gazoasă cu detector de ionizare în flacără (GC-DIF) a fost utilizată pentru detectarea compușilor volatili principali; electroforeza capilară (CE) pentru analiza acizilor organici; cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) pentru analiza antocianilor și spectroscopia în infraroșu cu transformare Fourier (FTIR) pentru analiza proprietăților fizico-chimice.

Concomitent cu analiza cantitativă a probelor experimentale de vin a fost realizată și analiza organoleptică. Procesul de degustare a vinurilor s-a desfășurat în sala specializată de degustare a ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L. Grupul de degustători a fost compus din șase evaluatori experimentați (2 femei și 4 bărbați, cu vârste cuprinse între 26 și 62 de ani).

2.4. Analiza statistică a rezultatelor

În analiza conținutului cantitativ al microbiomului de pe struguri, pe durata procesului de fermentație alcoolică și pe durata păstrării vinurilor elaborate, au fost utilizate testele statistice post-hoc Tukey, analiza de varianță (ANOVA), analiza coordonatelor principale (PCoA), non-parametric analiza similarităților (ANOSIM) și analiza componentelor principale (PCA).

Toate procesele statistice au fost efectuate folosind R Project for Statistical Computing versiunea R.4.04; în corelația Pearson pentru rezultatele NGS, când $p < 0.01$, este considerată semnificativă, iar în celelalte rezultate, când $p < 0.05$, este considerată semnificativă.

III. DIVERSITATEA MICROORGANISMELOR ÎN ZONELE IGP ALE REPUBLICII MOLDOVA

În baza studiilor realizate privind caracteristica microbiomului caracteristic celor 3 zone IGP din RM axat pe studiul microbiologic al 38 de probe de struguri din recolta anilor 2018-2020, 8 loturi de vinuri și analize fizico-chimice specifice sau stabilit următoarele aspecte tehnologice cu aplicare industrială.

3.1. Studiul microorganismelor prin metode de cultură

Numărul total de levuri de pe suprafața bobului strugurilor (NLS-M1) variază între $2,2E+04$ și $3,9E+07$ UFC/bob, iar numărul de levuri cultivabile de pe suprafața bobului strugurilor (NLS-M2) variază între $4,1E+02$ și $8,0E+06$. Numărul total de levuri din must (NLM-M1) variază de la un nivel foarte scăzut ($<8,9E+02$) la un nivel de peste $3,1E+06$ UFC/bob, iar numărul de levuri cultivabile din must (NLM-M2) variază între $3,0E+03$ și $2,0E+05$. Pentru a compara numărul de levuri între diferite soiuri, regiuni și recolte, au fost create boxplot-uri (figura 3.1.).

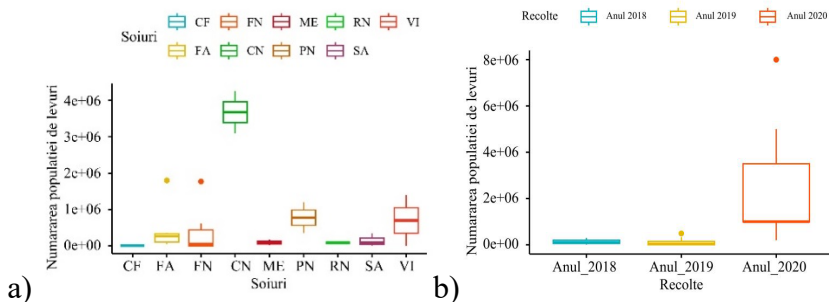


Figura 3.1. Box-plotul pentru numărul de levuri grupate în funcție de diferite soiuri (a) și anul de recolte (b).

În baza studiilor s-a stabilit că numărul total de levuri din must între soiurile ampelografice este semnificativ ($P=9,75e-05$), în special în cazul soiului Couderc Noir (CN) din gospodăriile casnice, unde nu au folosit produse fitosanitare. În plus, numărul de levuri cultivabile de pe suprafața bobului strugurilor variază semnificativ între anii de recolte ($P=0,00251$).

Prin cultivarea in vitro, au fost izolate mai multe specii de levuri și bacterii, precum: *Rhodotorula glutins*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aurebasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvrarum*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacilles breis*, *Lactobacilles fermentum* și *Gluconbacter oxydans*. Rezultatele obținute mărturisesc ca modelul genetic al tulpinii de *S. cerevisiae* izolate în recolta din 2020 este complet diferit față de cele obținute în 2018 și 2019; totuși, cele două tulpini de *S. cerevisiae* izolate în recolta din 2019 sunt identice.

Pentru o relevanță mai bună a rezultatelor a fost calculat coeficientul de corelație Pearson pentru diferiți factori și numărul de levuri determinate prin diferite metode în diferite eșantioane (figura 3.2).

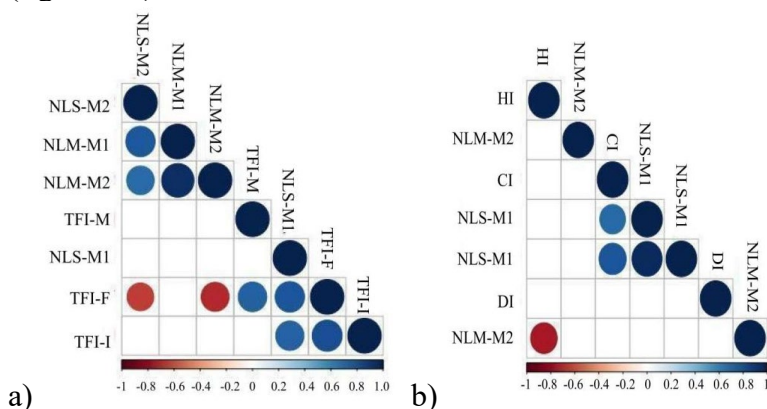


Figura 3.2. Corelațiile Pearson a) între indicele de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) și numărul de levuri , b) între factorii climatici și numărul de levuri.

În figura 3.2 cercul albastru indică o corelație pozitivă, cercul roșu indică o corelație negativă, iar cercul gol indică rezultate nesemnificative. Relațiile dintre TFI_F (produse fitosanitare pentru făinare) și NLS_M2 (numărul de levuri cultivabile la suprafața bobului), NLM_M2 (numărul de levuri cultivabile în must) sunt negative, dar este pozitivă între acesta și NLS_M1 (numărul de levuri totale pe suprafața bobului).

Cele constatate oferă o nouă perspectivă: produsele fitosanitare pentru combaterea făinării reduc numărul de levuri cultivate, dar cresc numărul total de levuri pe suprafața bobului. Fapt explicat prin faptul că produsele fitosanitare pe bază de sulf sunt eficiente în protejarea strugurilor de făinare, sulful având un efect antimicrobian dovedit asupra levurilor și care probabil duce la trecerea microorganismelor în starea viabile, dar ne-cultivabile (VBNC). Pentru factorii climatici, HI (indicele Huglin) este negativ pentru NLM_M1 (numărul de levuri totale în must), ceea ce înseamnă că temperaturile mai ridicate din perioada vegetativă reduc numărul total de levuri în mustul de struguri. Un alt indice de temperatură, CI (indicele nopților reci înainte de recoltare), este pozitiv pentru NLS_M1 (numărul de levuri totale la suprafața bobului) și NLS_M2 (numărul de levuri cultivabile pe suprafața bobului). Altfel spus, temperaturile reci ale nopților înainte de recoltarea strugurilor inhibă atât levurile cultivate, cât și numărul total de levuri. Factorii climatici sunt foarte complecși și există foarte puține explicații pentru variațiile numărului de levuri în funcție de acest factor.

După cum s-a menționat în primul capitol, cercetările actuale privind factorii climatici se concentrează mai mult asupra impactului asupra anumitor populații microbiene specifice.

3.2. Studiul diversității microbiene folosind secvențierea NGS

Pentru a analiza similaritatea și suprapunerea compoziției OTU a microbilor, a fost efectuată o analiză Venn (figura 3.3.) de alfa diversitate. În care, cercul cel mai exterior este numele eșantionului, petalele includ două linii de numere, partea superioară este numărul total de OTU-uri conținute în fiecare eșantion, iar parantezele inferioare sunt numărul de OTU-uri unice pentru fiecare eșantion; cercul alb în mijloc este numărul de OTU-uri de bază.)

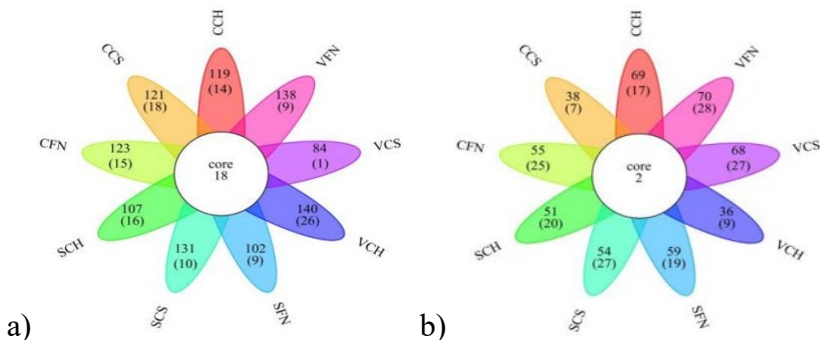


Figura 3.3. Diagrame Venn al numărului de OTU-uri: a) pentru fungi și b) pentru bacterii.

Din datele prezentate conform diagramei Venn, regiunea IGP Valul lui Traian s-a prezentat ca regiunea cu cea mai bogată diversitate microbiană din Republica Moldova, cu toate că există câteva cazuri speciale. Având în vedere dimensiunea relativ mică a eșantioanelor noastre, concluzia exactă trebuie verificată prin experimente la scară largă.

Pe baza analizei PCoA (figura 3.4.) de beta diversitate nu s-au găsit similarități în structura și compoziția comunităților fungice și bacteriene nici între soiuri, nici între regiuni. Acest rezultat poate fi cauzat de incertitudinea fermentației spontane.

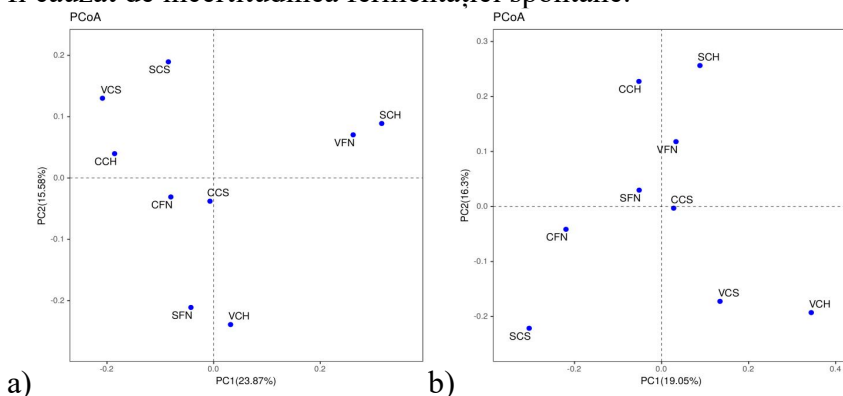


Figura 3.4. Analiza coordonatelor principale (PCoA) bazată pe distanțele UniFrac neponderate pentru a) fungi și b) Bacteria.

La nivel de încregătura, componența microbiană reprezentată de fungi (figura 3.5 a) din toate eşantioanele au fost regăsiți reprezentanți din 5 încregături: *Ascomycota* (98,8%), *Mortierellomycota* (0,6%), *Basidiomycota* (0,5%), *Mucoromycota* (0,06%) și *Rozellomycota* (0,04%). Doar eşantionul VCH are *Rozellomycota*.

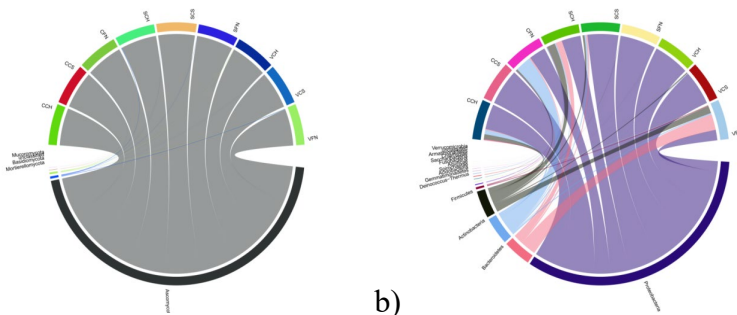


Figura 3.5. Structura microbiană la nivel de încregătura: a) pentru fungi și b) pentru bacterii.

Într-o altă cercetare despre fermentația spontană a strugurilor, abundența Ascomycetelor în fiecare eşantion a fost de cel puțin 90%, de la must până la finalizarea fermentației. În plus, *Ascomycota* și *Basidiomycota* au fost identificate în diverse produse alimentare fermentate.

La nivel de încregătura, componența microbiană reprezentată de bacterii clasificate în 16 încregături (figura 3.5. b), 4 dintre ele reprezentând o proporție relativ mare: *Proteobacteria* (75,3%), *Bacteroidetes* (7,9%), *Actinobacteria* (7,8%) și *Firmicutes* (7,6%). *Proteobacteria* au fost identificate și ca bacterii dominante în alte alimente fermentate. *Firmicutes* a fost demonstrat a fi o specie bacteriană de bază importantă în alimentele fermentate, iar proliferarea sa a fost observată a fi maximă pe parcursul fermentației.

Structura microbiană la nivel de genuri este prezentată în diagrama cu bare (figura 3.6). În cazul fungilor (figura 3.6. a), genurile cele mai frecvente găsite în toate eşantioanele sunt *Hanseniaspora* (82,8%), *Saccharomyces* (7,1%), *Metschnikowia*

(5,6%), *Mortierella* (2,0%), *Meyerozyma* (0,6%), *Torulaspora* (0,3%), *Saitozyma* (0,1%), *Erysiphe* (0,1%), *Alternaria* (0,1%), *Aspergillus* (0,1%), *Russula* (0,1%), *Trichoderma* (0,05%) și *Mycosphaerella* (0,05%).

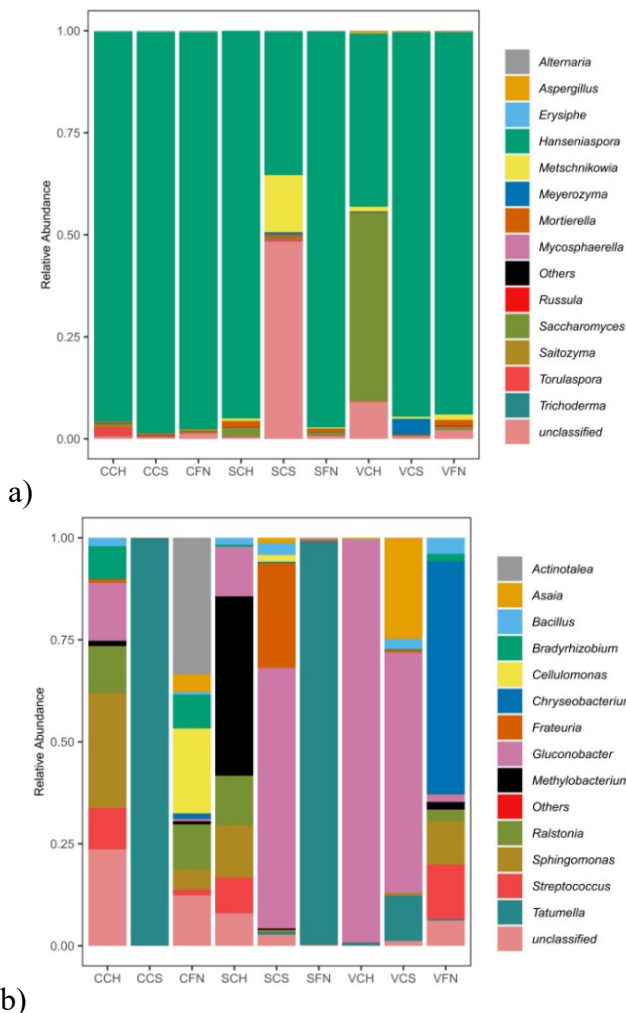


Figura 3.6. Cele mai frecvente 15 genuri de: a) fungii și b) bacterii la nivel de gen.

Pentru bacterii (figura 3.6 b), genurile cele mai frecvente sunt *Gluconobacteria* (25,3%), *Tatumella* (23,4%), *Chryseo-bacterium* (4,6%), *Spingomonas* (4,3%), *Asaia* (4,2%), *Methylo-bacterium* (4,2%), *Ralstonia* (3,2%), *Actinotalea* (3,0%), *Frateuria* (2,7%), *Streptococcus* (2,7%), *Cellulomonas* (2,5%), *Bradyrhizobium* (2,5%) și *Bacillus* (1,8%).

Se observă că *Mortierella* și *Saitozyma* are o corelație negativă cu *Erysiphe*, *Alternaria* și *Mycosphaerella*, trei agenți patogeni ai plantelor, în timp ce *Hanseniaspora* inhibă, de asemenea, *Aspergillus*. *Meyerozyma* și majoritatea bacteriilor și fungurilor sunt corelate negativ (figura 3.7).

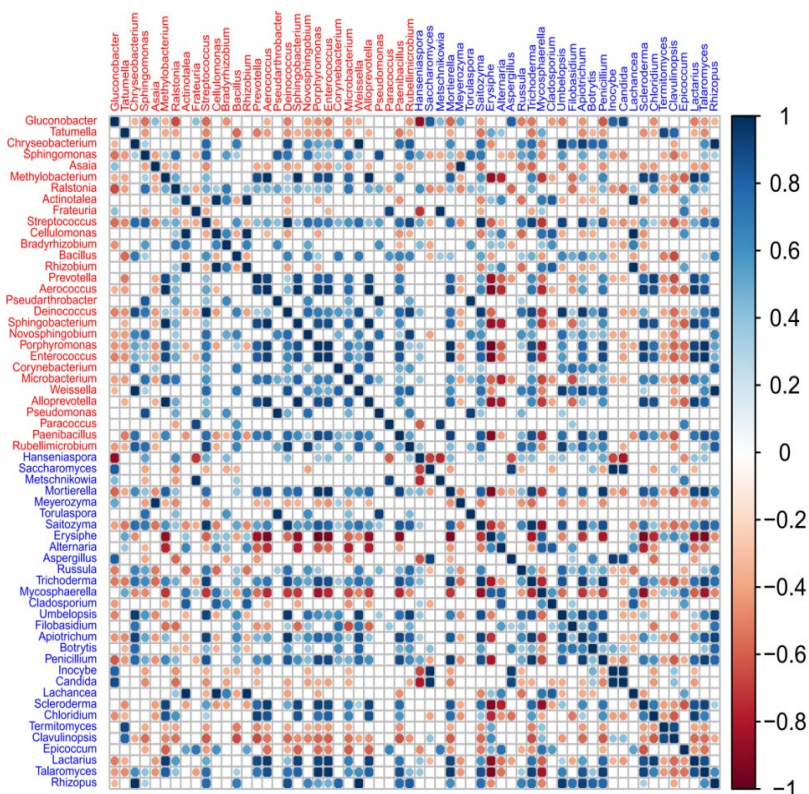


Figura 3.7. Corelația Pearson a primelor 30 de fungi și bacterii.

Lipsa protecției împotriva oxigenului și fermentațiile lente vor favoriza dezvoltarea bacteriilor acetice [18]. Se poate observa în figura 3.7. că *Saccharomyces* prezintă o corelație pozitivă cu *Gluconobater*. Cele mai atractive non-*Saccharomyces*, *Metschnikowia* și *Torulaspora*, nu au corelații cu alte ciuperci, dar au corelații pozitive cu unele bacterii, printre care coeficientul de corelație dintre *Metschnikowia* și *Frateuria*, *Torulaspora* și *Pseudarthrobacter*, *Torulaspora* și *Enterococcus* este foarte mare.

Apariția speciei *Tatumella* prezintă o corelație negativă cu aproape toate celelalte genuri de bacterii, indicând o posibilă inhibiție a altor bacterii de către acest gen. Genul de LAB *Weisella* are o co-ocurență puternică cu *Chryseobacterium*, *Aerococcus* și *Pseudarthrobacter*.

IV. IMPLEMENTAREA TEHNOLOGIEI DE BIOPROTECȚIE ȘI CERTIFICAREA ECOLOGICĂ

4.1. Implementarea tehnologiei de bioprotecție în elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică

Comparația este făcută între grupul de control al grupului C1 și grupul de bioprotecție al vinului BP. *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima* ca agent de bioprotecție adăugat la începutul vinificației Grupul BP.

Având în vedere rezultatele fizico-chimice din tabelul 4.1, vinurile produse cu levuri non-*Saccharomyces* ca bioprotecție au fost caracterizate prin concentrația în masă a acizilor volatili și substanței fenolice totale, antociani totali, semnificativ mai mare și un IPT predominant.

Conținutul de polifenoli și antociani din grupul martor este de 899,95 mg/dm³, respectiv 191,65 mg/dm³, valori relativ scăzute, ceea ce este asociat cu soiul de struguri utilizat. În schimb, grupul BP prezintă un conținut de polifenoli și antociani de 1312,35 mg/dm³, respectiv 492,00 mg/dm³, semnificativ mai mare decât grupul C 1. Tehnologia de bioprotecție a crescut considerabil conținutul de antociani și polifenoli în vinuri.

Tabelul 4.1. Analiza fizico-chimica a vinurilor elaborate cu bioprotecție.

Parametrii fizico-chimici	Grupul C1	Grupul BP
Concentrația alcoolică, % vol.	14,44±0,01a	14,49±0,04a
pH	3,61±0,01a	3,63±0,01a
Concentrația în masă a acizilor total, g/dm ³	4,80±0,00a	4,65±0,07a
Concentrația în masă a acizilor volatili, g/dm ³	0,21±0,01b	0,45±0,01a
Concentrația în masă a acizilor titrabili, g/dm ³	1,59±0,15a	1,51±0,06a
Concentrația în masă a acidului lactic, g/dm ³	1,52±0,23a	1,65±0,01a
Indicele polifenolilor totali (IPT)	34,30±0,15b	46,98±0,06a
Concentrația în masă a sub. fenolice totale, mg/dm ³	899,95±132,02b	1312,35±15,34a
Concentrația în masă a antocianilor totale, mg/dm ³	191,65±14,64b	492,00±3,39a

Astfel, creșterea conținutului de antociani și polifenoli sugerează că vinurile din grupul BP își pot menține o culoare, structură și complexitate mai stabile pe parcursul maturării acestora în butoi de stejar. Nivelul ridicat de polifenoli poate contribui la o astringență mai pronunțată, aspect ne observat în evaluarea senzorială.

Din prezentarea radar a profilului senzorial a vinurilor (figura 4.1), vinul cu bioprotecție a fost apreciat în cu punctaj maxim la caracteristicile senzoriale, cu excepția echilibrului. Diferențele sunt mici, cu excepția intensității aromei și aromei de fructe, vinurile cu bioprotecție obțin un scor mai bun decât cele de control.

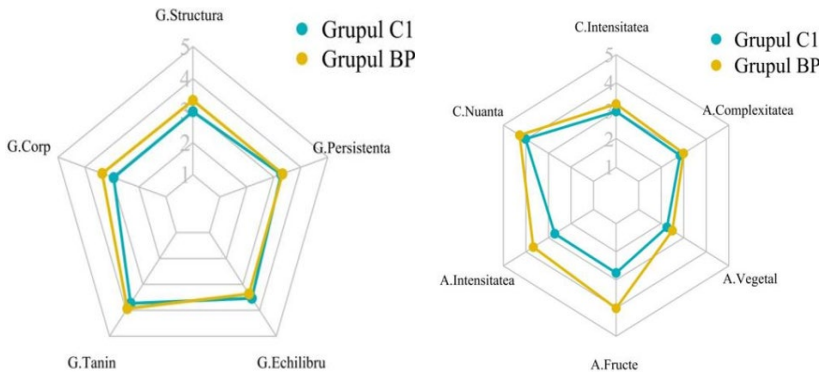


Figura 4.1. Figura radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu bioprotecție

4.2 Implementarea procesului de pregătire a maiei de levuri indigene optimizate la elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică

Rezultatele indicilor fizico-chimici (tabelul 4.2) arată că grupul MLI prezintă diferențe semnificative în compoziția chimică, evidențiind caracteristicile metabolice unice ale levurilor non-*Saccharomyces* implicate în procesul de fermentație. La nivel organoleptic toate rezultatele grupului MLI nu au arătat diferențe semnificative în comparație cu grupul de control.

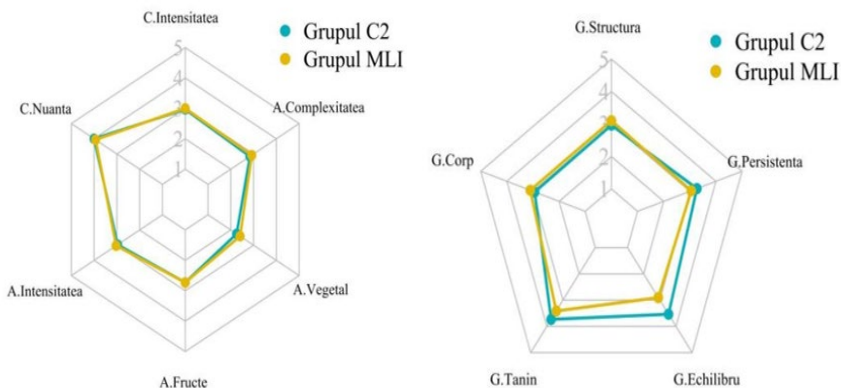


Figura 4.2. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu MLI

Tabelul 4.2. Analiza fizico-chimica a vinurilor cu MLI (C2-proba control și MLI-proba cu maia de levuri indigene)

Parametrii fizico-chimici	Grupul C2	Grupul MLI
Concentrația alcoolică % vol.	14,44±0,01a	14,46±0,10a
pH	3,61±0,01a	3,68±0,01a
Concentrația în masă a substanțelor volatile, g/dm ³		
aldehida acetică	4,35±1,20a	4,30±2,97a
etilacetat	60,55±0,35b	70,25±0,35a
metanol	67,95±2,05a	66,00±2,12a
izopropanol	2,00±0a	2,00±0,28a
n-propanol	68,60±0,57a	47,60±1,41b
izo-butanol	48,20±0,28a	45,90±0,57b
n-butanol	1,15±0,07a	0,60±0,14a
izopentanol	239,25±6,01b	244,45±5,87a
Concentrația în masă a glicerolului, g/dm ³	5,40±0,14a	5,70±1,27a
Concentrația în masă a 2,3-butilenglicol, g/dm ³	164,15±11,95a	172,05±43,06a
Concentrația în masă a acizilor organici, g/dm ³		
tartric	1,59±0,15a	1,35±0,02a
malic	0,15±0,01a	0,13±0,01a
citric	0,13±0,01a	0,11±0a
succinic	0,45±0,11a	0,30±0,11a
lactic	1,52±0,23a	1,43±0,04a

Studiul experimental al variantei MLI optimizat realizat în laborator, iar procesul de vinificație s-a desfășurat conform descrierii din secțiunea 2.2. În timpul procesului de fermentare spontană a pregătirii MLI-T, este evident că MT1 a întâmpinat probleme în jurul mijlocului fermentației, indicate de prezența

crescută a fungilor neclasificați la etapa finală MT1, împreună cu o cantitate insuficientă de *S. cerevisiae* (figura 4.3). Acest lucru a fost confirmat de evaluarea senzorială, cu un număr mai mare de degustători care au observat defecte olfactive în MT1.

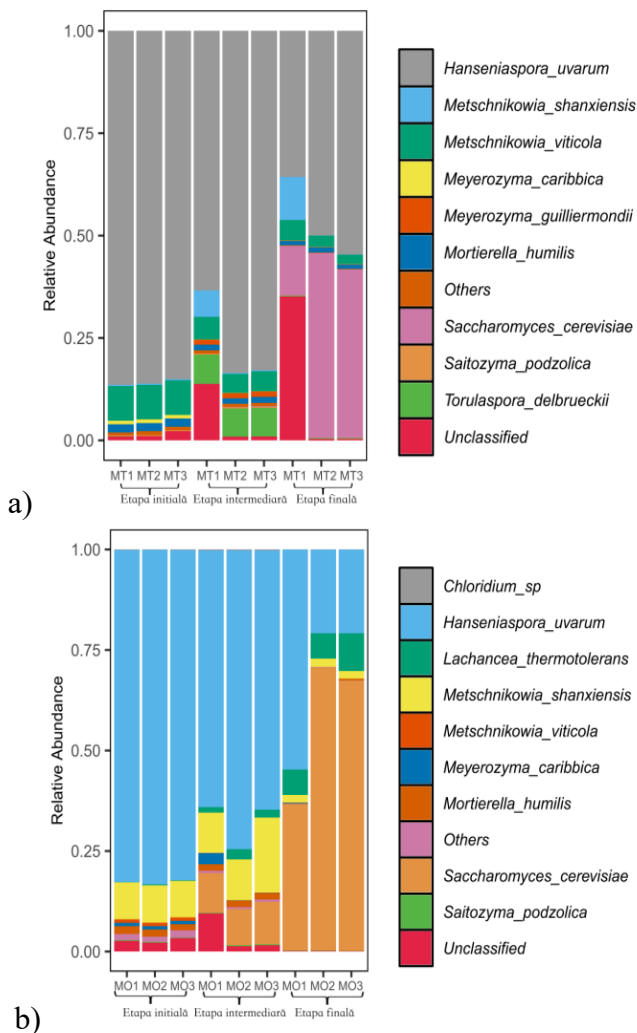


Figura 4.3. Abundența relativă a top 10 fungi în pregătirea MLI-T (a) și MLI-O (b).

Pe durata fermentației alcoolice grupul MO a avut un început de fermentație mai lent, dar a înregistrat o viteză stabilă începând cu ziua a doua, ajungând aproape de finalizare în ziua a cincea, ceea ce sugerează că adăugarea de vin a inhibat concurența microorganismelor nedorite, sporind stabilitatea fermentației. Contrar, grupul C3, a avut un început mai lent, posibil din cauza necesității de reactivare și adaptare a *S. cerevisiae* comercială, deși viteza fermentației a crescut în etapele ulterioare, eficiența generală a rămas inferioară grupurilor MO și MT.

Similar, în timpul procesului de pregătire a MLI-O, MO1 a întâmpinat probleme similare, cu niveluri mai ridicate ale organismelor neclasificate în timpul mijlocului fermentației în comparație cu celelalte eșantioane. Deși nivelurile de *S. cerevisiae* au fost mai scăzute decât în celelalte două eșantioane la finalizarea fermentației, ele au fost totuși mai mari decât în grupul MT, un fapt confirmat de evaluarea senzorială. Deși NGS nu a putut identifica microorganismele neclasificate specifice, este plauzibil că aceste organisme au contribuit la alterarea vinului și la formarea gusturilor neplăcute. Comparând procesele de pregătire a MLI, este evident că în timpul procesului au fost implicați mai mulți drozdii non-*Saccharomyces* în fermentație, cum ar fi speciile de *H. uvarum* și *Metschikowia*. La pregătire *S. cerevisiae* a reprezentat mai puțin de 50%. Acest lucru ar putea fi un factor contributor la defectele percepute în eșantioanele din grupul MT.

În procesul de pregătire a grupului MO, cu excepția lui MO1, *S. cerevisiae* a dominat în cele din urmă comunitatea microbiană. Inițial, *Metschikowia* a participat la fermentație, scăzând treptat, în timp ce *Lanchancea* a crescut. MDI-O, prin adăugarea de alcool, a inhibat unele levuri non-*Saccharomyces* și alte microorganisme care pot altera vinul, crescând în final cantitatea de levuri non-*Saccharomyces* în PdC, rezultând într-un proces de fermentație alcoolică mai sigur și mai eficient. În ceea ce privește proprietățile fizico-chimice, au fost observate diferențe semnificative doar în ceea ce privește aciditatea volatilă și conținutul acidul malic.

Nivelurile de AV și acid malic în ambele grupuri experimentale cu utilizarea PdC au fost semnificativ mai scăzute decât cele din grupul de control. În analiza PCA descrisă în figura 4.4, două componente principale pot explica 79,8% (55.6 % + 24.2%) din variație, indicând o putere de explicare puternică. Această analiză PCA este considerată eficientă la acest nivel de interdependență. Atributele senzoriale evidențiază un avantaj semnificativ al grupului C, cu o distribuție strânsă a probelor în cadrul grupului, indicând stabilitate și consistență. Probele grupului MO (triunghi verde) se situează în principal în zona din dreapta jos și în mijlocul graficului, unde MO 2 și MO 3 sunt apropiate de atributele "Fructe proaspete" și "Flori", evidențiind caracteristici puternice de fructe proaspete și note florale.

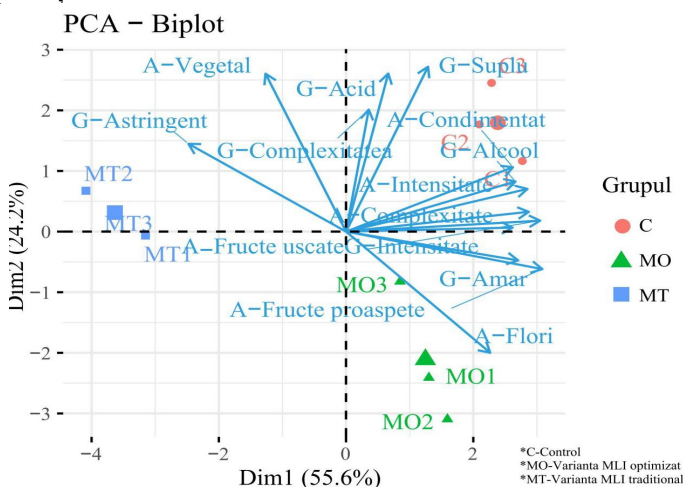


Figura 4.4. Analiza PCA a analizei senzorial

Cu toate acestea, MO se distanțează de grup și este asociat cu atributul "Amar", ceea ce sugerează posibile defecte senzoriale sau o variabilitate ridicată. Probele grupului MT (pătrat albastru) se regăsesc în partea stângă a graficului, asociate cu atribute negative precum "Vegetal" și "Astringent", ceea ce reflectă o calitate senzorială inferioară și o variație mare între probe la nivel gustativ.

Un total de 59 de compuși volatili au fost identificați, inclusiv 30 esteri, 6 alcooli, 7 aldehide, 3 cetone, 1 terpenă, 6 acizi, 2 tioli, 2 pirazine și 2 alți compuși. Grupul C a avut cea mai mare cantitate de compuși volatili pozitivi, în special esteri, contribuind la intensitatea mai ridicată a aromei în evaluările senzoriale. Grupul MO, deși a avut o cantitate ușor mai mică de compuși volatili pozitivi decât C, a menținut, totuși, o proporție scăzută de compuși volatili negativi. Grupul MT, cu un număr mai redus de compuși pozitivi și compuși negativi notabili.

CONCLUZII GENERALE

1. Numărul total de levuri de pe suprafața strugurilor variază de la $2,2E+04$ până la $3,9E+07$ UFC/bob, iar numărul celor cultivabile de pe suprafața strugurilor variază de la $4,1E+02$ până la $8,0E+06$. Contrar în mustul de struguri se conține un număr mai mic de levuri decât cel de pe suprafața strugurilor, variind între $8,9E+02$ și $4,25E+06$ UFC/mL și numărul de levuri cultivabile variază de la $8,9E+02$ până la $9,0E+05$ UFC/mL.

2. Analiză statistică a factorilor climatici și a utilizării produselor fitosanitare, a stabilit că produsele fitosanitare utilizate pentru combaterea fâinării reduc numărul de levuri cultivabile, dar contribuie la creșterea numărului total de levuri. Contrar, produsele fitosanitare pentru fâinare determină trecerea drojdiilor de pe suprafața strugurilor în starea viabilă, dar necultivabilă, ceea ce duce la scăderea numărului de drojdii din mustul de struguri.

3. Zona IGP Valul lui Traian a fost apreciată ca fiind una cu cea mai mare diversitate microbiană din cele trei regiuni IGP naționale, fapt stabilit prin studiul NGS.

4. Componenta fungilor și bacteriilor a strugurilor din Republica Moldova la nivel de încrângătura, fungii predominanți sunt cei din *Ascomycota* și cei *Proteobacteria* la bacterii.

5. După nivelul de răspândit în genul fungilor domină: *Hanseniaspora*, urmat de *Saccharomyces* și *Metschnikowia*; la bacterii *Gluconobacteria*, *Tatumella* și *Chryseobacterium*, iar bacteriile lactice sunt cel mai puțin răspândite.

6. Producerea vinurilor cu bioprotecție s-a efectuat folosind două levuri non-*Saccharomyces*: *M.pulcherrima* și *T.delbruckii*, întâlnite frecvent pe strugurii din RM. Vinul produs are o calitate bună, cu un buchet de arome mai pronunțat de fructe și un conținut mai ridicat de compuși fenolici și antociani.

7. Procedul cu MLI optimizat a produs vinuri cu aciditate volatilă și acid malic mai scăzute în comparație cu cele obținute cu levuri comerciale, având totodată un buchet de arome fructat mai pronunțat, atribuit levurilor *Lachancea thermotolerans*.

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Se recomandă reducerea treptată sau înlocuirea produselor fitosanitare chimice cu soluții de protecție organică și biologică, cum ar fi pesticidelor pe bază de microorganisme (de exemplu, *Meyerozyma*, identificată în subsecțiunea 3.2. ca fiind prezentă în comunitățile microbiene autohtone).

2. Selectarea și utilizarea levurilor non-*Saccharomyces* potrivite pentru bioprotecție: *M. pulcherrima* și *T. delbrueckii* care au capacitatea de a dezvolta vinuri cu un profil aromatic fructat.

3. Selecția tulpinilor de levuri *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* indigene regiunii vitivinicole pentru a realiza fermentația alcoolică, îmbunătățirea complexității aromatice a vinului și sprijinirea practicilor vinificali sustenabile și durabile.

4. În condiții de stres pentru comunitățile microbiene indigene (anii caniculari sau nopțile reci înaintea recoltării strugurilor) utilizarea MLI optimizat s-ar dovedi a fi o metodă eficientă și naturală, ce contribuie la eficiența și calitatea fermentației alcoolice.

BIBLIOGRAFIE (SELECTIVĂ)

1. Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Grieco, F. Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. In: *Food microbiology*. 2013, vol. 36, nr. 2, pp.335-342. ISSN 0740-0020.
2. Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., Mills, D. A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. In:

Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014, vol.111, nr.1, pp.139-148. ISSN 0369-8203.

3. Taran, N., Soldatenco, G. O., & Adajuc, V. Studiul microbiologic și biotehnologic al tulpinilor de levuri izolate la fermentarea spontană a strugurilor din soiul de struguri cu boabe negre „Codrinschii”. In: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2023, vol.70, nr.3, pp.107-110. ISSN 2587-3687.

4. Wang, F., Yao, M., & GHEORGHE, A. Exploring the micro and macro terroir of Fetească Neagră wine from Moldova. In: *Journal of Engineering Sciences*. 2024, vol.31, nr. 1, pp.97-111. ISSN 2587-3474.

5. Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud - Funel, A. L. I. N. E. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2005, vol. 11, nr. 3, pp.316-327. ISSN 1755-0238.

6. Zgardan, D., et. al. A survey on acetic acid bacteria levels and volatile acidity in several wines of the Republic of Moldova. In: *Biology and Life Sciences Forum*. 2023, vol. 26, nr.1, pp. 79. ISSN 2673-9976.

7. Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., Capozzi, V. Non-Saccharomyces commercial starter cultures: scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. In: *Recent patents on food, nutrition & agriculture*. 2020, vol.11, nr.1, pp.27-39. ISSN 2212-7984.

8. Yao, M. et al. The yeast on the grape berry surface influenced by climatic factors. În: *International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking*. Yalta, Rusia, 2021, vol.39, pp. 1-8. ISSN 2117-4458.

9. Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., Martinez, C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. In: *International journal of food microbiology*. 2005, vol.99, nr.3, pp. 237-243. ISSN 1879-3460.

10. Etienne, L., Franck, P., Lavigne, C., Papaïx, J., Tolle, P., Ostandie, N., Rusch, A. Pesticide use in vineyards is affected by semi-natural habitats and organic farming share in the landscape. In: *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 2022, vol.333, pp.107-123. ISSN 1873-2305.

11. Vejarano, R., Gil-Calderón, A. Commercially available non-Saccharomyces yeasts for winemaking: Current market, advantages over Saccharomyces, biocompatibility, and safety. In: *Fermentation*. 2021, vol.7, nr.3, pp.1-23. ISSN 2311-5637.

12. Paul, D.B., David, S., Erko S. *Trends in the systematics of bacteria and fungi: Sequence-based identification and classification of fungi*. Wallingford: CABI, 2021. 352p. ISBN 978-1789-244-98-4.

Lista publicațiilor a d-nei Meiling YAO

- **Articole în reviste științifice peste hotare:**
 - ✓ în reviste din alte baze de date acceptate de către ANACEC, Baza DOAJ
 - 1. Wang, F., **Yao, M.**, Arpentin, G. Sensory evaluation of Fetească Neagră wine in Republic Moldova. În: *Magarach Vinogradstvo i Vinodelie*, 2022, vol. 24(1), 90-94. ISSN 0236-1264. doi:10.35547/IM.2022.38.66.014
- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**
 - ✓ din Registrul Național al revistelor de profil Categoria B⁺
 - 2. Wang, F., **Yao, M.**, Arpentin, G. Exploring the Micro and Macro terroir of Fetească Neagra wine from Moldova. În: *Journal of Engineering Sciences*, 2024, vol. 31, nr.1, pp. 97-111. ISSN 2587-3474. doi:https://doi.org/10.52326/jes.utm.2024.31(1).08
 - 3. **Yao, M.** Microbial diversity on grape surface and its research status. În: *Journal of Engineering Sciences*, 2024, vol.30, nr. 2, pp.158-172. ISSN 2587-3474. https://doi.org/10.52326/jes.utm.2023.30(2).14
 - ✓ din Registrul Național al revistelor de profil Categoria B
 - 4. **Yao, M.**, Wang, F., Arpentin, G. Studiul microorganismelor strugurilor din podgoriile Republicii Moldova: influența factorilor uman și natural. În: *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*, 2023, vol.70, nr.3, pp. 99-106. ISSN 1857-0461. doi.org/10.52673/18570461.23.3-70.08
- **Articole în lucrările conferințelor și altor manifestări științifice:**
 - ✓ incluse în bazele de date Web of Science și SCOPUS
 - 5. Wang, F., **Yao, M.**, Arpentin, G. Terroir of Fetească Neagră wines from Moldova. În: *International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking*. Yalta, Rusia, 2023, vol. 78, pp. 1-7. ISSN 2117-4458. doi.org/10.1051/bioconf/20237805003
 - 6. **Yao, M.**, Wang, F., Arpentin, G. The Effect of pesticide usage on grape yeast. În: *International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking*. Yalta, Rusia, 2022, vol. 53, pp. 1-6. ISSN 2117-4458. doi.org/10.1051/bioconf/20225305001
 - 7. **Yao, M.** et al. The yeast on the grape berry surface influenced by climatic factors. În: *International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking*. Yalta, Rusia, 2021, vol.39, pp. 1-8. ISSN 2117-4458. doi.org/10.1051/bioconf/20213905002.
 - ✓ în lucrările manifestărilor științifice ANACEC (baza de data DOAJ)
 - 8. **Yao, M.**, Wang, F., Arpentin, G. Bioprotection as a tool to produce natural wine: Impact on physicochemical and sensory analysis. În: *43rd World Congress of Vine and Wine*, Ensenada, Mexico, 2022, vol. 56, pp.1-4. ISSN 2273-1709. https://doi.org/10.1051/bioconf/20235602019

ADNOTARE

Meiling Yao, „Diversitatea microbiană a soiurilor de struguri din trei regiuni cu indicații geografice ale Republicii Moldova”, Teză de doctorat în științe inginerești, Chișinău, 2025

Structura tezei: Teza este compusă din introducere, patru capitole, concluzii și recomandări, bibliografie cu 186 referințe, 8 anexe, 122 pagini de conținut de bază, 21 tabele, 30 figuri. Rezultatele au fost prezentate în 8 publicații științifice.

Cuvinte-cheie: Diversitatea microbiană, factori climatici, managementul vitei de viei, tehnologia de secvențiere de nouă generație (NGS), indicații geografice protejate (IGP).

Scopul lucrării: constă în investigarea diversității microbiene a strugurilor din cele trei indicații geografice protejate a Republicii Moldova, explorarea funcției resurselor microbiene.

Obiectivele cercetării: Studierea cantitativă a microorganismelor strugurilor produși în 3 zone IGP din RM; studierea factorilor care influențează cantitatea și calitatea microorganismelor asociate strugurilor; identificarea microbiomului strugurilor din RM; dezvoltarea unei strategii inovatoare de vinificație prin utilizarea microorganismelor comerciale și/sau indigene.

Noutatea științifică și originalitatea tezei consta utilizarea, în premieră, a tehnologiei NGS în domeniul microbiologiei strugurilor produși în regiunile IGP din RM, precum și în folosirea, pentru prima dată la nivel mondial, a tehnologiei NGS pentru soiul de struguri autohton - Fetească Neagră.

Rezultatele obținute care contribuie la soluționarea unei probleme științifice importante: Descrierea compoziției comunității microbiene din mustul strugurilor moldovenești, demonstrând că speciile *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia sp.* sunt levuri non-*Saccharomyces* larg răspândite pe strugurii produși în zonele IGP din RM. Acest lucru contribuie la dezvoltarea produselor vitivinicole cu caracteristici locale prin utilizarea diferitelor resurse microbiene indigene.

Semnificația teoretică și valoarea practică aplicată: Pe baza cercetării efectuate, a fost propusă tehnologia producerii vinurilor cu bioprotecție folosind două levuri non-*Saccharomyces*: *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*. Procedura de pregătire a masei de levuri indigenă (MLI) a fost optimizată prin fortificarea cu vin a mediului de cultură, și a fost stabilit efectul acestui procedeu tehnologic asupra calității organoleptice și parametrilor fizico-chimice a vinurilor elaborate.

Implementarea rezultatelor științifice: Elementele tehnologice ce țin de bioprotecție și MLI au fost aplicate în practică la ÎM „Vinăria Purcari” SRL la producerea ecologică a vinurilor roze și roșii pe parcursul campaniilor de vinificație 2021-2023.

АННОТАЦИЯ

Meiling Yao «Микробное разнообразие сортов винограда из трех регионов с географическими указаниями Республики Молдова».
Диссертация на степени доктора технических наук, Кишинев, 2025.

Структура диссертации: Диссертация состоит из введения, четырех глав, выводов и рекомендаций, библиографии из 186 источников, 8 приложений, 122 страницы основного содержания, 21 таблиц, 30 рисунков. Результаты исследования были представлены в 8 научных публикациях.

Ключевые слова: Микробное разнообразие, климатические факторы, управление виноградниками, технология нового поколения секвенирования (NGS), защищённое географическое указание (ЗГУ).

Цель работы: Исследование микробного разнообразия винограда из трех защищенных географических указаний (ЗГУ) РМ и изучение функций микробных ресурсов.

Задачи исследования: Количественное изучение микроорганизмов винограда, выращенного в трех регионах с ЗГУ в РМ; исследование факторов, влияющих на количество и качество микроорганизмов, связанных с виноградом; идентификация микробиота винограда из РМ; разработка инновационной стратегии виноделия с использованием коммерческих и/или местных микроорганизмов.

Научная новизна и оригинальность диссертации: Впервые была применена технология NGS для исследования микробиологии винограда, выращенного в регионах ЗГУ в РМ, а также впервые в мире технология NGS была использована для изучения местного сорта винограда – Fetească Neagră.

Полученные результаты, способствующие решению важной научной проблемы: Выявлен состав микробного сообщества в сусле молдавского винограда, продемонстрировано, что *Torulaspora delb.* и *Metschnikowia sp.* являются широко распространенными несакхаромицетными дрожжами на винограде, выращенном в регионах ЗГУ в РМ. Это открытие способствует развитию винодельческой продукции с локальными характеристиками за счет использования различных местных микробных ресурсов.

Теоретическая значимость и прикладная практическая ценность: Была предложена технология производства вин с биозащитой с использованием двух несакхаромицетных дрожжей: *Torulaspora delb.* и *Metschnikowia pul.* на основе проведенных исследований. Процедура подготовки местной дрожжевой закваски (МДЗ) была оптимизирована путем обогащения ферментационной среды вином, установлено влияние этого технологического процесса на органолептические и физико-химические свойства вин.

Внедрение научных результатов: Технологические элементы, связанные с биозащитой и закваской МДЗ, были применены в практике на предприятии КОО „Vinăria Purcari” для производства экологических розовых и красных вин в винодельческих кампаниях 2021-2023 годов.

ABSTRACT

Meiling Yao “Microbial diversity of grape varieties from three Protected Geographical Indication regions of the Republic of Moldova.” PhD thesis in engineering sciences, Chişinău, 2025.

Thesis structure: The thesis consists of an introduction, four chapters, conclusions and recommendations, a bibliography with 186 references, 8 annexes, 122 pages of core content, 21 tables, and 30 figures. The results have been presented in 8 scientific publications.

Keywords: Microbial diversity, climatic factors, vineyard management, next-generation sequencing technology (NGS), protected geographical indications.

Purpose of the work: To investigate the microbial diversity of grapes from the three protected geographical indications of the Republic of Moldova and to explore the function of microbial resources.

Research objectives: Study the quantity of microorganisms in grapes produced in the three protected geographical indications; study the factors that influence the quantity of grape micro-organisms; identify the microbial community of grapes in Moldova; develop an innovative winemaking strategy using commercial and/or indigenous microorganism.

Scientific novelty and originality of the thesis: the first application of NGS technology in the field of grape microbiology produced in the protected geographical regions of the Republic of Moldova, as well as the first worldwide use of NGS technology for the indigenous grape variety - Fetească Neagră.

Results obtained that contribute to solving an important scientific problem: Revealing the composition of the microbial community on the surface of Moldovan grapes, demonstrating that *Torulaspota delbrueckii* and *Metschnikowia sp.* are widespread non-*Saccharomyces* yeasts on grapes of the Republic of Moldova. This contributes to the development of viticultural products with local characteristics through the use of various indigenous microbial resources.

Theoretical significance and practical applied value: Based on the conducted research, a bioprotection wine technology using two non-*Saccharomyces* yeasts: *Torulaspota delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*, was proposed. The procedure for preparing an indigenous yeast starter (IYS) was optimized by fortification with wine in the culture medium, and its effect on the organoleptic and physicochemical quality of the final products was established.

Implementation of scientific results: Technological elements (bio protection and IYS) were applied in the practice of LLC „Vinăria Purcari” for the production of rosé and red wines in conversion to organic viticulture during the 2021-2023 campaigns.

YAO Meiling

**DIVERSITATEA MICROBIANĂ A SOIURILOR DE
STRUGURI DIN TREI REGIUNI CU INDICAȚII
GEOGRAFICE ALE REPUBLICII MOLDOVA**

**253.03 - TEHNOLOGIA BĂUTURILOR ALCOOLICE ȘI
NEALCOOLICE**

Rezumatul tezei de doctor în științe inginerești

Aprobat spre tipar: 20.03.2025

Formatul hârtiei 60x84 1/16

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tiraj: 50 ex.

Coli de tipar.: 2,0

Comanda nr.1715.

ÎS FEP „Tipografia Centrală”
Str.Florilor 1