

UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI

Cu titlul de manuscris

C.Z.U: 579:663.22:634.8(478)(043)

**Diversitatea microbiană a soiurilor de struguri din trei regiuni cu indicații
geografice ale Republicii Moldova**

253.03 - TEHNOLOGIA BĂUTURILOR ALCOOLICE ȘI NEALCOOLICE

Teză de doctor în științe ingineresti

YAO MEILING

Conducător științific: ARPENTIN Gheorghe



Autor: YAO MEILING



CHIȘINĂU, 2025

©YAO MEILING, 2025

CUPRINS

ADNOTARE	5
LISTA TABELELOR	8
LISTA FIGURILOR	9
LISTA ABREVIERILOR	11
INTRODUCERE	13
I. DIVERSITATEA MICROBIANĂ DE PE SUPRAFAȚA STRUGURILOR	21
1.1. Microorganisme de pe suprafața strugurilor	23
1.1.1. Bacterii	23
1.1.2. Fungi filamentoase	24
1.1.3. Drojdii.....	25
1.2. Rolul diversității microbiene în oenologie	25
1.3. Factorii care influențează diversitatea microbiană a strugurilor	27
1.3.1. Factorii climatici	27
1.3.2. Gestionarea viței-de-vie.....	29
1.4. Metodele de analiză a diversității microbiene	30
1.4.1. Dezvoltarea metodelor de cercetare	30
1.4.2. Procesul tehnologic al secvențierii de tip amplicon cu NGS	33
1.5. Folosirea resurselor microbiene în producția de vinuri	36
1.5.1. Îmbunătățirea calității vinurilor prin utilizarea drojdiilor non-Saccharomyces ..	37
1.5.2 Reducerea cantității de SO ₂ administrat în vinurile cu bioprotecție	39
1.6. Concluzii la Capitolul I.....	42
II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETRARE	44
2.1 Studiul microbiologic	44
2.1.1 Cercetare cantitativă	44
2.1.2 Cuantificarea factorilor de influență.....	47
2.1.3 Cercetare calitativă	49
2.2 Protocolul folosit la elaborarea vinurilor în bioprotecție și la pregătirea MLI.....	52
2.2.1 Vinuri cu bioprotecție	52
2.2.2 Vinuri cu MLI.....	53

2.2.3 Metode analitice pentru determinarea proprietăților vinului	55
2.2.4 Analiza organoleptică.....	57
2.3 Analiza statistică.....	58
III. DIVERSITATEA MICROORGANISMELOR ÎN ZONELE IGP ALE REPUBLICII MOLDOVA	61
3.1. Studiul microorganismelor prin metode de cultură	61
3.1.1. Numărarea microorganismelor	61
3.1.2 Rezultatele izolării microorganismelor	66
3.1.3. Influența climatului și a utilizării produselor fitosanitare asupra populației de levuri.....	68
3.2. Studiul diversității microbiene folosind secvențierii de tip amplicon cu NGS	72
3.2.1. Diversitatea microbiană	72
3.2.2. Componenta microbiană	77
3.2.3 Prognoza funcțională.....	87
3.3. Concluzii la Capitolul III.....	91
IV. IMPLEMENTAREA TEHNOLOGIEI DE BIOPROTECȚIE ȘI OPTIMIZAREA PREGĂTIRII MAIELEI DE LEVURI INDIGENE PENTRU ASIGURAREA FERMENTAȚIILOR ALCOOLICE SUB CERTIFICAREA ECOLOGICĂ	95
4.1. Implementarea tehnologiei de bioprotecție la elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică.....	95
4.2 Implementarea procesului de pregătire a maiei de levuri indigene optimizate la elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică	100
4.2.1 Maia de levuri indigene : metoda tradiționala	101
4.2.2 Maia de levuri indigene: metoda optimizata.....	105
4.3. Concluzii la Capitolul IV.....	114
V. CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI.....	131
BIBLIOGRAFIE.....	135
ANEXE.....	134

ADNOTARE

Meiling Yao, „Diversitatea microbiană a soiurilor de struguri din trei regiuni cu indicații geografice ale Republicii Moldova”, Teză de doctorat în științe ingineresti, 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: Studiarea cantitativă a microorganismelor strugurilor produși în 3 zone IGP din RM; studierea factorilor care influențează cantitatea și calitatea microorganisme-lor 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 propusa tehnologia producerii vinurilor cu bioprotecție folosind două levuri non-*Saccharomyces*: *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*. Procedura de pregătire a maielei 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 microorganisms; 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 *Torulaspora 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: *Torulaspora 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.

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.1. Cluster-urile de cuvinte-cheie.....	22
Tabelul 1.2. Diversitatea microbiană identificată în mustul din diferite țări.....	26
Tabelul 1.3. Aplicații ale levurii non- <i>Saccharomyces</i> în îmbunătățirea calității vinului.....	37
Tabelul 1.4. Metaboliții produși de speciile non- <i>Saccharomyces</i> și caracteristicile senzoriale	42
Tabelul 2.1. Informații despre prelevarea mostrelor	45
Tabelul 3.1. Numărul de microorganisme de pe suprafața strugurilor	61
Tabelul 3.2. Numărul de microorganisme din must	62
Tabelul 3.3. Rezultatele ANOVA privind numărul de levuri între regiunile IGP, soiurile de struguri și anul recoltării.	66
Tabelul 3.4. Condițiile climatice ale celor 3 recolte și ale celor 3 regiuni IGP	69
Tabelul 3.5. Rezultatele TFI pentru 10 podgorile din recolta din 2020	69
Tabelul 3.6. Rezultatele calității secvențierii.....	73
Tabelul 3.7. Rezultatele diversității Alpha	74
Tabelul 3.8. Rezultatele ANOSIM privind influența Varietății și a regiunilor IGP asupra compoziției microbiene	77
Tabelul 3.9. Rezultatele ANOVA privind apariția genurilor microbieni între regiunile IGP și soiurile de struguri.....	81
Tabelul 4.1. Analiza fizico-chimică a vinurilor elaborate cu bioprotecție	97
Tabelul 4.2. Rezultatele analizei organoleptice ale vinurilor cu bioprotecție	99
Tabelul 4.3. Analiza fizico-chimică a vinurilor cu MLI.....	103
Tabelul 4.4. Rezultatele analizei senzoriale ale vinului cu MLI	104
Tabelul 4.5. Defectele vinurilor.....	107
Tabelul 4.6. Rezultatele analizei senzoriale	109
Tabelul 4.7. Analiza fizico-chimică a vinurilor elaborate cu MLI optimizat	110

LISTA FIGURILOR

Figura 1.1. Analiza bibliometrică	22
Figura 2.1. Fișa de degustare pentru vinuri cu bioprotecție și vinuri cu MLI-T a) pentru vinuri cu MLI-O b).	57
Figura 2.2. Exemple de analiză statistică utilizând limbajul R.	57
Figura 3.1. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferite soiuri. a) Suprafața, total; b) Suprafața, cultivabile 2; c) Must, total; d) Must, cultivabile.	63
Figura 3.2. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferitele regiuni IGP. a) Suprafața, total; b) Suprafața, cultivabile 2; c) Must, total; d) Must, cultivabile.	64
Figura 3.3. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferitele recolte. a) Suprafața, total; b) Suprafața, cultivabile 2; c) Must, total; d) Must, cultivabile.	65
Figura 3.4. Compararea genetică a tulpinilor de <i>S. cerevisiae</i> studiate în campaniile de vinificare 2018, 2019 și 2020.	68
Figura 3.5. Corelație Pearson a) între indicele de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) și numărul de levuri , b) între factorii climatici și numărul de levuri.	70
Figura 3.6. Curba de rarificare a secvențierii a) Fungi; b) Bacterii	72
Figura 3.7. Diagrame Venn ale numărului de OTU-uri a) pentru fungii. b) pentru bacterii.	74
Figura 3.8. Heatmap-ul matricei diferențelor a) Pentru fungi, utilizând metoda Bray-Curtis; b) Pentru fungi, utilizând metoda Jaccard; c) Pentru bacterii, utilizând metoda Bray-Curtis; d) Pentru bacterii, utilizând metoda Jaccard.	76
Figura 3.9. Analiza coordonatelor principale (PCoA) bazată pe distanțele UniFrac neponderate pentru a) Fungi și b) Bacteria.	76
Figura 3.10. Structura microbiană la nivel de încrângătura. a) pentru fungii. b) pentru bacterii	78
Figura 3.11. Cele mai frecvente 15 genuri a) de fungii și b) de bacterii la nivel de gen.	79
Figura 3.12. Corelația Pearson a primelor 30 de fungi și bacterii.	82
Figura 3.13. Structura microbiană la nivel de specie (abundența relativă mai mare de 0,1% a) de bacterii și b) de fungii	84
Figura 3.14. Prognoza funcțională a fungilor.	88

Figura 3.15. Caracteristicile funcționale ale bacteriilor	90
Figura 3.16. Abundența relativă a diferitelor funcții metabolice bacteriene în fiecare probă...	91
Figura 4.1. Dinamica fermentației alcoolice a vinului cu bioprotecție	96
Figura 4.2. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu bioprotecție	100
Figura 4.3. Dinamica fermentației alcoolice la pregătirea MLI.....	101
Figura 4.4. Dinamica fermentației alcoolice a pregătirii MLI a); comparația dinamicii fermentației alcoolice între MLI și vinul de control b).....	102
Figura 4.5. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu MLI	105
Figura 4.6. Dinamica fermentației alcoolice a pregătirii MLI-T și MLI-O	106
Figura 4.7. Dinamica fermentației alcoolice pentru cele două vinuri cu MLI și grupul de control.....	107
Figura 4.8. Analiza PCA a analizei senzorial	108
Figura 4.9. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu MLI optimizat	110
Figura 4.10. Ampretele compușilor volatili în două grupuri MLI și grupul de control.	111
Figura 4.11. Abundența relativă a primilor 10 fungi în pregătirea MLI-T a) și MLI-O b).....	113

LISTA ABREVIERILOR

AAB- Bacteriile acetice

ARNr- Acid Ribonucleic ribozomal

ANOSIM- Testul statistic Non-parametric Analiza Similarităților

ANOVA- Analiza Varianței

ARISA- Analiza automatizată a spațiului intergenic ribosomal

BCA- Agenți de biocontrol

BLAST- Basic Local Alignment Search Tool

BLAT- BLAST-Like Alignment Tool

CE- Electroforeză capilară

CI- Indicele temperaturilor nocturne

DAP- Fosfat de diamoniu

DGGE- Electroforeza în gel cu gradient denaturant

DI- Indicele de ariditate

EDTA- Acid Etilendiaminotetraacetic

ETP- Evapotranspirația potențială

FTIR- Spectroscopie în Infraroșu cu Transformare Fourier

FUNGuild- Clasificarea funcțională a fungilor pe baza secvențelor lor de ADN

GC -MS - Cromatografie în fază gazoasă-spectrometrie de masă

HI- Indicele heliatermic Huglin

HPLC- Cromatografie lichidă de înaltă performanță

IGP- Indicație Geografică Protejată

ITS- Spațiul Intergenic Transcris Intern

LAB- bacteriile lactice

KEGG- Baza de Date Kyoto despre Gene și Genomuri

MLI- Maia de levuri indigenă

NCBI- Centrul Național pentru Informații Biotehnologice

NGS- Tehnologia de secvențiere de nouă generație

OIV- Organizația Internațională a Viei și Vinului

ONVV- Oficiul Național al Viei și Vinului

OTU- Unităților Taxonomice Operaționale

PCA- Analiza Componentelor Principale

PCoA- Analiza Principalilor Coordonate

PCR- Reacția de polimerizare în lanț

PdC- Pied-de-cuve

PIB- Produsul Intern Brut

PICRUST- Inferența Profilurilor Funcționale ale Comunităților Microbiene Utilizând Bazele de Date Culturale

SO₂- Dioxidul de sulf

SSCP- Polimorfismele de conformație a monocatenare

TFI-Indicele Frecvenței Tratamentelelor Fitosanitare

T-RFLP- Polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție terminală

UV- Ultraviolete

VBNC- Celulele viabile dar non-cultivabile

INTRODUCERE

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 microbial 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 *Torulaspora 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 microorganisme 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, microorganisme incapabile să formeze colonii pe medii de cultură nutritive, dar ale căror celule rămân biochimic active, ceea ce le face să se numească microorganisme 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 ecosistemului 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 mustuială. 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 micro-biomului 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 (SO_2). 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 SO_2 utilizată, răspunzând astfel cerințelor consumatorilor pentru vinuri mai naturale și celor din categoria eco și bio. Totuși, similar cu MLI, eficacitatea procedeeului prin bioprotecție depinde de selecția adecvată a tulpinilor, de doza de inoculare și de gestionarea precisă a condițiilor de fermentație.

Scopul acestui studiu constă în studierea diversității microbiene asociate strugurilor produși în cele trei indicații geografice protejate 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 microbiană 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.

Studiul a fost realizat în cadrul proiectului „Struguri de calitate” din cadrul ONVV, și a fost realizată în timpul stagerii la ÎM „Vinăria Purcari” SRL, autoarea a fost susținut de Consiliul Chinez prin Bursă de Studii.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese

Analiza diversității microbiene a strugurilor și în procesul de fermentație alcoolică a vinului a evoluat semnificativ de-a lungul timpului, fiind condusă de progresele în tehnologiile moleculare. Metodele microbiologice tradiționale, cum ar fi microscopia și cultivarea pe medii de cultură, au pus bazele înțelegerii proceselor microbiene în producția de vin. Cu toate acestea, tehnologiile moleculare bazate pe acidul dezoxiribonucleic (ADN), în special reacția de polimerizare în lanț (PCR), au revoluționat analiza diversității microbiene prin furnizarea unei rezoluții și fiabilități mai mari [12].

Utilizarea genelor marker moleculare revoluționar stabile, cum ar fi gena bacteriană 16S rRNA și gena fungală ITS1-5.8S, rRNA-ITS2, a devenit standardul de aur pentru estimarea diversității filogenetice în comunitățile microbiene. Aceste gene marker au permis cercetătorilor

să identifice microorganismele direct din ADN-ul mediului, evitând necesitatea cultivării [13]. Metodele independente de cultură, inclusiv polimorfismele de conformație a catenelor simple (SSCP), electroforeza pe gel cu gradient denaturant (DGGE) și polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție terminale (T-RFLP) [14, 15], au furnizat profilarea mai rapidă, mai sensibilă și mai precisă a comunităților microbiene în comparație cu metodele dependente de mediul de cultură și condițiile de examinare.

Tehnicile bazate pe PCR, cum ar fi PCR-DGGE, au devenit larg utilizate pentru monitorizarea populațiilor de drojdii și bacterii în timpul fermentației vinului, permițând cercetătorilor să descifreze complexitatea și evoluția comunităților microbiene. Cu toate acestea, aceste metode au limitări, cum ar fi sensibilitatea redusă și incapacitatea de a detecta populațiile prezente în cantități reduse.

Progresele recente în tehnologiile de secvențiere de mare debit, cunoscute sub numele de secvențierea de nouă generație (NGS), au revoluționat în continuare prin analiza diversității microbiene. Secvențierea ampliconului reprezintă o abordare independentă de cultură, a permis profilarea taxonomică, filogenetică și funcțională a comunităților microbiene direct din ADN-ul mediului. Tehnologiei de secvențiere de tip amplicon cu NGS a furnizat o imagine cuprinzătoare a diversității microbiene în cadrul și între biotopurile complexe, inclusiv medii de viță de vie și fermentație a vinului [16].

Analiza datelor prin tehnologia de secvențiere de tip amplicon cu NGS implică înlăturarea secvențelor terminale ale primerilor (engl. - *adapter trimming*), selectarea/clusterizarea OTU-urilor și atribuirea taxonomică. Alt procedeu bioinformatic utilizat constă în înlăturarea erorilor secvențierii (engl. - *denoising*) [17, 18]. În cadrul procedurii *adapter trimming* se înlătură erorile de citire obținute prin reacțiile de PCR și secvențiere. Selectarea/clusterizarea OTU-urilor grupează secvențele similare în unități taxonomice operaționale (OTU-uri), care sunt apoi atribuite taxonomic folosind baze de date de referință. Instrumente precum PICRUST și FUNG-uild permit predicția funcțiilor genelor pe baza secvențelor genelor marker, facilitând o înțelegere mai profundă a ecologiei și funcției microbiene [19].

În teză se prezintă o combinație de abordări tradiționale și inovatoare pentru studierea diversității microbiene a diferitor soiuri de struguri din trei zone IGP din Republica Moldova. Pentru a număra populația de microorganisme s-a folosit metoda convențională, în care

microorganismele fiind cultivate direct pe medii selective, iar pentru a evidenția microorganismele în stare VBNC s-a utilizat microscopul epifluorescent. Morfologia microorganismelor a fost observată cu ajutorul microscopului, iar probele au fost trimise pentru secvențiere la compania Millegen din Labège, Franța. În 2022, s-a utilizat metoda secvențierii de tip amplicon cu NGS pentru identificarea structurilor comunităților microbiene asociate cu soiuri de struguri din trei regiuni IGP, fiind aplicate metode bioinformatic de analiză.

Pe baza cercetărilor teoretice, acest studiu propune o tehnologie de vinificație care prevede utilizarea levuri non-*Saccharomyces* comerciale, speciile *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*, ca agenți de bioprotecție, precum și un protocol optimizat de pregătire a maielei de levurii indigene (MLI) fortificate cu vin. Scopul acestor soluții tehnologice este de a dezvolta vinuri de înaltă calitate, cu intervenție minimă, care să respecte standardele de certificare ecologică și să asigure autenticitatea vinului produs.

Sumarul capitolelor tezei:

Introducere: oferă o prezentare generală a problemei de cercetare, evidențiind importanța acesteia și necesitatea investigației.

Capitolul I: este prezentată o analiză detaliată a literaturii, acoperind publicațiile din ultimii cinci ani. Studii experimentale și abordări practice ce includ populațiile microbiene găsite pe suprafața strugurilor și în must la diferite etape tehnologice, factorii care influențează aceste populații, metodologiile de cercetare utilizate în studierea microbiotei strugurilor și utilizarea resurselor microbiene ale strugurilor în enologie.

Capitolul II: cuprinde descrierea detaliată a metodelor de cercetare utilizate. Prezentarea informațiilor cu privire la tehnicile de eșantionare, metodologiile de cercetare microbiană, cuantificarea factorilor de mediu, metodele de analiză a proprietăților fizico-chimice ale vinului, tehnici de evaluare senzorială și analizele statistice utilizate.

Capitolul III: include rezultatele cercetărilor microbiene privind cantitățile de levuri și bacterii de pe suprafața strugurilor și în must din trei regiuni IGP ale Republicii Moldova, impactul condițiilor meteorologice și ale produselor fitosanitare asupra numărului de levuri și izolarea microorganismelor specifice. Spre finele capitolului sunt discutate rezultatele secvențierii, evidențiind structura completă a comunității microbiene, modelele de co-ocurență și analiză funcțională folosind baze de date Funguid și KEGG.

Capitolul IV: se axează pe utilizarea a două tulpini de levuri non-*Saccharomyces* în producția de vin. Tulpinile sunt folosite pentru a produce vinuri cu bioprotecție ca alternativă la tratarea cu dioxidul de sulf. În plus, este evaluat un vin elaborat folosind maiaua de levuri indigene (MLI), precum și determinarea proprietăților fizico-chimice și organoleptice a produsului finit obținut. Tehnicile de optimizare, MLI cu adăugarea de vin (MLI-M) sunt explorate, cu studii microbiene dinamice care explică mecanismele implicate și argumentează rezultatele obținute.

Teza se încheie cu paragraful concluzii și recomandări practice, evidențiind concluziile cheie și sugerând domenii pentru cercetare și dezvoltare ulterioară.

I. DIVERSITATEA MICROBIANĂ DE PE SUPRAFAȚA STRUGURILOR

Producția de vin este un proces complex, începând de la vie și până la vinul produs finit. În acest lanț, microorganismele joacă un rol decisiv. Astfel, de la mediul în care crește vița-de-vie, cuprinzând solul, topografia, condițiile climatice și *terroirul*, până la practicile de gestionare în vie, microbiomul prezent în mod natural poate schimba potențialul compozițional al vinului.

Introducerea strugurilor în cramă și începerea proceselor de vinificație modifică în continuare comunitățile microbiene. Realizările recente în tehnologia de secvențiere de generație nouă (NGS) au permis înțelegerea mai precisă a comunităților microbiene asociate cu strugurii și fermentațiile. Actualmente, avem o apreciere mai fină a diversității microbiene în regiunile producătoare de vin, pentru a începe să înțelegem cum diversitatea poate contribui la *terroir*-ul vinului. În plus, înțelegerea diversității microbiene asociate cu strugurii oferă, de asemenea, industriei vinicole cunoștințe despre utilizarea resurselor microbiene indigene.

În acest scop s-a efectuat o analiză bibliometrică pentru a explora stadiul actual al cercetărilor privind diversitatea microbiană de pe boabele de strugure [20]. Căutarea s-a efectuat folosind următoarele cuvinte-cheie: (grape* OR wine*) AND (microb* OR bacter* OR fung* OR microorg* OR yeast) AND (berry* OR skin* OR surface*) AND (diversity* OR community* OR abundance* OR richness* OR eco*) pe Web of Science, rezultând peste 1 875 rezultate. Din aceste înregistrări, au fost selectate pentru analiză suplimentară 954 de lucrări publicate în ultimii cinci ani (2018-2023).

Analiza bibliometrică a implicat identificarea cuvintelor-cheie cu frecvență înaltă (menționate de peste 30 de ori) folosind VOS viewer (Versiunea 1.6.19 iOS), iar co-ocurența acestor cuvinte-cheie a fost examinată. Figura 1.1 prezintă relația dintre cele 38 de cuvinte-cheie cu frecvență înaltă obținute din analiză, prin rețeaua de co-ocurență. Această analiză oferă perspective în ariile cheie de cercetare și tendințele în studiul diversității microbiene în boabele de strugure, evidențiind interconectarea diferitelor concepte în acest domeniu.

Clusterul 1 (de culoare roșie) constă din 14 cuvinte-cheie, inclusiv termenul „1st report” care indică faptul că numeroși microbi care nu au fost recunoscuți anterior de către cercetători au fost identificați pentru prima dată în ultimii cinci ani, datorită progreselor în tehnologia de secvențiere de generație nouă (NGS).

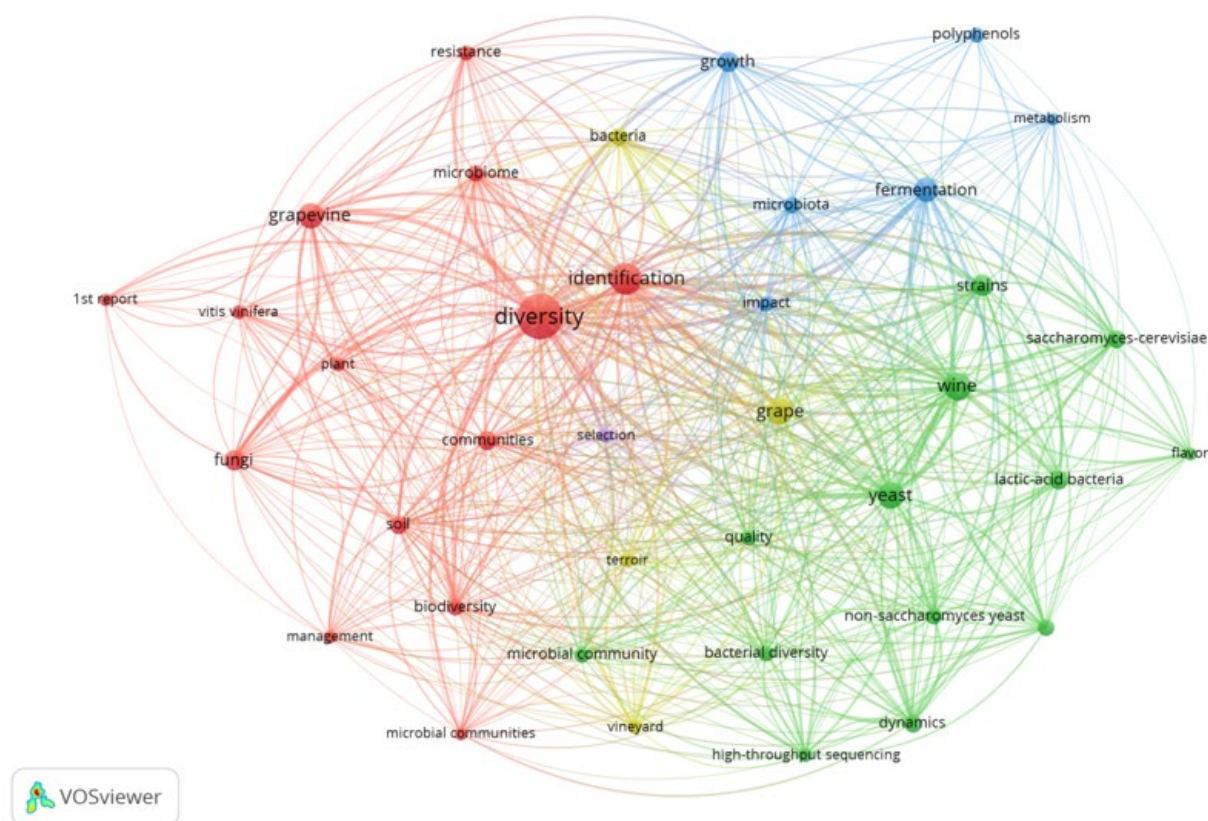


Figura 1.1 Analiza bibliometrică [20].

Managementul viței-de-vie și solul rămân subiecte populare în studiul diversității microbiene în struguri. Aceste constatări evidențiază importanța NGS în dezvăluirea comunităților microbiene anterior necunoscute, marcând accentul continuu asupra managementului viței-de-vie și a factorilor legați de sol în cercetarea diversității microbiene în struguri.

Tabelul 1.1. Cluster-urile de cuvinte-cheie.

Nr. cluster-ului	Numărul cuvintelor cheie	Cuvinte cheie
Cluster-ul 1	14	1 st report, biodiversity, communities, diversity, fungi, grapevine, identification, management, microbial communities, microbiome, plant, resistance, soil, <i>Vitis vinifera</i> .
Cluster-ul 2	13	Bacteria diversity, dynamics, flavor, high-throughput sequencing, lactic-acid bacteria, microbial community, microbial diversity, non- <i>Saccharomyces</i> yeast, quality, <i>Saccharomyces-cerevisiae</i> , strains, wine, yeast.
Cluster-ul 3	6	Fermentation, growth, impact, metabolism, microbiota, polyphenols.
Cluster-ul 4	4	Bacteria, grape, terroir, vineyard.
Cluster-ul 5	1	Selection

NGS a făcut posibilă identificarea diversității bacteriilor din boabele de strugure, depășind accentul anterior pe bacteriile lactice (LAB) și bacteriile acetice (AAB). În studiile recente, levuri non-*Saccharomyces* au devenit un subiect popular datorită impactului lor potențial asupra aromei și calității vinului, așa cum este evidențiat în Cluster-ul 2. În Cluster-ul 4, apare și termenul „*terroir*”, indicând conexiunea sa cu locația viței-de-vie. După cum s-a menționat anterior, locația viței-de-vie are un impact semnificativ asupra *terroir*-ului microbial, referindu-se la comunitățile microbiene unice asociate cu site-urile specifice de viță-de-vie.

În plus, rolul selecției este remarcabil. În afară de interesul oenologic și de microorganismele benefice, selecția microbilor locali sau a tulpinilor autohtone de *Saccharomyces cerevisiae* are, de asemenea, o importanță deosebită în modelarea diversității microbiene a strugurilor, așa cum este evidențiat în rezultatele cercetării.

În acest capitol, se oferă o discuție detaliată despre diversitatea microbială a strugurilor și aplicarea microorganismelor din struguri în oenologie, în baza analizei literaturii de specialitate.

1.1. Microorganismele de pe suprafața strugurilor

Bobul de strugure furnizează un mediu propice pentru creșterea diverselor tipuri de microorganisme. Prin urmare, este crucial să avem cunoștințe despre microflora rezidentă a boabelor și despre utilizările și interacțiunile lor potențiale cu microorganismele aplicate extern.

1.1.1. Bacterii

Bacterii acetice și bacterii lactice – prezente pe suprafața boabelor de strugure încă de la etapele inițiale ale dezvoltării boabelor. Prezența lor este deosebit de importantă în strugurii tehnici, deoarece acestea joacă un rol în procesul de fermentație malolactică. Bacteriile acetice sunt microorganisme aerobe care desfășoară fermentarea oxidativă a carbohidraților, alcoolilor și alcoolii carbohidrați. Aceste specii sunt cunoscute pentru producerea acidului acetic (oțet) din etanol prin procese biochimice. În strugurii sănătoși, populația bacteriilor acetice este foarte mică. Cu toate acestea, bacteriile acetice cresc atunci când strugurii sunt deteriorați mecanic sau încep să se deterioreze [21]. *Gluconobacter* se găsește în medii bogate în zahăr precum strugurii, în timp ce *Acetobacter* prosperează în medii bogate în etanol care pot fi convertite în acid acetic.

Componentele boabelor de strugure, cum ar fi zaharurile, compușii azotați, acizii organici și alte substanțe, sunt esențiale pentru creșterea acestor bacterii. Ca specific, bacteriile lactice catalizează conversia acidului malic în acid lactic printr-un proces numit fermentație malolactică.

Cu toate acestea, în boabele neafectate, șansele de utilizare a substanțelor nutritive esențiale acestor bacterii sunt mai mici, ceea ce duce la o populație mai mică în comparație cu boabele afectate [22]. Un studiu efectuat în timpul fazei de dezvoltare a strugurelui a identificat prezența bacteriilor oportuniste precum *Oenococcus oeni* și *Pediococcus parvulus*, care au tendința de a coloniza boabele deteriorate în loc de boabele sănătoase [23].

Alte Bacterii – diverse bacterii gram-negative și gram-pozitive sunt izolate de pe suprafața strugurilor de vin [24]. Bacteriile non-lactice și non-acetice găsite în mod obișnuit pe boabele de strugure includ specii: *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* și *Actinomyces*. Bacteriile aparținând încrengăturilor *Actinobacteria*, *Firmicutes* și *Proteobacteria* au fost raportate de Dolcetto și Sangiovese ca fiind rezidente pe suprafața strugurilor de vin [25].

În strugurii de masă, specii precum *Pseudomonas*, *Bacillus* și *Micrococcus* domină suprafața soiurilor Sundane și Red Globe [26]. Cercetările recente realizate de Renouf et al. [4, 5], privind efectul genotipurilor și soiurilor de struguri asupra compoziției bacteriene de suprafață au relevat predominanța *Bacillus* și *Pseudomonas*, împreună cu bacteriile lactice *Lactococcus*.

1.1.2. Fungi filamentoase

Comunitatea fungică asociată cu fructo-sfera strugurilor poate fi patogenă sau poate avea relații sinergice cu alte microorganisme [27, 28]. Pe strugurii de vin, compoziția fungilor filamentoase este crucială deoarece aceștia influențează proprietățile fizice ale strugurilor, ceea ce afectează în final calitatea vinului [29]. Regiunile subtropicale în care strugurii sunt recoltați de două ori pe an, au prezentat diferențe semnificative în compoziția comunității fungice. Izolatele fungice dominante găsite în mod obișnuit pe suprafața bobului includ: *Gyothrix spp.*, *Cladosporium ramotenellum*, *Pseudozyma aphidis*, *Gibberella intricans* și *Acremonium alternatum*. Într-un studiu privind soiul de struguri Kyoho, s-a constatat că *Alternaria* este genul fungal cel mai abundent în timpul fazei de pîrgă [30]. Diversitatea fungilor filamentoși precum: *Alternaria*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces* și *Epicoccum* a fost raportată la diferite etape ale dezvoltării bobului [31]. Patogenii post-recoltă precum *Cladosporium* și *Alternaria* sunt locuitori obișnuiți ai suprafeței boabelor de strugure. Practicile de gestionare în viță-de-vie influențează, de asemenea, structura comunității fungice [32], cu fungii aparținând încrengătură *Basidiomycetes* fiind cele mai diverse și abundente pe fruct în

comparație cu alte habitate din vița-de-vie. Impactul geografiei asupra variației fungice pe suprafața bobului a fost studiat prin analiza datelor de compoziție și a fost identificat prin analiza secvențelor codate cu bare [33].

1.1.3. Drojdii

Acestea reprezentând eucariote non-filamentoase, asociate în mod abundent cu bobul strugurelui și au un rol crucial în vinificație. Acestea sunt prezentate semnificativ pe strugurii de vin, servind ca sursă de inoculare primară pentru fermentația spontană. Tipurile și numărul de drojdii se schimbă în diferite faze de dezvoltare ale strugurilor (înflorire-supracoacere). Populația de drojdii crește odată cu maturizarea boabelor datorită acumulării de zahăr, care favorizează creșterea drojdiilor. Două filumuri de drojdii, *Ascomycota* și *Basidiomycota*, sunt prezente pe boabele de strugure, cu reprezentanți pentru basidiomicete ca: *Sporobolomyces*, *Rhodosporidium*, *Cryptococcus* și *Rhodotorula* care au o importanță majoră la etapele inițiale, dar au mai puțină semnificație în vinificație [34]. Speciile de drojdii ascomicete oxidative aparținând genurilor *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* și *Hanseniaspora* sunt prezente în timpul maturizării boabelor [35]. *Aureobasidium pullulans* a fost raportat ca fiind specia dominantă și majoră de drojdii pe strugurii din diferite vii [36]. Procentul de specii de drojdii precum *Aureobasidium*, *Pleospora* și *Hanseniaspora* pe boabele de struguri Cannou variază în diferite localități, dar prezența lor comună a fost raportată consecvent [37].

1.2. Rolul diversității microbiene în oenologie

Studii filogenetice prin secvențierea țintită a ampliconilor au generat, în ultimii zece ani, informații valoroase despre diversitatea globală a microorganismelor, inclusiv în podgorii (pieliță, bob, frunze și soluri) și în diferite soiuri de viță-de-vie. Aceste studii arată că comunitățile microbiene naturale au un impact semnificativ asupra sănătății strugurilor și a solului, influențând puternic procesele oenologice și caracterul organoleptic al vinului [38].

Investigațiile realizate de Tronchoni et al. [39] sugerează că microbiomele din vii și struguri sunt contributory semnificativi la conceptul de „*terroir*”, un concept valoros în industria globală a vinului, care se referă la toate elementele, atât antropice, cât și naturale, care conferă vinurilor profiluri aromatice și gustative distincte regional.

O mai bună înțelegere a factorilor care afectează distribuția microbiomului și biodiversitatea microbiană este, prin urmare, esențială pentru a exploata mai bine ecosistemele naturale în producția de vin de calitate și autentic regiunii de cultivare a strugurilor.

Li et al., au raportat modele de distribuție ale comunităților fungice la nivel regional în vinurile chineze din strugurii Marselan. Rezultatele au arătat că anumiți fungi ar putea fi considerați biomarkeri regionali, deoarece abundența lor relativă a variat în șase regiuni vitivinicole. Acești biomarkeri fungici includeau genuri dominante (*Alternaria*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula* și *Cladosporium*), slab abundente (*Aspergillus*, *Papiliotrema* și *Phoma*) și fitopatogene (*Colletotrichum*, *Botrytis* și *Aspergillus*) [40].

Recent, pentru a furniza dovezi cu privire la contribuția microbiană la terroir-ul vinului, Liu et al., au analizat distribuția fungilor asociată cu viile din soiul Pinot Noir și Chardonnay aflate într-un cerc de 12 km în Australia. Cu toate că cele două soiuri erau caracterizate printr-o semnătură fungică specifică în ceea ce privește abundența genului, un set de fungi omniprezente au fost identificate pe ambele soiuri aparținând genurilor *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Saccharomyces* și *Rhodotorula*. Studiul a arătat că originea geografică a avut un impact mai mare asupra comunității fungice decât soiul de strugure [41].

Prin urmare, o analiză taxonomică și funcțională detaliată a microbiotei mustului de struguri ar putea permite identificarea tulpinilor indigene de drojdii cu potențial de a contribui la profilul regional al vinurilor [42-44]. Tabelul 1.2 listează principala comunitate microbiană a mustului din diferite țări.

Tabelul 1.2. Diversitatea microbiană identificată în mustul din diferite țări

Țara	Fungi	Bacterii	Referința
China	<i>Saccharomyces</i> , <i>Starmerella</i> , <i>Mycosphaerella</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Schwanniomyces</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Trichothecium</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Acremonium</i> .	<i>Tatumella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Limonothrix</i> , <i>Providencia</i> .	[42]
USA	<i>Aureobasidium</i> , <i>Botryotinia</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Davidiella</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Erysiphe</i> , <i>Sclerostagonospora</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Lachancea</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i> .	<i>Citrobacter</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Gluconobacter</i> , <i>Hymenobacter</i> , <i>Janthinobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Microbacteriaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Sphingomonas</i> ,	[43]

		<i>Leuconostocaceae, Moraxellaceae, Methylobacterium.</i>	
Polonia	<i>Saccharomyces, Saccharomyces, Hanseniaspora, Candida, Metschnikowia, Pichia, Torulaspora, Filobasidium, Vishniacozyma, Meyerozyma.</i>	<i>Tatumella, Lactobacillus, Gluconobacter, Lactococcus, Sphingomonas, Methylobacterium, Polaromonas, Pseudomonas, Bacillus and Ralstoni.</i>	[44]
Italia	<i>Cladosporium, Aureobasidium, Mycosphaerella, Aureobasidium, Alternaria, Penicillium, Sclerotiniaceae, Pichia, Saccharomycetale, Hanseniaspora.</i>	<i>Acidobacteria, Actinobacteria, Sphingobacteriales, Chlamydiae, Bacillus, Leuconostoc, Lactobacillus, Gluconobacter, Acetobacter, Rhizobiales.</i>	[1]

1.3. Factorii care influențează diversitatea microbiană a strugurilor

În lumea vinificației, interacțiunea dintre factorii climatici și gestionarea viței-de-vie joacă un rol crucial în formarea caracteristicilor unice și calității vinurilor. Clima, cu modelele sale meteorologice pe termen lung, exercită o influență profundă asupra viței-de-vie, dictând condițiile ideale pentru cultivarea stilurilor distincte de vin și caracteristici gustative regionale specifice. În același timp, practicile de gestionare a viței-de-vie, ghidate de ingeniozitatea umană și considerațiile de mediu, influențează în continuare producția și compoziția strugurilor, conducând în cele din urmă la crearea vinurilor care evidențiază esența terroir-ului lor [45].

În această secțiune, se prezintă interacțiunea complexă dintre factorii climatici și managementul viței-de-vie, ca aspect al impactului acestora asupra diversității microbiene.

1.3.1. Factorii climatici

Clima reprezintă un factor fundamental care joacă un rol semnificativ în formarea caracteristicilor și calității vinurilor la nivel regional și local. Diferiți factori climatici influențează viticultura și producția de vin prin elemente precum: temperatură, precipitații și radiații solare [46].

Macroclimatul, cunoscut și sub denumirea de climă regională, este determinat în principal de latitudine și altitudine geografică a regiunii. Prezența resurselor de apă precum mări sau lacuri mari pot modera, de asemenea, macroclimatul [38]. Macroclimaturile mai reci sunt mai potrivite pentru producerea vinurilor ușoare și delicate, în timp ce cele mai calde tind să creeze vinuri cu profil gustativ mai bogat și mai corporente.

Mesoclimatul se referă la clima locală a unei vii specifice și este influențată în principal de topografie, incluzând factori precum altitudine, orientare și grad de înclinare a pantei [47]. De

exemplu, orientarea viilor poate afecta căldura și lumina interceptată de vița-de-vie. Pantele mai abrupte, în special, beneficiază de această influență. Mesoclimatul are un impact semnificativ asupra calității și stilului vinului.

Microclimatul reprezintă cea mai mică scară, cuprinzând variații de temperatură, umiditate și solar în interiorul coroanei și între vițe/coarde. Microclimatul poate fi influențat de condițiile solului și umbrirea frunzelor și poate fi gestionat prin tehnici de gestionare a peretelui vegetal al butucului [48]. Microclimatul are un impact profund asupra prezenței, creșterii și activității populațiilor microbiene.

Microorganisme sunt dispersate în principal de forțe fizice precum aerul și vântul, putând fi transportate pe distanțe lungi, integrându-se în nori, precipitații și ecosistemele învecinate [49]. Acest proces de dispersie modelează tiparele biogeografice ale microorganismelor similar plantelor și animalelor [50].

La scară de macroclimat, microbiota mustului de struguri prezintă modele de distribuție regională puternic influențate de condițiile de mediu locale, cum ar fi temperaturile și precipitațiile. Spre exemplu, anumite specii microbiene precum: *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* și *Leuconostocaceae* (*O. oeni*) sunt asociate negativ cu temperaturile maxime și minime medii. Pe de altă parte, ploile și umiditatea se corelează pozitiv cu speciile de drojdii din tipul *Hanseniaspora* și *Metschnikowia*, dar negativ cu *Torulaspora*, *Saccharomyces* și *Meyerozyma* [51]. Aceste asocieri arată cum condițiile climatice locale pot modela compozițiile vinurilor prin impactul lor asupra prezenței microbiene în timpul fermentațiilor.

La nivelul mesoclimatului, consistența calității vinului între recolte este o considerație semnificativă pentru exprimarea *terroir*-ului [52]. Variațiile de recoltă influențează în mod semnificativ comunitățile microbiene la scări geospațiale mici, cum ar fi viile individuale. De exemplu, biodiversitatea populațiilor de drojdii în struguri și must poate fi afectată semnificativ de recoltă [2]. Caracteristicile topografice în mesoclimat exercită, de asemenea, o influență asupra microbiotei strugurilor, așa cum este evidențiat de expuneri diferite în viile cu orientări diferite ale pantelor [53].

Microclimatul are cea mai mare influență directă asupra prezenței, creșterii și activității populațiilor microbiene. Modificarea suprafeței frunzelor de vița-de-vie prin diverse tehnici cum ar fi agrotehnica de întreținere a peretelui vegetal, tăierea, susținerea și defolierea modifică

microclimatul suprafeței foliare, afectând în special radiația solară, mișcarea aerului, umiditatea și temperatura [54]. Aceste variații ale microclimatului pot influența diverse aspecte ale compoziției boabelor, având în cele din urmă impact asupra culorii și aromelor vinului. În timp ce există dovezi care sugerează că variabilitatea microclimatică poate discrimina comunitățile fungice în interiorul viilor, studiile privind efectele specifice ale microclimatului asupra comunităților microbiene sunt relativ rare.

1.3.2. Gestionarea viței-de-vie

Mediul natural al unei vii joacă un rol crucial în determinarea producției și compoziției strugurilor. O gestionare adecvată atentă, bazată pe condițiile locale, poate optimiza calitatea și stilul vinului de-a lungul recoltelor [55-56]. Producătorii de vin aleg cu grijă locurile viilor cu condiții de mediu favorabile, în special în ceea ce privește climatul și solul, pentru a asigura o producție de vin calitativă. În plus, ei selectează de la plantare soiuri de viță-de-vie care se adaptează bine la mediul local [57].

Agronomii de vii lucrează pentru a găsi un echilibru între vigoarea viței și randament prin diverse practici precum: lucrări agrotehnice, tipuri de tăieri, stiluri de conducere, sisteme de suport și metode de management a peretelui vegetal. Aceste intervenții au ca scop obținerea unei recolte sănătoase cu o încărcătură la butuc normată, calitate adecvată a strugurilor, etc. optimizând în cele din urmă calitatea vinului prin aceste acțiuni [58].

În ultima vreme, s-a manifestat un interes crescut pentru gestionarea organică și biodinamică a viilor. Producătorii de vin organic și biodinamic se străduiesc să minimizeze intervențiile chimice sintetice, folosind în schimb procedee și produse naturale. Unele dovezi sugerează că diversitatea microbiană în vinurile organice sau biodinamice poate fi superioară în comparație cu vinurile produse prin metode convenționale [59]. Fermentația spontană și tehnicile de vinificație care încurajează expresia diversității microbiene indigene sunt considerate a îmbunătăți caracteristica *terroir*-ului vinului [60].

Practicile viticole pot influența semnificativ microbiomul subteran. Comunitățile bacteriene din sol sunt structurate în funcție de faptul dacă vița-de-vie este condusă conform sistemelor convenționale, organice sau biodinamice. Adăugarea de compost în viile organice și biodinamice crește diversitatea bacteriană și modifică compoziția comunității microbiomului caracteristic, în special atunci când este combinată cu lucrările de arat și gestionare a culturilor de

acoperire. Similar, diversitatea fungilor din sol în viile biodinamice diferă de cea din viile gestionate convențional. Cu toate acestea, efectul biodinamic asupra diversității fungilor în zonele specifice ale viței-de-vie s-ar putea să nu persiste în must și pe durata fermentațiilor vinicole [61].

Practicile de gestionare agricolă, în special utilizarea fungicidelor [62], pot forma microbiota filosferică. Viile gestionate convențional primesc adesea multiple substanțe fitosanitare, în timp ce viile organice și biodinamice doar substanțe tipice pe bază de sulf și/sau cupru. Studiile realizate de Fazio et al. și Reynolds [63-64] au arătat că viile organice și biodinamice au o diversitate microbiană mai mare pe struguri, incluzând atât drojdii (*Saccharomyces* și non-*Saccharomyces*), cât și fungi filamentoși. Această diferență ar putea fi din cauza tratamentelor chimice din viile convenționale care reduc bogăția și diversitatea microbiană asociată cu vița-de-vie și ulterior cu vinul produs. Aceste efecte pot persista în fermentațiile spontane din musturi organice/biodinamice, unde se observă o bogăție și diversitate mai mare a speciilor de drojdii în comparație cu musturile din viile gestionate convențional, în special pentru speciile fermentative de drojdii precum: *H. uvarum*, *H. vineae*, *H. guilliermondii*, *Streptomyces bacillaris*, *Lachancea thermotolerans* și *S. cerevisiae*.

Este important să se observe că studiile care explorează impactul practicilor viticole asupra diversității microbiene pot furniza rezultate inconsistente. Factori precum condițiile locale ale viilor, practicile specifice de gestionare și diferitele metode de recoltare pot contribui la rezultate variate [65]. Prin urmare, o înțelegere holistică a acestor factori este esențială pentru a evalua cu precizie influența lor asupra diversității microbiene în vii.

Practicile de gestionare a viilor influențează semnificativ diversitatea microbiologică în vii, atât în sol cât și pe suprafața strugurilor. Abordările organice și biodinamice, care minimizează intervențiile chimice sintetice, promit să îmbunătățească bogăția și diversitatea microbiană, contribuind în cele din urmă la expresia *terroir*-ului vinului. Cu toate acestea, este nevoie de mai multă cercetare pentru a înțelege interacțiunile complexe dintre practicile viticole și comunitățile microbiene din vie și cum acestea pot persista și influența calitatea vinului în timpul fermentației și după aceasta.

1.4. Metodele de analiză a diversității microbiene

1.4.1. Dezvoltarea metodelor de cercetare

Convertirea mustului în vin a fost confirmată pentru prima dată ca rezultat al unui proces

microbian de Louis Pasteur în mijlocul secolului al XIX-lea [66]. De atunci, diversitatea microbiotei din vii, struguri și vin a fost investigată în mod extensiv folosind: metode microbiologice tradiționale care implicau microscopia, cultivarea pe diferite medii de cultura și caracteristici biochimice. Cu toate acestea, apariția tehnicilor moleculare bazate pe ADN, cum ar fi: reacția de polimerizare în lanț (PCR) și identificarea genelor marker moleculare a evoluat stabil, astfel, tehnica de analiză bazată pe genele ARN ribozomal (rARN) a îmbunătățit capacitatea de a identifica speciile microbiene cu o rezoluție și o fiabilitate mai înaltă [12].

Genul mic de ARN ribozomal al bacteriilor (16S rARN), precum și gena ITS1-5.8S rARN-ITS2 a fungilor, au fost recunoscute ca standardul de aur pentru estimarea diversității filogenetice în comunitățile microbiene [13]. Prin urmare, de-a lungul ultimilor trei decenii, tehnicile moleculare bazate pe genele rARN drept molecule țintă, au fost folosite împreună cu metodologii dependente de cultură pentru a identifica microorganismele după izolare și creștere în culturi pure [67]. Până în prezent, au fost izolate și identificate folosind metodele tradiționale de cultură mai mult de 40 de specii de drojdii, 50 de specii bacteriene [68] și aproximativ 70 genuri de fungi filamentoase [69] asociate viței-de-vie și a proceselor de fermentație ale vinului. Cu toate acestea, metodele sunt extrem de laborioase, consumatoare de timp și adesea inconsistente și tendențioase [70]. În plus, doar speciile capabile să crească pe mediile de cultură și în condițiile de cultivare utilizate pot fi izolate și identificate, în timp ce speciile aflate într-o concentrație redusă, cele pentru care condițiile prevalente de cultivare nu sunt favorabile, precum și celulele viabile dar non-cultivabile (VBNC) sunt adesea trecute cu vederea. Aceste limitări ale metodelor bazate pe cultură, precum și diferența dintre diversitatea *in vitro* și cea *in situ*, au crescut importanța cercetării abordărilor moleculare independente de cultură [71]. Cu toate acestea, aceste metode rămân importante, deoarece speciile și tulpinile microbiene obținute în astfel de abordări bazate pe cultură pot fi ulterior exploatate în funcție de profilurile biochimice sau genetice ale acestora.

Introducerea metodelor bazate pe PCR a creat noi oportunități pentru dezvoltarea și îmbunătățirea mai multor tehnici în ecologia moleculară. Aplicarea tehnicilor moleculare a permis cercetătorilor să studieze microbii nu pe baza capacității lor de a crește pe anumite tipuri de medii, ci mai degrabă s-a bazat pe prezența acizilor nucleici pentru detectare și identificare selectivă. Astfel de metode folosesc în mare parte ADN extras direct din mediu ca șablon pentru PCR, urmat de separare și detectare pentru profilarea comunității microbiene.

Metodele independente de cultură sunt adesea mai rapide, mai sensibile și au o precizie mai mare decât metodele dependente de cultură [72]. Aceste metode includ: polimorfismele de conformație monocatenară (SSCP), electroforeza în gel cu gradient denaturant (DGGE), polimorfismele de lungime a fragmentelor de restricție terminală (T-RFLP) și analiza automatizată a spațiului intergenic ribozomal (ARISA) [14]. Tehnica PCR-DGGE a fost aplicat pentru prima dată în fermentația vinului de Cocolin et al., pentru a monitoriza diversitatea și dinamica populațiilor de drojdii [15]. De atunci, a rămas cea mai utilizată metodă de profilare a comunității în fermentația vinului, inclusiv a bacteriilor [73]. Tehnica este adesea utilizată în combinație cu metodele dependente de cultură și permit cercetătorilor să descifreze complexitatea și evoluția populației microbiene, în timpul maturării boabelor și pe tot parcursul procesului de fermentație [74]. Cu toate că tehnica PCR-DGGE este considerată în mod obișnuit potrivită pentru analiza mediilor mai puțin bogate în specii, cum ar fi mustul de struguri, are o sensibilitate redusă [75] și nu poate detecta populații care sunt prezente la o abundență relativă <1% din populație [76]. Mai recent, SSCP [77], T-RFLP [78] și ARISA au fost folosite pentru profilarea diversității microbiene din vin. Metodele independente de cultură permit, de asemenea, cercetătorilor să monitorizeze populații sub-reprezentate numeric, precum și cele aflate în starea de VBNC [79]. Este crucial să se monitorizeze astfel de populații, deoarece pot influența calitatea și caracteristicile gustative ale vinului produs.

De exemplu, mai multe studii au demonstrat că tulpinile de *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces baillii* și *Brettanomyces bruxellensis*, expuse la SO₂, pot intra în starea de VBNC și pot supraviețui mai mult de o lună în funcție de pH-ul mediului [80]. În timpul acestei stări, *B. bruxellensis* poate produce fenoli volatili care conferă vinului un iz neplăcut, afectând semnificativ calitățile organoleptice ale produsului finit [81].

Cu toate că metodele independente de cultură au permis cercetătorilor să detecteze și să monitorizeze evoluția comunităților microbiene, identificând specii care anterior nu au fost detectate sau chiar au fost reprezentate incorect prin metodele dependente de cultură [82], fiecare metodă prezintă limitări. Astfel de limitări includ o rezoluție slabă a benzii, migrarea comună a speciilor și parțialitatea amplificării PCR, ceea ce înseamnă că analiza diversității bazată pe aceste metode oferă încă o perspectivă limitată asupra compoziției comunității [83].

Tehnologiile NGS, în special secvențierea de tip amplicon și secvențierea metagenomică, au oferit soluții pentru aceste provocări. Secvențierea metagenomică, care presupune secvențierea întregului ADN dintr-un mediu, este o metodă extrem de puternică pentru explorarea funcțiilor genomice și a metabolomului comunităților microbiene, oferind informații detaliate despre genele implicate în procese metabolice complexe. Totuși, această abordare prezintă dezavantaje, cum ar fi: costuri ridicate, necesitatea unor resurse computaționale mari și dificultăți asociate analizei datelor din probe complexe.

Prin contrast, secvențierea de tip amplicon cu NGS, este o abordare independentă de cultură pentru profilarea taxonomică, filogenetică sau funcțională a comunităților microbiene, realizată prin secvențierea genelor marker specifice amplificate direct din ADN-ul mediului, fără îmbogățirea sau cultivarea prealabilă a populației țintă [84]. Această metodă se concentrează pe regiuni țintă bine definite, cum ar fi ITS pentru fungi sau 16S rRNA pentru bacterii, ceea ce o face mai accesibilă din punct de vedere financiar și mai ușor de implementat pentru analize comparative. Inovațiile în secvențierea de flux înalt, cu ampliconi scurți, sunt revoluționare într-un mod în care pot descrie diversitatea microbială în cadrul și între biomi complexi [16].

Cu toate că tehnologiile de secvențierea de tip amplicon cu NGS au fost larg utilizate pentru investigarea ecologiei microbiene în diverse medii [85], aplicarea acestora în ecologia microbiană a viței-de-vie și fermentației vinului este relativ recentă. Alegerea secvențierii de tip amplicon în acest studiu permite o analiză taxonomică detaliată și identificarea precisă a speciilor microbiene implicate, oferind informații esențiale despre diversitatea și compoziția comunităților microbiene care contribuie la calitatea vinului.

1.4.2. Procesul tehnologic al secvențierii de tip amplicon cu NGS

Prelevarea de probe pentru analiza microbiomului asociat strugurilor poate varia de la câțiva ciorchini la kilograme de struguri [86]. Selecția atentă a strugurilor sănătoși și neafecțați este adesea crucială, cu excepția cazului în care scopul este de a investiga vinuri afectate de *Botrytis Cinerea* [87] și/sau vinuri dulci [88]. Strugurii sunt ulterior zdrobiți în condiții aseptice, iar ADN-ul este extras din mustul rezultat. Selectiv, mostrele pot fi colectate din cramele comerciale sub formă de must de struguri mixt [89]. În câteva studii care au monitorizat dinamica populației în timpul fermentației, au fost prelevate mostre suplimentare la diferite intervale de timp,

reprezentând începutul, mijlocul și sfârșitul fermentației [41]. În mai multe cazuri, volumele de mostre utilizate sunt cuprinse între 5 și 50 ml care apoi sunt utilizate pentru extracții de ADN [90].

Gena țintă – este prezentă universal în toate speciile evaluate și conține fragmente atât bine conservate care facilitează proiectarea primer-ilor PCR care vizează toți membrii unei comunități, cât și regiuni variabile care permit discriminarea diferitelor specii din cadrul comunității [91]. Atât în fungi, cât și în bacterii, genele ARN ribozomic sunt gene țintă potrivite. La bacterii, este vizat în mod tipic ARN-ul ribozomic 16S, în timp ce la fungi regiunile ITS1-5.8S rRNA-ITS2, precum și 26S rRNA sunt moleculele țintă pentru secvențierea ampliconului la scară largă și analizele microbiomului. Experimental din 9 regiuni hipervariabile (notate V1–V9) de bacterii au fost vizate toate pentru estimarea diversității bacteriene în vița-de-vie [92-96]. În funcție de regiunea secvențiată, datele pot fi similare sau pot varia semnificativ. De exemplu, într-un studiu care a comparat regiunea V4 și V5 [97], s-a constatat că regiunile au condus la o compoziție bacteriană similară, cu variații minore la nivelul taxonomilor inferiori; cu toate acestea, regiunea V4 a furnizat o acuratețe taxonomică mai mare pentru anumite specii din Proteobacteria și de bacterii lactice (LAB). În schimb, Campanaro et al., au vizat regiunile V3–V4 și V5–V6 ale secvențierii ARNr 16S și au evaluat comunitatea bacteriană asociată cu boștina de struguri după zdrobire și la 30 de zile post-fermentație/depozitare. Au fost identificate în total 89 de genuri, însă doar 31 dintre acestea erau comune în ambele regiuni țintă evaluate [98].

Regiunile ITS ale fungilor sunt cele mai frecvent vizate pentru estimarea diversității fungice [99-102] și genele parțiale ale ARNr 18S [103-106] – aspect folosit în clasificarea fungilor generali și a micorizei arbusculare. Populațiile de micorize arbusculare derivate din aceste ținte diferite au fost similare în genuri și au arătat diferențe de compoziție în mostrele evaluate, evidențiindu-le pe toate ca ținte potrivite pentru evaluarea AMF [107]. Mai mult, Pinto et al., au vizat atât regiunea ITS2, cât și domeniul D2 al regiunii ARNr 26S pentru analiza comunității fungice. Rezultatele au arătat că adâncimea taxonomică pentru cele două regiuni evaluate a fost considerabil similară, cu toate că doar o parte din OTU-urile observate erau comune între cele două regiuni, și în general, regiunea ITS a furnizat o acoperire ușor mai mare [108]. Bokulich și Mills au evaluat, mai mulți primeri ITS și au constatat că vizarea regiunii ITS1 demonstrează niveluri mai ridicate de acuratețe în clasificare taxonomică per specie și gen; cea mai mică diferență între lungimile ampliconilor *Ascomycota* și *Basidiomycota*; precum și o acoperire

secvențială maximizată. Prin urmare, în ansamblu, locul ITS1 pare a fi cea mai promițătoare țintă pentru o privire completă asupra populațiilor microbiene în studiile ecologice [99].

Analiza datelor de secvențiere a ampliconilor trece în mod obișnuit prin trei etape de bază:

- (a) *Quality trimming* și *denoising*: „*Quality trimming*” se referă la procesul de utilizare a unui program pentru a tăia secvențele de citire cu calitate scăzută. Ideea este să se taie secvențele la una sau ambele capete astfel încât să rămână doar o regiune de baze de înaltă calitate. "*Denoising*" se referă la o metodă computațională pentru eliminarea erorilor de secvență prin citirea ampliconilor sau, echivalent, identificarea secvențelor biologice corecte în citiri;
- (b) Alegerea/cluster-izarea OTU-urilor;
- (c) Atribuirea taxonomică.

"*Quality trimming*" este o etapă esențială utilizată pentru a elimina citirile eronate obținute prin PCR, instrumentele de secvențiere și chimia din spatele reacțiilor de secvențiere [17]. Pentru a minimiza volumul de date pentru adnotare, cluster-izare și alegere a OTU-urilor, se utilizează cluster-ingul. În timpul cluster-izării, se realizează o comparație pair-wise a secvențelor cu o anumită valoare a pragului de identitate procentuală. Ulterior, se alege și se adnotează un singur reprezentant al secvențelor foarte similare prin algoritmi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sau BLAT (BLAST-Like Alignment Tool). OTU-urile pot fi procesate printr-o abordare de alegere a OTU-urilor cu referință deschisă sau cu referință închisă. Atribuirea speciilor sau adnotarea genelor funcționale se bazează pe similaritatea procentuală față de secvențele din baze de date specifice, cum ar fi Green-genes, UNITE, SILVA, NCBI, SWISSPROT etc. Analiza datelor provenite de la pirosecvențiere în timpul reducerii calității implică în mod obișnuit îndepărtarea codurilor de bare, adaptor-ilor și primer-ilor, urmată de de-zgomotire, utilizată pentru corectarea problemelor asociate în mod specific cu pirosecvențierea. Acestea includ în mod obișnuit eliminarea secvențelor cu ≥ 6 homopolimeri, baze ambigue și cele care nu îndeplinesc un scor Phred de 20–30 unități. În plus, se pot elimina secvențe de lungime minimă și maximă, în funcție de regiunea țintă și de secvențele chimere posibile [18].

Datele provenite de la platformele de secvențiere Illumina trec prin aceeași demultiplexare și tăiere a calității, cu excepția de-zgomotirii. Citirile sunt, în mod obișnuit, trunchiate pentru ≥ 3 baze consecutive cu o calitate $< 1e-5$ și eliminate atunci când conțin apeluri de baze ambigue, erori de primer/cod de bare sau un scor Phred $< 20-30$ unități. În plus, pentru secvențierea tip

paired-end, citirile sunt, în mod obișnuit, îmbinate după tăierea calității înainte de alegerea OTU-urilor, cu toate secvențele reținute, chiar și cele care nu se suprapun.

Predicția funcțiilor genelor – tehnica NGS a facilitat progrese semnificative în înțelegerea ecologiei microbiene și este acum răspândită în aplicații biotehnologice de la medicina personalizată la bioenergie. Markerii precum gena ARNr 16S (16S) a bacteriilor și arheelor sunt frecvent utilizați pentru a caracteriza compoziția taxonomică și diversitatea filogenetică a probelor de mediu. Deoarece studiile cu markeri genetici se concentrează pe o genă sau câteva gene universale, care nu pot identifica direct capacitățile metabolice sau funcționale ale microorganismelor aflate în studiu. În schimb, secvențierea metagenomică își propune să preleveze toate genele dintr-o comunitate și poate furniza profiluri metabolice și funcționale detaliate ale acestora. Deși este nevoie de relativ puțină secvențiere pentru a caracteriza diversitatea unei probe, SM profundă și, prin urmare, costisitoare, este necesară pentru a accesa organisme și gene rare. Astfel, profilarea genelor marker în colecții mari de mostre este acum o practică obișnuită, dar secvențierea metagenomică profundă pe un număr mare de mostre este prohibitiv de costisitoare [19].

Prin urmare, au fost create multe instrumente de predicție a funcțiilor genelor, precum PICRUSt și FUNGuild, care au fost/sunt pe larg utilizate în domeniul diversității microbiene asociate produselor vitivinicole.

1.5. Folosirea resurselor microbiene în producția de vinuri

Printre tendințele inovatoare din sectorul vinicol, explorarea continuă a proprietăților enologice asociate resurselor microbiene ale vinului reprezintă un factor esențial pentru îmbunătățirea calității acestuia. De la apariția tehnologiei culturilor starter, atenția s-a concentrat asupra biodiversității intraspecifice în cadrul speciilor principale responsabile de fermentația alcoolică (*Saccharomyces cerevisiae*) și, ulterior, pentru așa-numita „fermentație malolactică” (*Oenococcus oeni*).

Cu toate acestea, în ultimul deceniu, un număr semnificativ de studii au propus exploatarea enologică a unui număr tot mai mare de specii (levuri non-*Saccharomyces*) asociate fermentației spontane în vin. Aceste noi specii/tulpini pot oferi soluții tehnologice la probleme specifice și/sau pot îmbunătăți caracteristicile senzoriale, cum ar fi complexitatea, senzația în gust/postgust și aroma vinurilor. În continuare sunt descrise soluții practice propuse pentru îmbunătățirea calității, siguranței și terroir-ului vinurilor.

1.5.1. Îmbunătățirea calității vinurilor prin utilizarea drojdiilor non-*Saccharomyces*

Piața mondială a vinului cunoaște un interes tot mai mare pentru noile tulpini de levuri care pot produce vinuri unice cu proprietăți senzoriale noi și unice [109]. Levurile non-*Saccharomyces* au atras atenția în producția de vinuri datorită efectelor lor benefice la nivel organoleptic și pentru că consumatorii cer noi stiluri de vin specifice regiunii și podgoriilor viticole [11].

Recent, unii producători comerciali de levuri au inclus deja levuri non-*Saccharomyces* în portofoliul lor de produse oenologice [7]. Principalele proprietăți enologice ale unor levuri non-*Saccharomyces* disponibile comercial sunt prezentate în Tabelul 1.3.

Tabelul 1.3. Aplicații ale levurilor non-*Saccharomyces* în îmbunătățirea calității vinului

Rezultat scontat al aplicării tehnologice	Resurse microbiene utilizate	Referință
Reducerea concentrației în masă a acidității volatile	<i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida zemplinina</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida stellata</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Hanseniaspora uvarum</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[119]
Reducerea titrului alcoolic volumic	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida stellata</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida zemplinina</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[120]
Modularea acidității	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> + <i>Lachancea thermotolerans</i> <i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i> <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	[121]
Creșterea conținutului de glicerol	<i>Candida stellata</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pichia fermentans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Candida zemplinina</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Lachancea thermotolerans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[122]
Modularea profilului aromatic	<i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Zygotorulaspora florentina</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Hanseniaspora vineae</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[3]
Îmbunătățirea aromelor varietale	<i>Pichia kluyveri</i> and <i>Candida zemplinina</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Metschnikowia pulcherrima</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , and <i>Lachancea thermotolerans</i>	[123]

Beneficiul principal al utilizării culturilor starter complementare de drojdii în producția de vin constă în îmbunătățirea complexității aromatice [110]. Levurile non-*Saccharomyces* posedă activități enzimatică care pot cataliza eliberarea de compuși aromați volatili din precursorii nevolatili complexi. Aceste levuri pot afecta producția de arome direct prin activitatea lor metabolică proprie (producția de alcooli și esteri) sau prin eliberarea de enzime extracelulare care transformă metaboliții derivați de la *S. cerevisiae*. De asemenea, s-a arătat că tulpinile de levuri non-*Saccharomyces* au potențialul de a produce compuși aromatici care nu sunt asociați cu fermentația realizată de multe tulpini de tipul *S. cerevisiae*, cum ar fi diverși monoterpeni și alți compuși terpenoizi [111]. În plus, utilizarea levurilor non-*Saccharomyces* a fost propusă pentru a îmbunătăți conținutul de glicerol sau mannoproteine, aciditatea volatilă sau stabilitatea culorii [112] sau pentru a reduce nivelurile de etanol din vinuri [113]. Pe de altă parte, au existat numeroase cercetări privind izolarea și caracterizarea tulpinilor de drojdii care descompun acidul malic, ca alternativă la starterele de fermentație malolactică bazate pe bacterii [114]. Caracteristicile pozitive ale levurilor non-*Saccharomyces* au fost evidențiate în ceea ce privește producerea de metaboliți benefici pentru calitatea și stabilitatea vinului. Acesta este cazul levurilor producătoare de molecule extracelulare active, capabile să contracareze dezvoltarea microorganismelor sălbatice de deteriorare [115].

Cu toate acestea, majoritatea levurilor non-*Saccharomyces* nu pot fermenta până la „sec” (concentrația în masă a zahărului rezidual $< 4 \text{ g/dm}^3$), astfel că *S. cerevisiae* ar trebui, de asemenea, inoculată. Au fost propuse și utilizate două moduri de inoculare: primul este cunoscut sub denumirea de co-inoculare, iar unele studii au arătat că inocularea de levuri non-*Saccharomyces* selectate la o concentrație celulară ridicată împreună cu *S. cerevisiae* poate produce vinuri cu caracteristici distincte evitând întreruperile de fermentație alcoolică [116]. Alți cercetători au explorat utilizarea levurilor non-*Saccharomyces* în inoculări secvențiale ale levurilor non-*Saccharomyces* inițial inoculate în concentrații mari și care fermentează singure pentru o anumită perioadă de timp înainte ca *S. cerevisiae* să fie adăugată pentru a prelua fermentația. Această practică oferă levurilor non-*Saccharomyces* mai mult timp să-și exprime amprenta metabolică distinctă, ne inhibată de stresul competiției cu *Saccharomyces* [117]. Mai mult, efectele levurii non-*Saccharomyces* asupra fermentației și calității vinului au depins în mod strict de raportul de inoculare *Saccharomyces*/non-*Saccharomyces* [118].

Metaboliții levuri non-*Saccharomyces* oferă noi posibilități pentru îmbunătățirea aromelor vinului și pentru adaptarea la cerințele pieței, evidențiindu-se în mod special în tendințele de vinuri organice și cu conținut redus de alcool. Aceste levuri pot elibera compuși monoterpenici și esteri volatili, amplificând caracteristicile soiurilor aromatice (precum Riesling sau Muscat) și conferind soiurilor neutre (precum Chardonnay) o complexitate mai mare și o atractivitate sporită pe piață. De asemenea, ele pot reduce rata de conversie a zahărului și genera mai mult glicerină, scăzând astfel conținutul de alcool și răspunzând cerințelor pieței de vinuri cu conținut redus de alcool, orientate către un mod de viață cât mai sănătos al populației. În același timp, levurile non-*Saccharomyces* au potențialul de a crește aciditatea, de a reduce necesitatea administrării acidului tartric cu rol de acidifiant tehnologic și de a inhiba activitatea microorganismelor nefavorabile prin producerea de metaboliți antimicrobieni naturali, diminuând astfel dependența de dioxidul de sulf. În fața provocărilor generate de schimbările climatice, cum ar fi nivelurile ridicate de zahăr și aciditatea scăzută, aceste levuri pot îmbunătăți calitatea vinurilor prin reglarea conținutului de glicerină și acid lactic, demonstrând un potențial semnificativ în inovația aromatică, sustenabilitatea sănătății și adaptabilitatea climatică.

1.5.2. Reducerea cantității de SO₂ administrate în vinurile cu bioprotecție

În industria vinicolă, dioxidul de sulf (SO₂) este folosit în mod obișnuit ca aditiv datorită proprietăților sale antimicrobiene, antioxidante și antioxidazice [123-124]. Acest compus inhibă eficient creșterea microorganismelor nedorite din vin, promovând dominația levurii *Saccharomyces cerevisiae*, care sunt mai tolerate la SO₂. Ca agent de reducere puternic, SO₂ reacționează cu oxigenul, determinând o apărare primară împotriva oxidării mustului sau vinului. În plus, poate inhiba enzimele precum tirozinaza sau laccaza, care contribuie la oxidarea enzimatică a polifenolilor. Aceste trei caracteristici fac din SO₂ o unealtă esențială pentru mulți vinificatori. Cu toate acestea, există o cerere tot mai mare din partea consumatorilor pentru produse mai naturale, cu aditivi minimi, iar SO₂ poate avea potențiale efecte negative asupra sănătății, în special la persoanele sensibile sau cele cu astm. Aceste efecte pot include dureri de cap, iritarea căilor respiratorii și disconfort gastrointestinal (dureri abdominale și diaree) [125-126].

În 2009, Regulamentul CE 606/2009 a stabilit concentrația maximă de SO₂ la 150 mg/dm³ în vinurile roșii seci. În plus, Directiva Europeană 2003/89/CE impune specificarea prezenței sulfiților pe eticheta produsului atunci când concentrația lor depășește 10 mg/dm³ de SO₂. În

conformitate cu limitele stabilite în Uniunea Europeană, Organizația Internațională a Viei și a Vinului (OIVV) a publicat limitele maxime acceptabile ale conținutului de sulf în 2012, stabilind concentrația maximă de SO₂ în vinurile roșii la 150 mg/dm³, în albe și roze de 200 mg/dm³.

Având în vedere contextul actual, în care reglementările și preferințele consumatorilor solicită reducerea sau eliminarea sulfiților în vinuri, se explorează diverse alternative pentru a îndeplini aceste obiective. Etapele inițiale ale procesului de vinificație, înainte de dominația levurilor *S. cerevisiae*, prezintă un risc ridicat pentru dezvoltarea microorganismelor de alterare a alimentelor. Această etapă critică este locul unde activitatea antimicrobiană a anhidridei sulfuroase este crucială. Pentru a înlocui funcția antimicrobiană a SO₂, o opțiune potențială, luată în considerare, este utilizarea agenților de bioprotecție. Aceste microorganisme contribuie la prevenirea alterării alimentelor prin diferite mecanisme, inclusiv producerea de compuși antimicrobieni și competiția pentru proliferare, nutrienți și oxigen [127]. Unele microorganisme pot limita accesul competitorilor la nutrienți prin secreția de enzime digestive sau siderofore [128].

Specii de levuri non-*Saccharomyces*, cum ar fi *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia fructicola*, *Torulaspora delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans* și *Pichia kluyveri* sunt acum comercializate ca tulpini de bioprotecție [129]. Scott Simonin et al. au cercetat utilizarea *Metschnikowia pulcherrima* ca levură de bioprotecție la diferite temperaturi și intervale de timp, concentrându-se pe soiul Chardonnay. Rezultatele au demonstrat că temperaturile mai mici sau egale cu 12°C sunt mai potrivite pentru strategia de bioprotecție a vinurilor albe, iar caracteristicile enologice nu sunt semnificativ diferite față de vinurile tratate cu SO₂, deși s-au observat diferențe senzoriale specifice în funcție de cramă [130]. Rubio-Breton et al. au testat un amestec de două microorganisme, *Lactobacillus plantarum* și *Lachancea thermotolerans*, pentru bioprotecție și au constatat că vinurile rezultate prezentau arome de fructe negre, zmeură și lactate [124].

Generalizând, levurile non-*Saccharomyces* au determinat îmbunătățirea aromelor de fructe, iar această funcție a fost validată în numeroase experimente de păstrare a vinului roșu organic. Sara Windholtz et al. au studiat efectele lui *Torulaspora delbrueckii* singur și în inoculare mixtă cu *Metschnikowia pulcherrima* ca strategie de bioprotecție, iar rezultatele au arătat că ambele strategii de inoculare au contribuit la exprimarea fructuozității și complexității vinului. În plus, s-a dovedit că *Torulaspora delbrueckii* este un candidat promițător pentru colonizarea mustului și reducerea defectelor vinului.

Explorând aceste abordări alternative, vinificatorii pot continua să producă vinuri de înaltă calitate, conformându-se cerințelor consumatorilor pentru produse mai naturale cu niveluri reduse sau excluse de sulf. Utilizarea agenților de bioprotecție oferă o cale interesantă pentru menținerea calității vinului și exprimarea unor arome și arome unice, minimizând totodată utilizarea aditivilor.

1.5.3 Explorarea terroir-ului local prin MLI

MLI sau „Pied-de-cuve” (PdC) în franceză este o tehnică tradițională de vinificație folosită pentru a introduce levuri selectate sau a iniția fermentația dintr-un must deja în fermentare. Termenul provine din expresia franceză care înseamnă „partea de jos a recipientului”, referindu-se la un volum mic (de obicei 5-10 %) depus la fundul unui recipient. Metoda PdC implică pre-fermentarea mustului în partea de jos a recipientului pentru a îmbogăți populația de levuri cu o activitate de fermentare ridicată. Volumul rămas al depozitului este apoi completat cu must proaspăt. Mustul de fermentare inițial ar trebui să aibă o concentrație foarte mare de levuri active, de obicei între 10^7 și 10^8 celule/cm³, pentru a facilita fermentația mustului nou [131].

Tradițional, cramele aplică această tehnică pentru a asigura un început rapid al fermentației și o rată bună de fermentare. PdC poate proveni de la o singură cultură de levuri, adesea o tulpină selectată în laborator, care trebuie propagată în medii adecvate pentru a atinge un volum suficient pentru a fi folosită ca PdC. În acest caz, tulpina selectată preia fermentația și își transmite caracteristicile enologice vinului final. Propagarea levuri pentru PdC necesită un laborator cu condiții minime de sterilitate și poate dura câteva zile.

Alternativ, PdC poate proveni din cisterne care fermentează deja spontan, folosind, de exemplu, struguri culeși anterior. În acest scop, PdC ar fi rezultatul unei inoculări mixte, reflectând potențial complexitatea și tipicitatea *terroir*-ului microbial din vinul final. Cantitatea și persistența speciilor autohtone în fermentațiile spontane pot influența caracterul și aroma vinului rezultat. Tabelul 1.4 enumeră unele efecte ale levurilor non-*Saccharomyces* asupra aspectului senzorial al vinului, ceea ce poate explica faptul că utilizarea tehnicii PdC pentru fermentația naturală poate produce un vin cu arome mai complexe, comparativ cu metoda tradițională cu LSA.

Deși există studii limitate care raportează rezultate referitoare la inocularea cu PdC, unele au evidențiat rezultate promițătoare. Spre exemplu, utilizarea PdC a fost asociată cu o scădere a acidului acetic în comparație cu inocularea directă a levurii seci active rehidratate.

Tabelul 1.4. Metaboliții produși de speciile non-*Saccharomyces* și caracteristicile senzoriale

Specii non- <i>Saccharomyces</i>	Metabolit	Repercursiuni senzoriale	Referință
<i>Hanseniaspora vineae</i>	Acetat de benzil	Aromă florală de iasomie	[133-134]
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Acetat de 2-feniletil	Note florale, sugestii de petale de trandafir	[135]
	Lactat de etil	Căpșuni, caramel	
	Acid lactic	Aciditate citrică	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Acetat de 2-feniletil	Note florale, sugestii de petale de trandafir	[136]
	Monoterpeni	Floral	
<i>Pichia kluyveri</i>	Mercaptohexanol	Greipfrut, fructul pasiunii	[137]
	Acetat de mercaptohexil	Greipfrut, fructul pasiunii	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Piruvat	Pigmenți stabili	[138]
	Manoproteine	Mai bună structură, îmblânzirea astringenței	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Acetat de 2-feniletil	Flori, miere	[139]
	Etil hexanoat	Măr	
	3-Etoxi-1-propanol	Coacăze negre, solvent	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Acetat de 2-feniletil	Flori, miere	[140]
	Acetat de isoamil	Banană	
	Acetat de etil	Fructat	

În plus, strugurii zdrobiți cu adăugarea de etanol, cunoscuți sub denumirea de PdC fortificat, au fost utilizați cu succes pentru a accelera fermentația alcoolică spontană și a îmbunătăți profilul senzorial al vinurilor roșii.

Impactul PdC asupra diversității comunității de levuri endogene în timpul fermentației alcoolice sau asupra calității vinului este în mare parte necunoscut. Studii suplimentare sunt necesare pentru a evalua implementarea PdC în controlul fermentației alcoolice, păstrând în același timp tipicitatea și calitatea vinului final [132, 141].

1.6. Concluzii la Capitolul I

Utilizarea resurselor microbiene în producția de vinuri a apărut ca un factor semnificativ de inovație și îmbunătățire a calității în industria vinicolă. Cu accent atât pe *Saccharomyces cerevisiae*, cât și pe speciile de levuri non-*Saccharomyces*, vinificatorii explorează o gamă diversă de opțiuni pentru a îmbunătăți caracteristicile vinului și a răspunde preferințelor în continuă schimbare ale consumatorilor.

Cercetătorii s-au concentrat în principal pe levurile *S. cerevisiae*, dar în ultimii ani, levurile non-*Saccharomyces* au ajuns în prim-plan datorită efectelor lor benefice unice asupra calității și aromaticii vinului. Aceste levuri oferă o complexitate aromatică îmbunătățită, posibilă modulare a caracteristicilor vinului și potențialul de a reduce aciditatea volatilă și nivelurile de alcool etilic sumar. Prin introducerea de levuri complementare, vinificatorii pot crea vinuri cu profile senzoriale distincte și autentice, satisfăcând astfel, cererea tot mai mare pentru stiluri noi de vinuri ale consumatorilor și trend-urilor de pe piața mondială a vinurilor.

Mai mult, agenții de bioprotecție, în special anumite specii de levuri non-*Saccharomyces*, au descris posibilitatea înlocuirii de SO₂ ca mijloc natural de prevenire a alterării în timpul producției de vin. Acest lucru răspunde preferințelor consumatorilor pentru vinuri cu aditivi minimi, păstrând în același timp calitatea și îmbunătățind aromele fructate ale acestora.

Tehnica MLI (PdC) prezintă o modalitate intrigantă de explorare a *terroir*-ului local și de exprimare a unor arome și gusturi unice în vinuri. Prin valorificarea diversității microbiene prezente în fermentațiile spontane, vinificatorii pot îmbunătăți în continuare tipicitatea și complexitatea produselor lor, adaptându-se cerințelor tot mai exigente ale consumatorilor.

Pe măsură ce industria vinicolă continuă să evolueze, adoptarea resurselor microbiene reprezintă o oportunitate captivantă pentru vinificatori de a crea vinuri excepționale, în concordanță cu tendințele pieței și cu așteptările consumatorilor. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări și experimente suplimentare pentru a înțelege pe deplin potențialul acestor resurse microbiene și influența lor asupra dinamicii fermentației, calității vinului și exprimării *terroir*-ului.

În concluzie, aplicarea resurselor microbiene în producția de vinuri semnifică o trecere progresivă către practici durabile și inovatoare care majorează calitatea vinului, păstrează tradiția și se adaptează preferințelor în schimbare ale consumatorilor de vin din întreaga lume. Prin adoptarea diversității bogate de microorganisme specifice arealului de cultivare a viței-de-vie, vinificatorii pot începe o călătorie captivantă pentru a descoperi noi dimensiuni ale gustului, aromei și caracterului în vinurile pe care le creează/elaborează.

Reieșind din cele expuse, scopul prezentului studiu, constă în studierea diversității microbiene ale strugurilor din cele trei zone IGP din Republica Moldova și folosirea resurselor microbiene în procesul de producție a vinurilor.

II. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Cercetările privind cantitatea de microorganisme din struguri au fost efectuate în cadrul proiectului „Struguri de calitate” al ONVV, în laboratorul SARCO/EXCELL (Franța). Studiile privind calitatea microbiană au fost realizate la compania Tinygene, Ltd. (Shanghai, China).

Procesul practic s-a realizat la întreprinderea vinicolă ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L. Dezvoltarea vinului „Native de Purcari” a implicat analiza proprietăților vinului, realizată în cadrul întreprinderii mixte moldo-franceză LACO-ALFATEC S.R.L. și laboratoarele Centrului de Cercetări Oenologice, Facultatea Tehnologia Alimentelor a Universității Tehnice a Moldovei, precum și la Institutul de Cercetare al Plantelor și Animalelor Speciale al Academiei de Științe Agricole din China.

2.1. Studiul microbiologic

Cercetarea microbiologică se împarte în studiul cantitativ și calitativ al microorganismelor, precum și în analiza factorilor care influențează microorganismele, incluzând factori naturali și umani. Studiul calitativ a analizat diversitatea microbiană a trei soiuri de struguri provenite din cele trei regiuni IGP.

2.1.1. Cercetări cantitative

Recoltarea strugurilor: prelevarea probelor de studiu a avut loc în perioada când strugurii au atins maturitatea tehnologică. Procesul de colectare a probelor a fost efectuat în condiții sterile, aceștia au fost transportați în laboratorul de analiză la temperatura de - 20°C. Fiecare probă a fost colectată în cantitate de 1 kg de struguri.

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 ani de recoltă, astfel încât să ofere o imagine cât mai completă asupra variabilității microbiomului asociat cu vița-de-vie.

În total, 29 de probe din recoltele anilor 2018, 2019 și 2020 au fost utilizate pentru studiul cantitativ al microbiomului. Aceste mostre au fost grupate pe baza a trei criterii principale: soiul de struguri, anul recoltei și regiunea IGP din care au fost prelevate. Această clasificare permite o analiză detaliată a modului în care diferiți factori influențează diversitatea și compoziția microbiomului asociat cu strugurii.

Pentru analiza factorilor influențatori, au fost selectate două categorii de mostre. Prima categorie include factorii climatici, reprezentată de 9 probe de struguri din soiul autohton Fetească Neagră, recoltate în anii 2018, 2019 și 2020, din cele trei regiuni IGP: Codru (FN_C), Valul lui Traian (FN_VLT) și Ștefan Vodă (FN_SV). Aceste probe oferă informații esențiale despre influența condițiilor climatice asupra microbiomului strugurilor în diferite zone și ani.

Detaliile specifice legate de colectarea mostrelor pentru fiecare analiză sunt prezentate în tabelul 2.1, oferind un cadru clar și detaliat pentru înțelegerea metodologiei utilizate în acest studiu.

Tabelul 2.1. Informații despre prelevarea mostrelor

Cod	Soiul ampelografic	Anul recoltei	IGP	Locul de prelevare a mostrelor
FN_C	Fetească Neagră	2018 2019 2020	IGP Codru	(N47.31, E27.98)
FA_C	Fetească Albă	2018 2019 2020		(N47.06, E28.51)
SA_C	Sauvignon	2018 2019 2020		(N47.22, E28.52)
CCS	Cabernet Sauvignon	2022		(N47.30, E27.98)
CCH	Chardonnay	2022		(N47.30, E27.96)
CFN	Fetească Neagră	2022		(N47.31, E27.98)
FN_VLT	Fetească Neagră	2018 2019 2020	IGP Valul lui Traian	(N46.39, E28.73)
FA_VLT	Fetească Albă	2018 2019 2020		(N46.19, E28.47)
ME_VLT	Merlot	2018 2019 2020		(N45.65, E28.47)
VCS	Cabernet Sauvignon	2022		(N46.40, E28.73)
VCH	Chardonnay	2022		(N46.40, E28.70)
VFN	Fetească Neagră	2022		(N46.39, E28.73)
FN_SV	Fetească Neagră	2018 2019 2020	IGP Ștefan Vodă	(N46.53, E29.87)
CF_SV	Cabernet Franc	2018		(N46.48, E29.94)
PN_SV	Pinot Noir	2019 2020		(N46.46, E29.90)
RN_SV	Fetească Neagră	2018		(N46.43, E29.84)
VI_SV	Viorica	2019 2020		(N46.46, E29.92)
CN_SV	Couderc Noir	2019 2020		(N46.53, E29.87)
SCS	Cabernet Sauvignon	2022		(N46.52, E29.87)
SCH	Chardonnay	2022		(N46.53, E29.88)
SFN	Fetească Neagră	2022		(N46.53, E29.87)

A doua categorie se referă la tratamentele fitosanitare, un factor uman esențial, și a inclus 10 probe de struguri recoltate în anul 2020 din zece podgorii situate în cele trei regiuni IGP. Aceste mostre permit evaluarea impactului produselor fitosanitare asupra microbiomului și ajută la

înțelegerea modului în care intervențiile umane pot modifica compoziția microbiană a strugurilor.

Pentru secvențierea NGS, au fost selectate 9 probe (CCS, CCH, CFN, SCS, SCH, SFN, VCS, VCH, VFN) din anul 2022, reprezentând trei soiuri de struguri din cele trei regiuni IGP. Aceste mostre au fost esențiale pentru obținerea unei imagini detaliate a diversității microbiene la nivel molecular și pentru identificarea specificității microbiene care poate influența caracteristicile terroir-ului.

Pregătirea preliminară a probelor pentru analize a inclus următoarele etape de studiu:

Spălarea suprafeței bobului a inclus spălarea a 300 g boabe, care au fost supuse unui tratament cu o soluție ce conținea 10 g/dm³ Bacto Soytone și 2 cm³/dm³ Tween 80. Acest proces a fost efectuat la o temperatură constantă de 30°C, cu agitare continuă timp de 3 ore. Scopul acestui procedeu a fost de a asigura o curățare eficientă a suprafeței bobului, eliminând astfel contaminanții externi și permițând o evaluare precisă a microbiotei asociate suprafeței strugurilor.

Obținerea mustului prin zdrobirea manuală a 100 boabe de struguri imediat după recoltare. Această procedură a fost realizată pentru a menține microbiomul prezent în interiorul strugurilor, esențial pentru studiul proceselor microbiologice și fermentative care au loc în must.

Fermentația spontană a mustului obținut prin zdrobirea manuală a strugurilor de studiu, după care a fost inițiată fermentația spontană la o temperatură controlată de 26°C. În timpul procesului de fermentație, la momentul în care concentrația de zahăr a scăzut cu aproximativ 1 °Brix, au fost prelevate 50 cm³ de must pentru secvențierea NGS. Aceste mostre de must au fost stocate la o temperatură de - 80°C până la momentul extracției ADN-ului, pentru a asigura conservarea integrală a microbiotei strugurilor și vinului.

Metodele de cuantificare a microorganismelor au inclus 2 metode:

Metoda 1. Analiza cantitativă prin microscopia cu epifluorescență în baza unui protocol și materiale dezvoltate de Chemunex pentru numărarea microorganismelor viabile. Mostrele de la apa de spălare și cele de must au fost filtrate printr-o membrană (Chemfilter CB04), care apoi a fost incubată 30 de minute în întuneric la 30 °C. Substratul inițial non-fluorescent este scindat de un sistem enzimatic celular cu eliberare de fluorocrom. Acesta din urmă excitat de radiația luminii de lungime de undă adecvată (ultraviolet la 480 nm) emite fluorescență verde. Plasată între lamă și lamelă, membrana a fost observată folosind un microscop epifluorescent (Olympus BX51), cu o mărire de 1000 și un filtru adecvat (Olympus 467803) [142].

Metoda 2. Analiza cantitativă pe medii de cultură specifice în care au fost numărate drojdiile în mostrele de spălare a strugurilor și must. În ceștile Petri separat au fost plasate mostrele de apă de spălare și must cu 10 g/dm³ extract de levuri, 10 g/dm³ bacteryphton, 20 g/dm³ glucoză, 25 g/dm³ agar și 0,015% biphenil. Pentru bacteriile LAB, mediul de cultură a conținut 500 ml/dm³ suc de struguri, 5 g/dm³ extract de drojdii, 2 ml/dm³ Tween 80 și 20 g/dm³ agar. Pentru creșterea bacteriilor AAB, s-a folosit un mediu similar, suplimentat cu 30 mg/dm³ penicilină.

Pentru metoda de numărare directă, mostrele de la apa de spălare a fost filtrată și transferată într-un tub de test, volumul fiind referit ca V. Populația de levuri a fost calculată din formula [5]:

$$CFU/bob = \frac{C \times V \times m}{M} \quad (2.1)$$

unde: C - numărul de unități formative de colonii (CFU) per cm³,

V - volumul diluției,

m - greutatea medie a boabelor,

M - greutatea totală a boabelor.

2.1.2. Cuantificarea factorilor de influență

Calcularea indicelui helioclomatic Huglin (HI) prin expresia [143]:

$$HI = \sum_{01.04}^{30.09} \frac{[(T-10)+(T_x-10)]}{2} d \quad (2.2)$$

unde: T - temperatura medie a aerului (°C),

T_x- temperatura maximă a aerului (°C),

d - coeficientul lungimii zile.

Indicele este calculat din mediile climatice lunare. În emisfera nordică: CI (Indicele de noapte răcoroasă) = temperatura minimă a aerului din luna septembrie (media minimelor) în °C.

Indicele potențialului de echilibru hidric Riou, adaptat la condițiile precise de calcul descrise mai jos, numit indice de ariditate și se calculează folosind:

$$W = W_0 + P - T_v - E_s \quad (2.3)$$

unde: W este estimarea rezervei de apă din sol la sfârșitul unei perioade date,

W₀ -rezerva inițială de apă utilă din sol, care poate fi accesată de rădăcini,

P - precipitațiile,

T_v - transpirația potențială în vie,

E_s - evaporarea directă din sol.

Indicele de ariditate (DI) este calculat pe baza unei perioade de 6 luni, aceeași utilizată pentru HI descris mai sus, care este acceptabilă pentru cea mai mare parte a viilor din lume. Valorile lui W în momentul inițial și final, și data inițială și finală, conform emisferei. În emisfera nordică, perioada este de la 1 aprilie până la 1 octombrie, în emisfera sudică este de la 30 septembrie până la 31 martie. În momentul inițial, $W=W_0$, în momentul final, $W=DI$.

În formula anterioară, T_v și E_s sunt calculate lună de lună folosind:

$$T_k = ETPk \quad (2.4)$$

unde: ETP – evapo-transpirația potențială (total lunar), folosind metoda Penman [142],

k – coeficientul de absorbție a radiației de către planta de viță-de-vie (care este în relație cu retranspirația și depinde de arhitectura viței-de-vie)

$$E_s = \frac{ETP}{N} (1 - k)JPm \quad (2.5)$$

unde: N – numărul de zile din lună, JPm - numărul de zile de evaporație efectivă din sol pe lună.

JPm – precipitația lunară în mm.

k – valori de referință cunoscute pentru fiecare emisferă.

În emisfera nordică, $K=0,1$, pentru aprilie 0,3 pentru mai și 0,5 pentru lunile iunie până în septembrie. W poate fi negativ, pentru a exprima deficitul potențial de apă, dar nu ar trebui să fie mai mare decât W_0 . Indicele este calculat lună de lună, pe baza valorilor lunare ale P , ETP , T_v și E_s . DI este numit valoarea lui W obținută la momentul final urmând regulile de mai sus și adoptând $W_0=200$ mm.

Achiziția datelor climatice s-a realizat folosind rețeaua de stațiuni meteo (i-meteos) instalate pe parcelele experimentale cu suportul Oficiului Național al Viei și Vinului în cadrul proiectului Struguri de calitate (ng.fieldclimate.com)

Calcularea indicelui de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) măsoară nivelul de utilizare a produselor fitosanitare în protecția culturilor agricole. Acest indice include frecvență de aplicare a produselor fitosanitare pe hectare, luând în considerare doza aplicată și doza de referință a produselor comerciale și recomandate de către producător, precum și suprafața tratată din suprafața totală a parcelei [143], [10], folosind expresia:

$$TFI = \sum \frac{\text{doza aplicată}}{\text{doza de referință}} * \frac{\text{suprafața tratată}}{\text{suprafața totală}} \quad (2.6)$$

În acest studiu, produsele fitosanitare au fost împărțite în trei clase: produse pentru combaterea făinării (TFI_F), produse pentru combaterea manei (TFI_M) și produselor fitosanitare pentru combaterea insectelor/dăunătorilor (TFI_I).

Informațiile privind doza aplicată, suprafața tratată și suprafața au fost colectate din registrele de prelucrare a podgoriilor din cadrul din registrele de prelucrare a podgoriilor din cadrul rețelei parcelelor experimentale. Informațiile privind doza de referință a produselor fitosanitare au fost obținute de pe site-ul www.pesticide.md.

2.1.3. Cercetare calitativă

Secvențierea ADN-ului microorganismelor din cultură: pentru identificarea drojdiilor și bacteriilor a fost analizată în prealabil morfologia lor. Patru tulpini de levuri au prezentat rezultate originale și interesante care au fost în continuare supuse secvențierii. Tulpinile de bacterii, pe baza morfologiei lor, aparțin evident grupurilor AAB și LAB.

Purificarea tulpinilor microbiotilor a fost realizată în trei etape. ADN-ul a fost extras folosind kit-ul Qiaquick (Qiagen) și conform protocolului de secvențiere descris de către Millegen (Franța), conform procedurii descris în continuare.

Secvențierea de tip amplicon cu NGS:

Extracția ADN-ului: mustul a fost dezghețat și centrifugat la 4 000 rpm timp de 15 minute, spălat în 50 cm³ PBS de trei ori, iar pelletul a fost suspendat în 200 μl tampon care conține 2 mM EDTA de sodiu, 20 mM Tris-Cl (pH 8,0), și 1,2 % Triton X-100, suplimentat cu 40 mg/ cm³ lizozim, și incubat la 37 °C timp de 30 de minute. Următorul pas este conform protocolului kitului QIAamp PowerFecal DNA (Qiagen), extractele de ADN au fost stocate la –80 °C până la analize ulterioare. Construcția bibliotecii și secvențierea ampliconilor ADN pentru analiza microbiană. Regiunile țintă selectate au fost:

ITS1 pentru fungi, amplificate cu primerii ITS1F și ITS1R:

ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'

ITS1R: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'

V5-V7 din gena 16S rRNA pentru bacterii, amplificate cu primerii 799F și 1193R .

799F: 5'-AACMGGATTAGATACCKG-3'

1193R: 5'-ACGTCATCCCCACCTTCC-3'

Pentru construirea bibliotecii, s-au utilizat primeri de fuziune în conformitate cu cerințele platformei Illumina, având structura: 5'-linker-barcode-sequencing primer-specific primer-3'

Procesul a implicat două runde de amplificare PCR pentru a adăuga regiunile necesare secvențierii la capetele fragmentelor ADN amplificate.

Procesul de secvențiere a inclus utilizarea platforma Illumina pentru secvențiere bidirecțională (paired-end), iar secvențierea s-a realizat după următorii pași:

1. Fragmentele ADN amplificate (ITS1 și V5-V7) este atașate la cip prin complementaritatea cu primerii fixați.
2. Cealaltă parte formează o punte prin atașarea aleatorie la un primer apropiat.
3. Se amplifică ADN-ul prin PCR, formând clustere de ADN.
4. Fragmentele amplificate sunt denaturate și transformate în fire unice.
5. Se adaugă ADN polimeraza modificată și dNTP-uri marcate fluorescent, sintetizând câte o bază pe ciclu.
6. Fluorescența este citită prin scanare laser pentru identificarea bazelor încorporate.
7. Grupurile fluorescente și de terminare sunt îndepărtate chimic, continuând ciclul de sinteză.
8. Semnalele fluorescente colectate în fiecare ciclu sunt procesate, rezultând secvențele ADNt.

Rezultatele de secvențiere generate de Illumina au fost depuse în Arhiva de Secvențiere a NCBI (SRA), iar ID-ul Bioproiectului este PRJNA976222.

Analiza datelor:

Secvențele paired-end (PEreads) obținute au fost procesate astfel:

1. Secvențele au fost separate pe baza codurilor de bare ale fiecărui eșantion.
2. Controlul calității și filtrarea au fost aplicate pentru eliminarea secvențelor cu erori.
3. Secvențele au fost asamblate conform relațiilor de suprapunere, iar un al doilea control al calității a fost aplicat.
4. Secvențele finale au fost utilizate pentru:

Analiza OTU: Clusterele OTU au fost generate pentru fungi (ITS1) și bacterii (16S V5-V7).

Analiza taxonomiei: Secvențele au fost atribuite taxonomic folosind baze de date specifice (UNITE pentru fungi și SILVA pentru bacterii).

Diversitate alfa: Calculul indicilor Specii observate, Simpson, Shannon, PD whole tree Chao1 pentru fiecare eșantion. Specii observate pot fi determinate prin numărarea directă a

numărului de specii diferite din fiecare eșantion.

Indicele Simpson măsoară uniformitatea și diversitatea speciilor dintr-o comunitate, luând în considerare abundența și distribuția acestora, prin expresia:

$$D_{\text{simpson}} = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (2.7)$$

unde: S - numărul total de specii din eșantion.

p_i reprezintă abundența relativă a speciei i (adică $p_i = \frac{n_i}{N}$, unde n_i este numărul de indivizi ai speciei i, iar N este numărul total de indivizi din eșantion).

Valoarea indicelui Simpson variază între 0 și 1, unde o valoare mai apropiată de 1 indică o diversitate mai mare.

Indicele Shannon este utilizat pentru a descrie diversitatea speciilor, prin expresia.

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i) \quad (2.8)$$

Cu cât indicele este mai mare, cu atât diversitatea speciilor este mai mare.

PD whole tree măsoară distanța evolutivă dintre specii:

$$PD = \sum_i^n L_i \quad (2.9)$$

unde: L_i reprezintă lungimea fiecărei ramuri din arborele filogenetic.

Chao1 este utilizat pentru a estima numărul total de specii care ar putea exista în eșantion, prin expresia:

$$S_{\text{chao1}} = S_{\text{observed}} + \frac{F_1^2}{2F^2} \quad (2.10)$$

unde: S_{observed} - numărul de specii observate în eșantion

F_1 - numărul de specii care apar o singură dată

F_2 - numărul de specii care apar de două ori.

Diversitate beta: Analiza diferențelor între comunități folosind distanțe Bray-Curtis și Jaccard.

Indicele Bray-Curtis este utilizat pentru a măsura diferențele dintre specii, luând în considerare abundența acestora.

$$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j} \quad (2.11)$$

unde: C_{ij} - suma abundențelor minime ale speciilor comune între eșantionul i și eșantionul j

S_i este suma abundențelor tuturor speciilor din eșantionul i

S_j este suma abundențelor tuturor speciilor din eșantionul j

Valoarea indicelui Bray-Curtis variază între 0 și 1, unde 0 indică faptul că cele două

eșantioane sunt complet identice, iar 1 indică faptul că cele două eșantioane sunt complet diferite.

Indicele Jaccard se calculează conform expresiei:

$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \quad (2.12)$$

unde: $|A \cap B|$ – numărul de specii comune între eșantioanele A și B

$|A \cup B|$ reprezintă numărul total de specii din cele două eșantioane (eliminând duplicările).

Analiza Funcțională:

- a) fungi: Datele OTU au fost încărcate în FUNGuild pentru predicția funcțională, analizând modulul trofic.
- b) bacterii: OTU-urile bacteriene au fost procesate prin PICRUSt pentru predicția funcțiilor genice.

Procesul operațional a fost realizat folosind python3, iar datele rezultate au fost analizate și afișate folosind R.4.03.

2.2. Protocolul folosit la elaborarea vinurilor cu bioprotecție și la pregătirea MLI

În perioada 2021-2023 s-au desfășurat practici în oenologie, axate în principal pe bioprotecție și dezvoltarea vinurilor cu MDI. Scopul acestei cercetări a fost:

1. Utilizarea levurilor non-*Saccharomyces* ca instrumente de bioprotecție pentru producția de vin, pentru a reduce utilizarea dioxidului de sulf.
2. Utilizarea MLI în locul levurilor comerciale pentru a explora terroir-ul moldovenesc.

2.2.1. Vinuri cu bioprotecție

Experimentele de bioprotecție au fost efectuate asupra soiului Rară Neagră, proveniți dintr-o vie organică din Olănești, Ștefan Vodă, Republica Moldova. Strugurii au fost culeși manual în stadiul lor optim de maturare (conținut zahăr 255 g/dm³, aciditate titrabilă 4,65 g/dm³ acid tartric) și în condiții igienice perfecte. După sosirea la cramă, strugurii au fost plasați într-o cameră frigorifică la 10°C. Pentru producția de vin prin bioprotecție, au fost folosiți 8 000 kg de struguri, dintre care 80% au fost desciorchinați și zdrobiți. Boștina rezultată și mustul au fost amestecate uniform cu 20% din strugurii întregi în 4 amfore de 160 dal, deoarece experimentele au fost efectuate în două grupe: două rezervoare pentru vinurile de control (grupul C 1) și două rezervoare pentru vinurile cu bioprotecție (grupul BP).

În grupul de control C1 s-a adăugat 100 mg/dm³ de metabisulfid de potasiu (PMS) și 12 mg/dm³ de enzimă pectolitică. În același timp, în grupul BP s-a adăugat două tipuri de levuri non-*Saccharomyces* (*Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima* ale producătorului LAFFORT ZYMAFLORE™ ÉGIDE, France), în concentrație de 50 mg/dm³, precum și 12 mg/dm³ de enzimă pectolitică (LAFFORT LAFAZYM™ CL, France). După clarificarea mustului, levurile comerciale în concentrație de 80 mg/dm³ (LAFFORT ZYMAFLORE™ 011 BIO, France) au fost inoculate în ambele grupuri. Pe durata fermentației alcoolice, pigeage-ul și remontarea s-au efectuat de două ori pe zi, iar densitatea a fost măsurată de două ori în zi (dimineața și după-amiaza). În faza finală a fermentației, la o densitate de aproximativ 1010-1020 kg/m³, s-au adăugat 25 mg/dm³ de LAB (LAFFORT LACTOENOS™ 450 PreAC™, France). Când zahărul rezidual a devenit inferior conținutului de 3 g/dm³, s-a efectuat presarea cu prese hidraulice. Vinurile, 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. Schema de vinificație este prezentată în Anexa 2.

2.2.2. Vinuri cu MLI

MLI tradițional: experimentele de MLI au fost efectuate cu soiul Pinot Noir, proveniți dintr-o vie organică din Olănești, Ștefan Vodă, Republica Moldova. Începând de la sfârșitul lunii august, a fost măsurat periodic conținutul de zahăr al strugurilor pentru a trasa curba de maturare, iar cu 7 zile înainte de data estimată a recoltării, s-au cules 120 kg de struguri pentru producerea MLI.

Schema MLI tradițional este descrisă în Anexa 3. Tehnologic procesul a inclus: strugurii în cantitate de 80 kg, au fost presați fără decantare, fiind plasați într-un recipient de plastic de volum nominal 100 dm³, sulfizați la 20-30 mg/dm³ SO₂ și cu adăugarea a fosfatului de diamoniu (DAP) în doză de 200 mg/dm³. Temperatura a fost menținută în jur de 25°C, așteptându-se începerea fermentației spontane în must. Densitatea mustului a fost măsurată zilnic și au fost efectuate degustări periodice ca să se asigure că MLI se află într-o stare corespunzătoare. Când densitatea ajunge la 1030 kg/m³, MLI a fost utilizată în schema tehnologică MLI.

Procesul tehnologic de obținere a vinurilor cu MLI tradițional include: Strugurii destinați vinificării au fost culeși manual în stadiul lor optim de maturare (zahăr 236 g/dm³, aciditate tartrică 4,6 g/dm³ acid tartric) și în condiții igienice perfecte. După sosirea la cramă, strugurii au fost plasați într-o cameră frigorifică la 10°C. Pentru producția de vinuri cu MLI s-au folosit 8 000 kg de

struguri, dintre care 80% au fost desciorchinați și zdrobiți. Boștina rezultată și mustul au fost amestecate omogen cu 20% din strugurii întregi în 4 amfore de 160 dal, deoarece experimentele au fost efectuate în două grupe: două rezervoare pentru vinurile de control (grupul C 2) și două rezervoare pentru vinurile cu MLI (grupul MLI).

În grupul de control C 2 și grupul MLI s-au adăugat 100 mg/dm³ PMS și enzimă pectolitică (LAFFORT LAFAZYM™ CL, France) în doză de 12 mg/dm³. După clarificarea mustului, levuri comerciale (LAFFORT ZYMAFLORE™ 011 BIO, France) în doză de 80 mg/dm³ au fost inoculate în grupul de control, iar în grupul MLI s-a inoculat MLI în proporție de 3 % din volum. Pe durata fermentației alcoolice, pigeage-ul și remontarea s-au efectuat de 2 ori pe zi, și densitatea a fost măsurată de două ori în zi (dimineața și după-amiaza). În faza finală a fermentației, la o densitate de aproximativ 1010-1020 kg/m³, s-a adăugat LAB (LAFFORT LACTOENOS™ 450 PreAC™, France) în doză de 25 mg/dm³. Când zahărul rezidual a devenit valoric inferior la 3 g/dm³, s-a efectuat presarea cu prese hidraulice. Vinurile, 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. Schema de vinificație este prezentată în Anexa 4.

MLI optimat: optimizarea schemei tehnologice de vinificație cu MLI, s-a realizat asupra varietății ampelografice locale Fetească Neagră în condiții de micro-probe de laborator 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 (MLI-O) sau apă (MLI-T) la must; (2) fermentație spontană timp de 3 zile pentru a obține MLI-O și MLI-T; și (3) inocularea MLI-O, MLI-T și levuri comercială (grupul de control) în mustul proaspăt. Toate vinificațiile experimentale au fost realizate în triplicat cu același lot de struguri (trei vase pentru fiecare încercare).

Procesul tehnologic de obținere a vinurilor cu MLI optimizat include: strugurii au fost culeși manual și zdrobiți. Mustul a fost împărțit în trei vase (1 kg fiecare), reprezentând trei grupuri experimentale (MO, MT și C 3), iar metabisulfitul de potasiu a fost adăugat în doze de 0,05 g/kg. Grupul MO a primit o adiție de vin Fetească Neagră din anul precedent (2022) până la o concentrație finală de etanol în must de 1,5% (v/v). Grupul P nu a avut vin adăugat, iar grupul C 3, fără vin adăugat, a fost inoculată o tulpină comercială de *S. cerevisiae* (LAFFORT ZYMAFLORE™ 011 BIO, France) în doze de 0,15 g/kg. La grupurile MO și MT au fost realizate

fermentații alcoolice spontane.

2.2.3. Metode analitice pentru determinarea proprietăților vinului

Acest studiu a utilizat mai multe metode pentru a determina și a caracteriza în detaliu proprietățile vinului. 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 antocianinelor și spectroscopia în infraroșu cu transformare Fourier (FTIR) pentru analiza proprietăților fizico-chimice.

Cromatografie în fază gazoasă-detector ionizare în flacără (GC-DIF) pentru substanțe volatile

Prin metoda GC-DIF au fost detectate următoarele substanțe volatile: aldehida acetică, etilacetat, metanol, izopropanol, 2-butanol, n-propanol, izo-butanol, n-butanol, izopentanol, glicerol, 2,3-butilenglicol. Cromatograful cu gaz a fost echipat cu o coloană capilară cu fază polară legată (tip Carbowax 20 M). Condițiile analitice au fost următoarele: gaz purtător heliu la 90 kPa; rata de flux a septului de 2,5 ml/min; rata de flux de divizare de 40 ml/min; modul de injectare în divizare; volum injectat de 1 μL; temperatura injectorului de 200°C; detectorul FID la 250°C; flacără: $P_{\text{hidrogen}} = 50 \text{ kPa}$ și $P_{\text{aer}} = 130 \text{ kPa}$. Programarea temperaturii a fost:

- temp. 1 = 32°C la 2,5 °C/min, până la 80°C, $t_1 = 0 \text{ min}$;
- temp. 2 = 80°C la 4°C/min, până la 170°C, $t_2 = 20 \text{ min}$;
- temp. 3 = 170°C la 10°C/min, până la 220°C, $t_3 = 20 \text{ min}$.

Calibrarea s-a realizat prin injectarea soluției de calibrare de lucru înainte de fiecare serie de analize. Calculul factorilor de răspuns s-a făcut conform formulei [144]:

$$RF_i = \frac{\text{aria} \times C_{\text{cis}}}{C_{\text{cis}} \times \text{aria}_{\text{IS}}} \quad (2.13)$$

unde: C_{cis} – concentrația componentului din soluția de calibrare,

aria – reprezintă aria componentului din soluția de calibrare,

aria_{IS} – reprezintă aria standardului intern din soluția de calibrare.

Electroforeză capilară (CE) pentru acizii organici

Prin CE au fost analizați următorii acizi organici: tartric, malic, citric, succinic și lactic. Procedura a implicat plasarea a 2 ml de mostră într-un balon gradat de 50 ml, adăugarea a 1 ml de soluție standard internă și ajustarea volumului la 50 ml cu apă pură, urmată de omogenizare.

Mostrele au fost injectate sub presiune la 0,5 psi timp de 6 până la 15 secunde, cu polaritatea reglată astfel încât anodul să fie pe partea detectorului. A fost aplicată o tensiune de la 0 la 16 kV 1 minut, urmată de menținerea tensiunii la 16 kV pentru aproximativ 18 minute. Temperatura a fost menținută la +25°C, iar detectarea în ultraviolet s-a realizat la 254 nm. Tubul capilar a fost clătit prin circularea tamponului electroforetic timp de 2 minute în direcția opusă la o presiune de 40 psi. Tamponul electroforetic a fost schimbat în baloanele de intrare și ieșire la fiecare 6 injecții și pentru fiecare nouă serie de analize. Secvența de analiză a fost în ordinea: acid tartric, acid malic, acid citric, acid succinic și acid lactic. La sfârșitul analizei, tubul capilar a fost clătit cu apă pură timp de 10 minute în direcția opusă, iar lampa detectorului a fost oprită [145].

Cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) pentru antocianine

Utilizând cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC) s-au analizat următoarele substanțe: delfinidin-3-glucozidă, cianidin-3-glucozidă, diglucozid malvidol, petunidin-3-glucozidă, peonidin-3-glucozidă, malvidin-3-glucozidă și antociani combinați. Vinurile care au fost turnate direct, fără nicio pregătire, în flacoanele de eșantion automat. Mostrele au fost filtrate folosind un filtru de membrană de 0,45 μm, prima parte a filtratului fiind înlăturată. Analiza HPLC s-a desfășurat în următoarele condiții: volum de injecție de 50 μL, flux de 0,8 mL/minut, temperatura de 40°C, timp de funcționare de 45 de minute și timp post de 5 minute. Detectarea s-a realizat la 518 nm [146].

Spectroscopie în infraroșu cu transformare Fourier (FTIR) pentru proprietățile fizico-chimice

S-a utilizat spectroscopia în infraroșu cu transformantă Fourier (FTIR) pe platforma analitică Bachus pentru a analiza proprietățile fizico-chimice ale vinului, incluzând aciditatea volatilă, aciditatea totală, valoarea pH-ului și concentrația de alcool. Intervalul de undă al spectrometrului FTIR a fost setat între 4000 cm⁻¹ și 400 cm⁻¹, cu o rezoluție de 4 cm⁻¹ și un număr de 32 de scanări pentru a obține spectre detaliate și clare. Probele au fost măsurate în celula de măsurare, iar spectrele FTIR au fost înregistrate. Datele spectrale au fost procesate utilizând un software specializat, care a inclus corecția liniei de bază și netezirea datelor. Parametrii fizico-chimici ai probelor au fost determinați prin compararea spectrelor cu spectrele de referință cunoscute. Această metodă este rapidă și precisă, fiind un instrument important pentru controlul calității și analiza caracteristicilor produselor viticole.

2.2.4. Analiza organoleptică

Procesul de degustare a vinurilor elaborate s-a desfășurat în sala specializată de degustare a INCAAMV. Probele temperate la 10-14 °C au fost servite la o temperatură medie a încăperii de 20° C, în mod individual. Fișa de analiză senzorială (figura 2.1. a) conține descriptorii senzoriali obișnuiți care trebuiau dezvoltati conform unei scale de intensitate de la 0 (nicio senzație) la 5 (senzație foarte puternică). Pe lângă acești descriptori, existau 2 poziții care conțineau un răspuns binar și se refereau la puritatea aromei și gustului (absența sau prezența unui defect). În cazul prezenței acestuia, degustătorul trebuia să identifice acest defect. De asemenea, scara de apreciere a calității taninurilor în gust a fost limitată la trei niveluri: uscat, pronunțat și suplu .

Date:							Numele:					Cod:	
Culoare		Conform					Nu conform						
Miros													
Intensitate		1	2	3	4	5							
Complexitate		1	2	3	4	5							
Fructe proaspete		1	2	3	4	5							
Fructe uscate		1	2	3	4	5							
Flori		1	2	3	4	5							
Vegetal		1	2	3	4	5							
Condimente		1	2	3	4	5							
Defect olfactive		Nu	Da, _____										
Gust													
Intensitate		1	2	3	4	5							
Supru		1	2	3	4	5							
Alcool		1	2	3	4	5							
Acid		1	2	3	4	5							
Astringent		1	2	3	4	5							
Amar		1	2	3	4	5							
Complexitate		1	2	3	4	5							
Defecte gustative		Nu	Da, _____										

Date:							Numele:					Cod:	
Aspect													
Intensitate		0	1	2	3	4	5						
Nuanța		Brun	Orange	Caram	Rosu	Violet							
Aroma													
Intensitate		0	1	2	3	4	5						
Puritatea		da	nu										
Fructuositate		0	1	2	3	4	5						
Vegetal		0	1	2	3	4	5						
Complexitate		0	1	2	3	4	5						
Gust													
Puritatea		da	nu										
Structura		0	1	2	3	4	5						
Volum		0	1	2	3	4	5						
Clitatea taninurilor		sec	pronunțat				suplu						

Figura 2.1. Fișa de degustare pentru vinuri cu bioprotecție și MLI-T (a) și pentru vinuri cu MLI-O (b).

Vinurile fermentate spontan sunt adesea considerate a avea un gust neplăcut. Prin urmare, în designul evaluării senzoriale pentru vinuri, au fost adăugate opțiuni referitoare la defectele de culoare, aromă și gust. Dacă sunt prezente defecte, degustătorii sunt obligați să descrie aceste

defecte conform fișei din figura 2.1. (b).

Condițiile acestei evaluări senzoriale sunt consistente cu cele menționate anterior, implicând șase evaluatori (2 femei, 4 bărbați; cu vârste cuprinse între 26 și 62 de ani). Aceștia sunt somelieri profesioniști, oenologi și vânzători de vinuri din Moldova, având competențe și aptitudini de a recunoaște tipicitatea soiurilor locale și a vinurilor din republica Moldova.

2.3. Analiza statistică

Analiza de Varianță (ANOVA) a fost folosită pentru a compara populația de drojdii între media diferitelor grupuri (factori). Testul post-hoc Tukey a fost utilizat pentru a detecta în ce măsură variabile sunt semnificative și distinctive. În programul ANOVA au fost calculați parametrii descriși mai jos, utilizând următoarele formule:

Calculul gradelor de libertate:

$$df_{\text{intre}} = k - 1 \quad (2.14)$$

$$df_{\text{in}} = N - k \quad (2.15)$$

unde: k – numărul grupurilor

N reprezintă numărul total de eșantioane analizate.

Calculul sumei pătratelor:

$$SS_{\text{intre}} = \sum_{i=1}^k n_i (\bar{X}_i - \bar{X})^2 \quad (2.16)$$

$$SS_{\text{in}} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k n_i (X_{ij} - \bar{X}_i)^2 \quad (2.17)$$

Calculul valorilor medii pătrate:

$$MS_{\text{intre}} = \frac{SS_{\text{intre}}}{df_{\text{intre}}} \quad (2.18)$$

$$MS_{\text{in}} = \frac{SS_{\text{intre}}}{df_{\text{in}}} \quad (2.19)$$

Calculul valorii F :

$$F = \frac{MS_{\text{intre}}}{MS_{\text{in}}} \quad (2.20)$$

Calculul valorii p :

$$\Pr(F) = P(F > F_{\text{observate}} | df_{\text{intre}}, df_{\text{in}}) \quad (2.21)$$

unde: n_i – numărul de eșantioane din grupul i

$\bar{X}_i$ reprezintă media grupului și $\bar{X}$ reprezintă media generală

X_{ij} reprezintă valoarea eșantionului j din grupul i .

Formula pentru analiza post-hoc Tukey:

$$q = \frac{|\bar{x}_i - \bar{x}_j|}{\sqrt{MS_{in}/n}} \quad (2.22)$$

Pentru analiza semnificației, valoarea q calculată utilizând testul Tukey a fost comparată cu valoarea critică q_{crit} , dacă $|\bar{x}_i - \bar{x}_j| > q_{crit}$, diferența dintre grupuri este considerată semnificativă. Grupurilor li s-au atribuit litere de semnificație (ex. A, B, C), unde grupurile care împart aceeași literă nu prezintă diferențe semnificative, iar grupurile cu litere diferite prezintă diferențe statistice semnificative.

Pentru factorii climatici și de tratament al viței-de-vie, s-a efectuat corelația Pearson pentru a găsi relația și dimensiunea efectului. În plus, interacțiunea între apariția microorganismelor a fost, de asemenea, analizată prin corelație Pearson, utilizând formulele:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum (X_i - \bar{X}) \sum (Y_i - \bar{Y})}} \quad (2.23)$$

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (2.24)$$

$$P = 2 \cdot P(T > |t| | df = n - 2) \quad (2.25)$$

Imaginea prezentată în figura 2.2. reprezintă, un exemplu de analiză statistică a numărului de drojdii grupate în funcție de anul recoltei, ilustrând modul în care se utilizează limbajul R pentru efectuarea analizei ANOVA și a testului Tukey. Procesul de calcul detaliat nu va mai fi prezentat în secțiunile următoare.

Testul statistic Non-parametric Analiza Similarităților (ANOSIM) și Analiza Componentelor Principale (PCA) au fost efectuate pe rezultatele NGS pentru a măsura efectul factorului de soiurilor și regiune asupra diversității microbiene.

Calculul valorii R în ANOSIM:

$$R = \frac{\bar{r}_{intre} - \bar{r}_{in}}{\max(\bar{r}_{intre}, \bar{r}_{in})} \quad (2.26)$$

unde: $\bar{r}_{intre}$ este distanța medie între grupuri,

$\bar{r}_{in}$ este distanța medie în interiorul grupurilor.

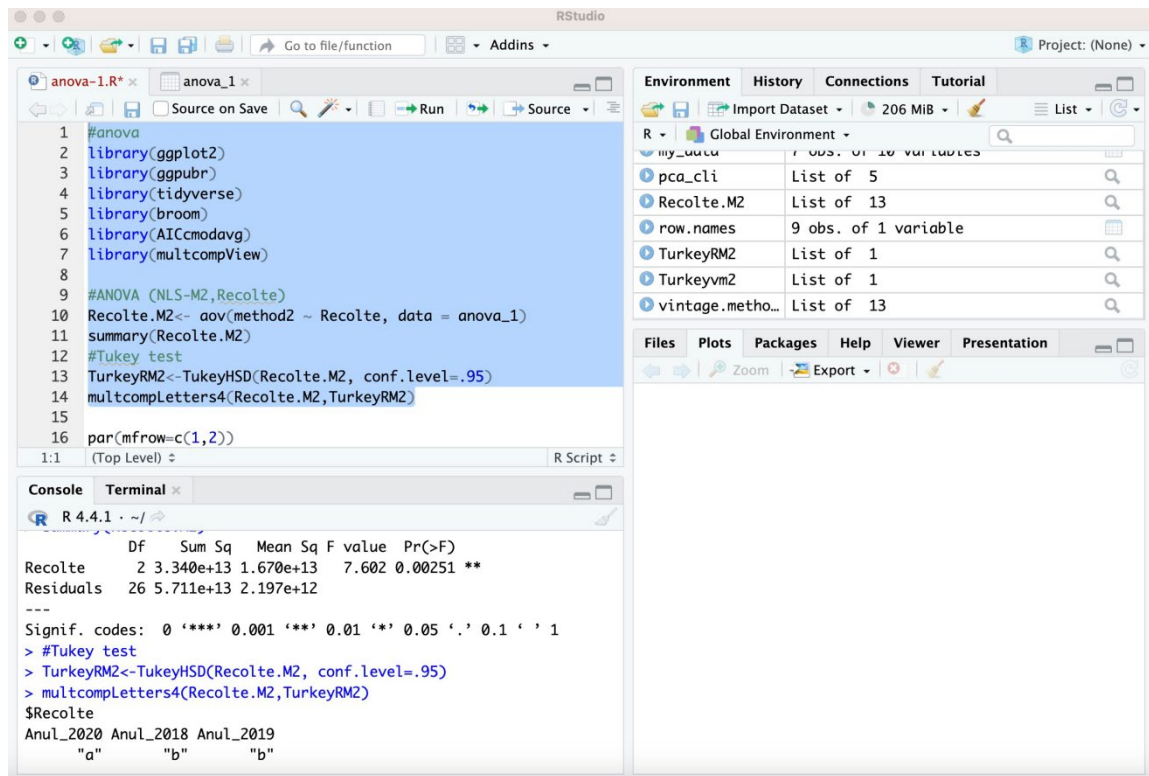


Figura 3.2. Exemple de analiză statistică utilizând limbajul R

Valoarea p este calculată prin compararea valorii observate R_{obs} cu valorile R generate dintr-o distribuție aleatorie, conform expresiei:

$$p = \frac{\text{Number of } R_{perm} \geq R_{obs} + 1}{n + 1} \quad (2.27)$$

unde: R_{perm} reprezintă valorile R generate prin permutări aleatorii,

n este numărul de permutări.

Calculul PCA se bazează pe decompoziția valorilor proprii:

$$X = U \Sigma V^T \quad (2.28)$$

unde: X este matricea de date standardizată,

U este matricea componentelor principale,

Σ este matricea diagonală a valorilor proprii,

V este matricea vectorilor proprii.

Toate procesele statistice au fost efectuate folosind R Project for Statistical Computing versiunea R.4.04 (figura 2.3.), 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

3.1. Studiul microorganismelor prin metode de cultură

3.1.1. Numărarea microorganismelor de pe struguri și din must

Numărul de microorganisme de pe suprafața strugurilor este inclusă în tabelul 3.1.

Tabelul 3.1. Numărul de microorganisme de pe suprafața strugurilor

Cod	Anul de recoltă	Numărul total de levuri	Numărul de levuri cultivabile	Numărul total de bacterii	Numărul de bacterii cultivabile
FN_C	2018	3,80E+04	6,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_C	2019	7,50E+06	3,30E+05	4,80E+05	<1,00E+01
FN_C	2020	2,00E+07	1,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2018	1,40E+06	3,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2019	1,90E+06	1,60E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2020	1,00E+06	5,00E+06	<8,9E+02	1,00E+01
SA_C	2018	2,20E+04	3,00E+05	<8,9E+02	8,00E+02
SA_C	2019	6,20E+04	2,80E+03	1,80E+03	<1,00E+01
SA_C	2020	4,70E+06	1,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_VLT	2018	7,80E+04	1,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_VLT	2019	1,10E+05	1,70E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_VLT	2020	2,00E+07	1,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_VLT	2018	2,30E+04	9,70E+03	<8,9E+02	5,00E+00
FA_VLT	2019	5,60E+05	3,70E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_VLT	2020	1,40E+07	1,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
ME_VLT	2018	2,20E+05	7,20E+03	4,70E+04	<1,00E+01
ME_VLT	2019	4,50E+04	4,30E+04	3,70E+04	<1,00E+01
ME_VLT	2020	8,20E+06	4,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_SV	2018	2,10E+05	2,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_SV	2019	3,20E+04	1,90E+03	3,50E+03	<1,00E+01
FN_SV	2020	5,10E+06	6,00E+05	<8,9E+02	1,00E+01
CF_SV	2018	2,50E+04	6,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
PN_SV	2019	7,90E+05	1,20E+05	2,70E+03	2,20E+03
PN_SV	2020	9,30E+05	2,00E+05	<8,9E+02	1,00E+03
RN_SV	2018	1,00E+05	1,00E+05	<8,9E+02	8,00E+00
VI_SV	2019	4,40E+04	4,10E+02	<8,9E+02	<1,00E+01
VI_SV	2020	2,30E+07	2,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01
CN_SV	2019	3,90E+07	4,90E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
CN_SV	2020	9,10E+05	8,00E+06	<8,9E+02	<1,00E+01

Numărul total de levuri de pe suprafața strugurilor (NLS-M1) variază între 2,2 E+04 și 3,9 E+07 UFC/bob, iar numărul de levuri cultivabile de pe suprafața strugurilor (NLS-M2) variază între 4,1 E+02 și 8,0 E+06.

Tabelul 3.2 prezintă numărul de microorganisme din must. Numărul total de levuri din must (NLM-M1) variază de la nivel foarte scăzut de 8,9 E+02 la 3,1E+06 UFC/bob, iar numărul de levuri cultivabile din must (NLM-M2) variază între 3,0 E+03 și 2,0 E+05.

Tabelul 3.2. Numărul de microorganisme din must

Cod	Recoltă	Numărul total de levuri	Numărul de levuri cultivabile	Numărul total de bacterii	Numărul de bacterii cultivabile
FN_C	2018	2,70E+04	2,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_C	2019	1,77E+06	5,30E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_C	2020	6,20E+05	7,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2018	6,00E+04	8,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2019	3,54E+05	4,30E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_C	2020	1,80E+06	3,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
SA_C	2018	<8,9E+02	1,30E+04	<8,9E+02	1,00E+03
SA_C	2019	8,85E+04	3,00E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
SA_C	2020	3,50E+05	2,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_VLT	2018	5,30E+04	2,00E+05	<8,9E+02	1,00E+01
FN_VLT	2019	<8,9E+02	8,90E+02	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_VLT	2020	4,40E+05	2,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_VLT	2018	5,30E+04	4,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_VLT	2019	2,66E+05	7,00E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
FA_VLT	2020	2,70E+05	9,00E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
ME_VLT	2018	1,80E+04	3,70E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
ME_VLT	2019	1,77E+05	2,60E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
ME_VLT	2020	8,90E+04	1,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_SV	2018	<8,9E+02	1,90E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_SV	2019	<8,9E+02	1,20E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
FN_SV	2020	2,60E+05	2,00E+04	<8,9E+02	1,00E+01
CF_SV	2018	8,80E+03	4,00E+04	<8,9E+02	<1,00E+01
PN_SV	2019	3,54E+05	6,30E+04	2,70E+03	2,20E+03
PN_SV	2020	1,20E+06	5,00E+05	<8,9E+02	7,00E+02
RN_SV	2018	8,90E+04	9,00E+04	<8,9E+02	1,00E+02
VI_SV	2019	<8,9E+02	3,70E+03	<8,9E+02	<1,00E+01
VI_SV	2020	1,40E+06	2,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01
CN_SV	2019	4,25E+06	8,85E+04	8,85E+04	7,40E+03
CN_SV	2020	3,10E+06	9,00E+05	<8,9E+02	<1,00E+01

În tabelele 3.1 și 3.2, denumirile „Cod” utilizează „-” pentru a lega două abrevieri, unde abrevierea dinaintea „-” reprezintă denumirea soiului de struguri, astfel: FN reprezintă Fetească Neagră, FA reprezintă Fetească Albă, SA reprezintă Sauvignon, ME reprezintă Merlot, CF reprezintă Cabernet Franc, PN reprezintă Pinot Noir, RN reprezintă Rară Neagră, VI reprezintă Viorica, CN reprezintă Couderc Noir. Abrevierea de după „-” reprezintă regiunea, astfel: C reprezintă IGP Codru, VLT reprezintă IGP Valul lui Traian, SV reprezintă IGP Ștefan Vodă.

Din cele două tabele se poate observa că metoda de spălare a bobului arată un număr mai mare de microorganisme, deoarece spălarea îndepărtează în principal microorganismele de pe suprafața strugurilor, în timp ce majoritatea microorganismelor din must provin din interiorul strugurilor. Dar, indiferent de metoda de numărare sau de metoda de recuperare a microorganismelor utilizate, populația de bacterii este redusă, cu toate că există câteva excepții.

Pentru a compara populația de levuri între diferite soiuri, regiuni și recolte, au fost create boxplot-uri, reprezentate în figura 3.1. pentru soiuri și 3.2. pentru regiunile viti-vinicole.

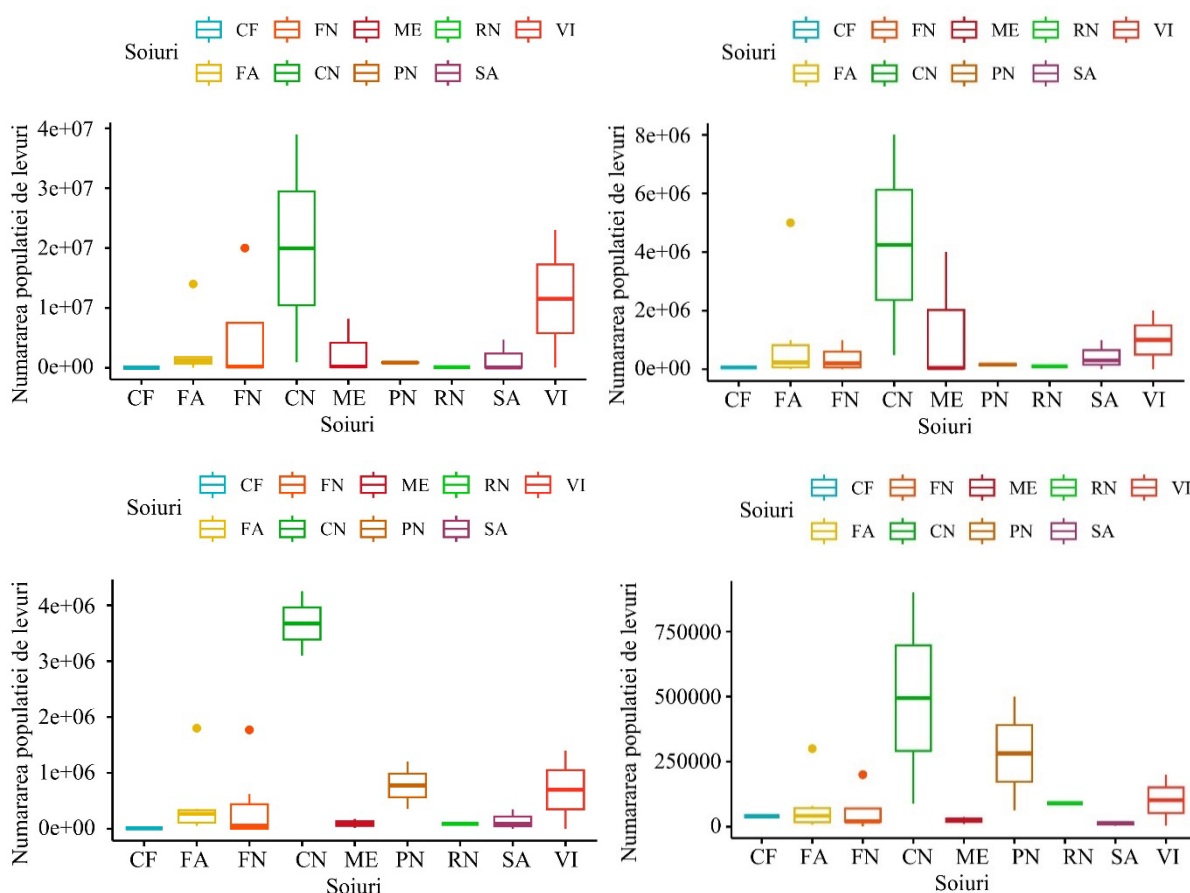


Figura 4.1. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferite soiuri: a) suprafața, total; b) suprafața, cultivabile 2; c) must, total și d) must, cultivabile.

Soiul de struguri influențează semnificativ numărul de levuri în must, soiul Viorica cunoscut pentru rezistența ridicată și o populație mare de levuri. Metodele de gestionare reprezintă, de asemenea, un factor important; de exemplu, Pinot Noir, recoltat din vii ecologice, prezintă o populație de levuri mai mare. Cel mai semnificativ rezultat este observat la soiul Couderc Noir, un strugure casnic, unde nu s-au utilizat produse fitosanitare.

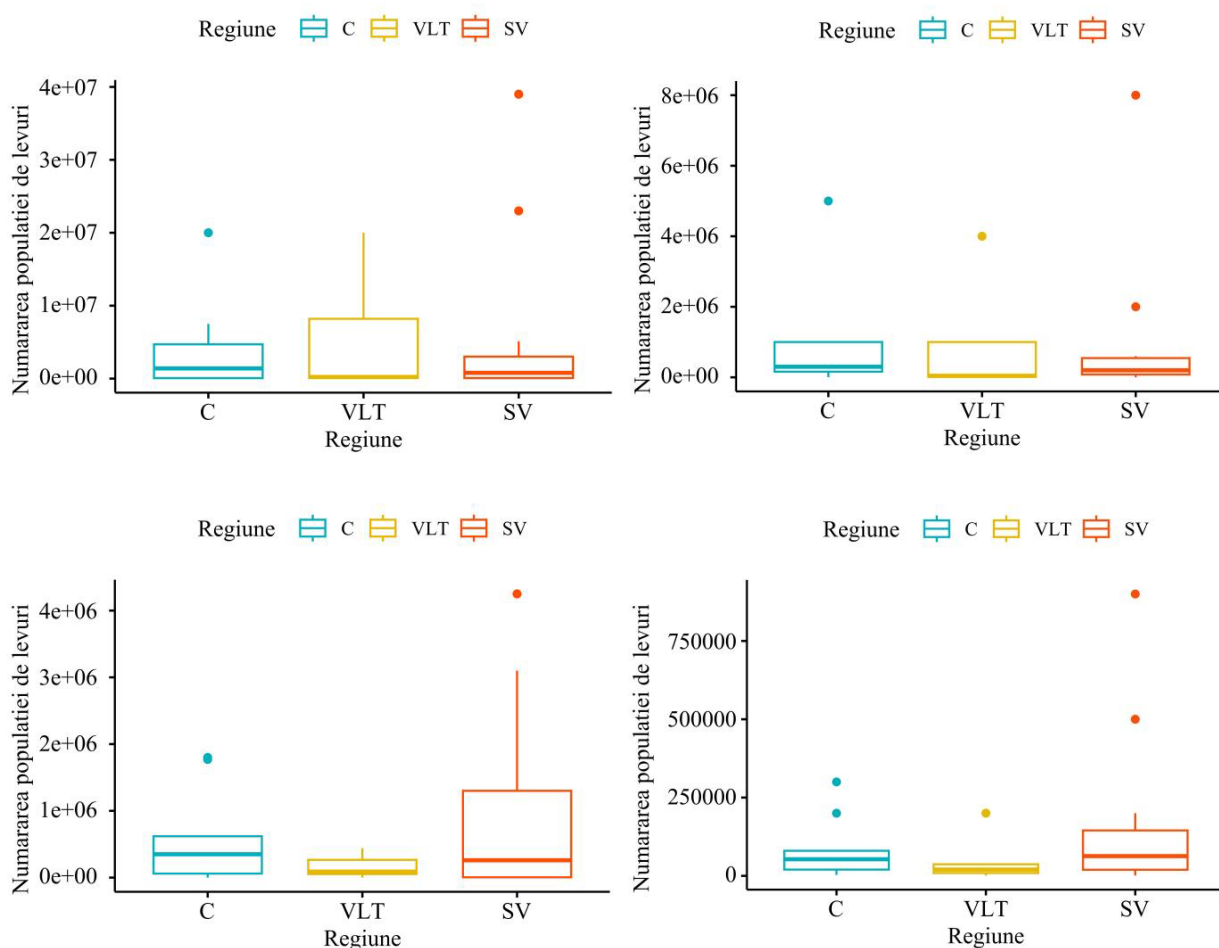


Figura 3.2. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferitele regiuni IGP: a) suprafața, total; b) suprafața, cultivabile 2; c) must, total și d) must, cultivabile.

Populația de levuri între mostrele provenite din diferite regiuni IGP nu este atât de evidentă.

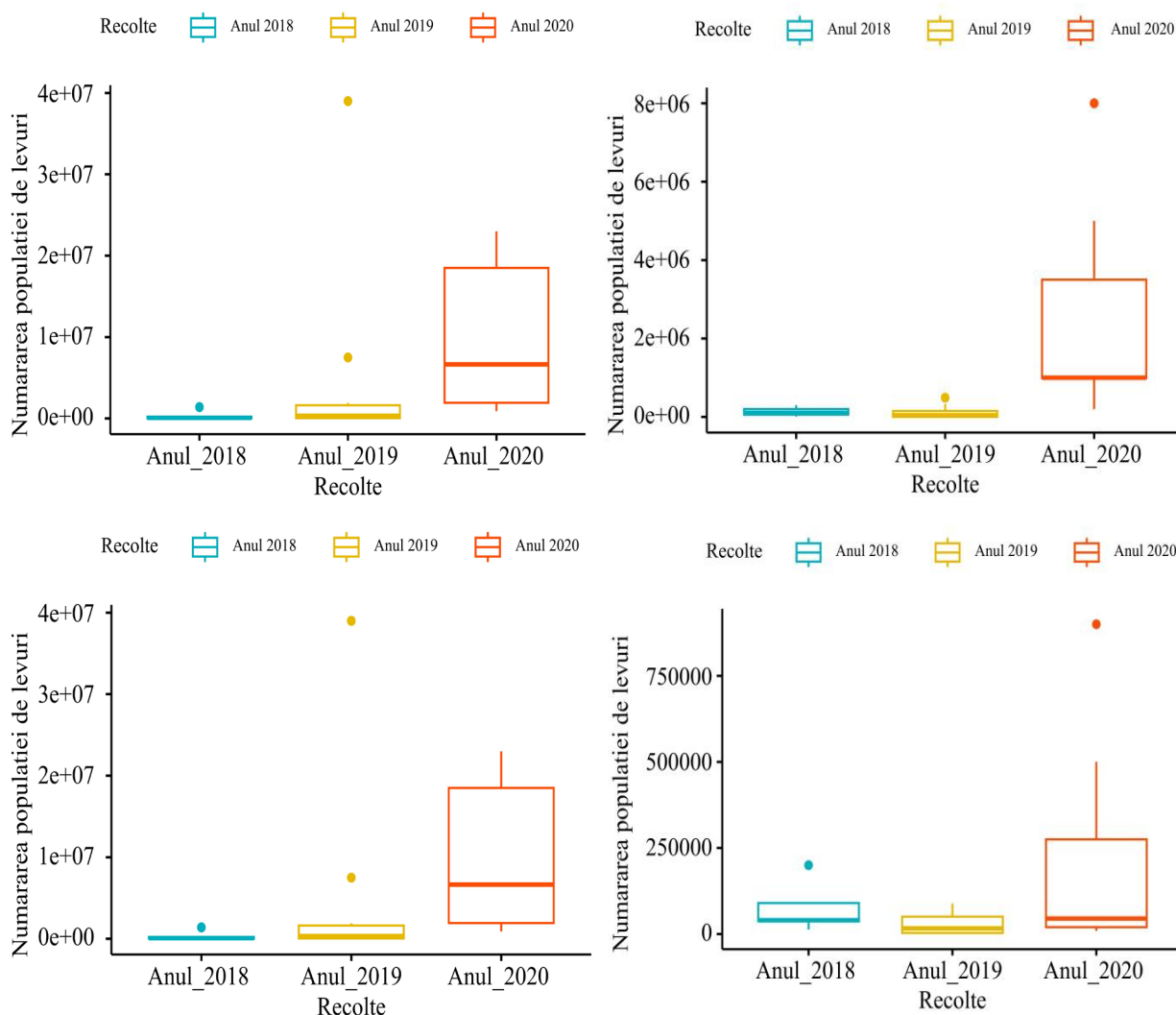


Figura 3.3. Box-plotul pentru numărul de levuri grupată în funcție de diferitele recolte:

a) suprafața, total; b) suprafața, cultivabile 2; c) must, total și d) must, cultivabile.

Este evident că recolta din 2020 are un număr mai mare de levuri, în special în apa de spălare, numeric levurile cultivabile sunt semnificativ mai multe. Microorganismele din apa de spălare provin în principal din mediul extern și sunt puternic influențate de factori externi. Analiza de varianță (ANOVA) a fost efectuată folosind R 4.03, iar rezultatele sunt incluse în tabelul 3.3.

Tabelul 3.3. Rezultatele ANOVA privind numărul de levuri între regiunile IGP, soiurile de struguri și anul recoltării.

Parametrii	df	SS	MS	F value	Pr (>F)
Soiuri (Suprafața, total)	8	6,914e+14	8,643e+13	0,982	0,478
Residualii	20	1,760e+15	8,798e+13		
Soiuri(Suprafața, cultivabile)	8	2,887e+13	3,609e+12	1,171	0,363
Residualii	20	6,164e+13	3,082e+12		
Soiuri (Must, total)	8	2,164e+13	2,705e+12	7,786	9,75e-05 ***
Residualii	20	6,949e+12	3,475e+11		
Soiuri (Must, cultivabile)	8	4,335e+11	5,4a9e+10	1,945	0,109
Residualii	20	5,572e+11	2,786e+10		
Regiuni (Suprafața, total)	2	2,812e+13	1,406e+13	0,151	0,861
Residualii	26	2,432e+15	7,764e+13		
Regiuni (Suprafața, cultivabile)	2	7,207e+11	3,603e+11	0,104	0,901
Residualii	26	8,979e+13	3,453e+12		
Regiuni (Must, total)	2	3,317e+12	1,658e+12	1,706	0,201
Residualii	26	2,528e+13	9,722e+11		
Regiuni (Must, cultivabile)	2	9,625e+10	4,813e+10	1,399	0,265
Residualii	26	8,945e+11	3,44e+10		
Anul recolte (Suprafața, total)	2	4,323e+14	2,162e+14	2,784	0,0802
Residualii	26	2,019e+15	7,764e+13		
Anul recolte (Suprafața, cultivabile)	2	3,340e+13	1,670e+13	7,602	0,00251 **
Residualii	26	5,711e+13	2,197e+12		
Anul recolte (Must, total)	2	4,281e+12	2,104e+12	2,289	0,121
Residualii	26	2,431e+13	9,251e+11		
Anul recolte (Must, cultivabile)	2	1,633e+11	8,167e+10	2,566	0,0961
Residualii	26	8,274e+11	3,182e+10		

Din tabelul 3.3., se poate observa că recolta este un factor important care afectează numărul de levuri cultivate, iar soiul este cel mai important factor care afectează numărul total de levuri din must.

3.1.2. Rezultatele izolării microorganismelor

Mediu de cultură solid IGP Codru (Anexa 1, Figura 1) arată foarte neted, FN_SV pare foarte diferit, ceea ce a permis izolarea și identificarea. Levurile din proba FN_SV au fost identificate ca fiind de tipul *Rhodotorula glutinis*. Un alt exemplu interesant este ciașca Petri cu FA_VLT în mediul de cultură, unde au fost identificate 3 tipuri de levuri: *Metschnikowia*

pulcherrima (colonii colorate în culoare roșie), *Aurebasidium pullulans* (culoare crem) și *Hanseniaspora uvarum* (culoare albă). Aceste specii sunt în mod regulat identificate la suprafața boabelor. Dacă *Rhodotorula* și *Aureobasidium* sunt în general capabile să se dezvolte și să acționeze în must, *M. pulcherrima* și *H. uvarum* pot crește în must și pot interacționa cu activitatea de fermentație.

Colonii obținute au un morfotip foarte omogen, au fost validate speciile de tip *S. cerevisiae* prin amplificarea genetică a zonelor inter-delta specifice speciei (benzi de electroforeză gel incluse în figura 3.4.). în proba de FA_VLT au fost identificate, de asemenea, 3 bacterii din genul: *Pediococcus damnosus* (colonii mici și gri), *Lactobacillus brevis* (colonii mari și gri), *Lactobacillus fermentum* (colonii roz). *Lactobacillus* este principalul gen de bacterii găsit în mod obișnuit la suprafața boabelor de struguri. Prin urmare, nu este surprinzător că au fost identificate două specii de *Lactobacilli*. *Lactobacilli* pot crește în must și pot concura cu levurile în timpul fermentației alcoolice, dar în general puține specii supraviețuiesc producției de etanol indigen. Specia *P. damnosus* este rezistentă la fermentația alcoolice. În unele vinuri, această specie poate realiza fermentația malolactică.

Levurile identificate în recolta din 2019 au inclus speciile: *R. glutinis*, *R. graminis*, *A. pullulans* și *S. cerevisiae*. În această recoltă *S. cerevisiae* a fost izolată direct. Prima etapă a identificării, realizată prin observarea microscopică, a arătat o populație foarte omogenă de bacterii în această recoltă. Cea mai mare parte a bacteriilor observate și izolate sunt bacterii acetice (în recolta din 2018, majoritatea bacteriilor identificate au fost bacterii lactice). După observația microscopică, identificarea genetică a relevat că specia cu cea mai importantă prezență în strugurii din recolta 2019 este *Gluconbacter oxydans*.

Rezultatele izolării levurilor în recolta din 2020 au inclus speciile: *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *A. pullulans* și *R. glutinis*. Identificarea prin observație microscopică a arătat că eșantionul izolat PN_SV (Pinot Noir din IGP Ștefan Vodă) este o bacterie acetică. Identificarea genetică a dezvăluit că aceste bacterii acetice sunt de tipul *G. oxydans*. În plus, observația microscopică a arătat că izolatele din FA_C (Fetească Albă din IGP Codru) și FN_SV (Fetească Neagră din IGP Ștefan Vodă) sunt bacterii lactice. Identificarea genetică a dezvăluit că specia este *Lactobacillus*.

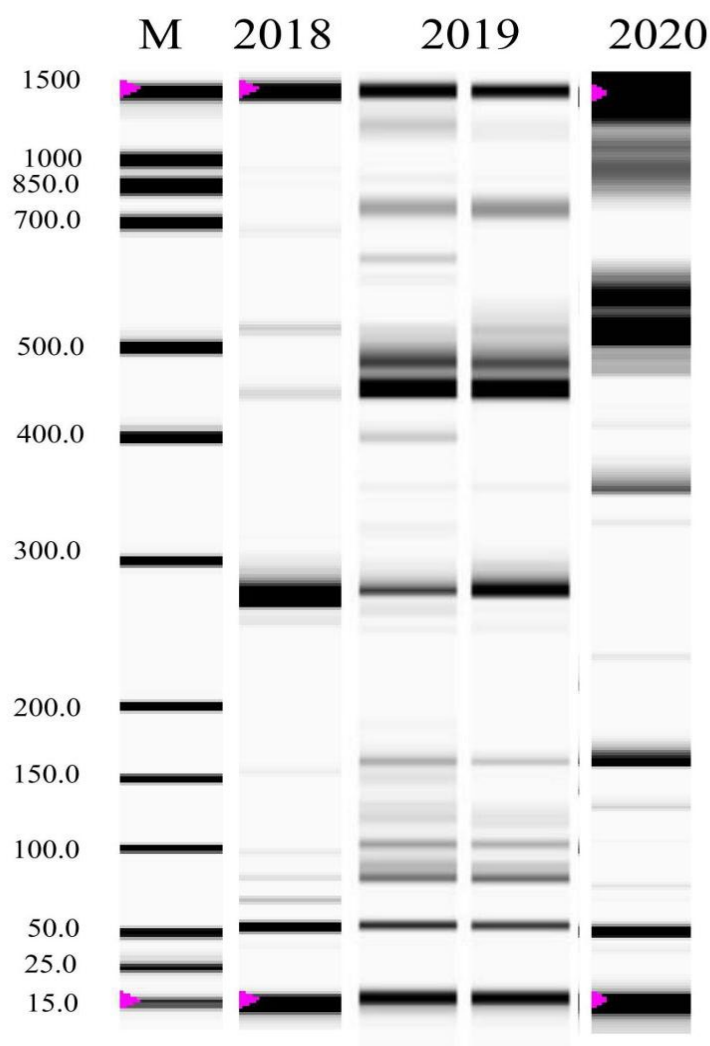


Figura 3.4. Compararea genetică a tulpinilor de *S. cerevisiae* studiate în anii de recoltă 2018, 2019 și 2020.

Modelul genetic al tulpinilor de *S. cerevisiae* izolate în recolta 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.

3.1.3. Influența climatului și a utilizării produselor fitosanitare asupra populației de levuri

După cum a fost menționat mai sus, recolta indică faptul că diferitele modele climatice pot afecta cel mai mult populația de levuri cultivate. În plus, populația totală de levuri din must este influențată de utilizarea produselor fitosanitare. Indicele climatic și indicele de utilizare a produselor fitosanitare în cele trei recolte au fost calculate, iar corelația dintre acestea a fost analizată. Utilizarea produselor fitosanitare reprezintă un factor de influență.

Condiții climatice

Rezultatele calculelor pentru indicele climatic sunt prezentate în tabelul 3.4.

Tabelul 3.4. valoarea indicilor climatici din cele 3 recolte și ale celor 3 regiuni IGP

Indicația geografică	Anul recoltei	HI	CI	DI
IGP Codru	2018	2311,73	2,85	141,49
IGP Codru	2019	2100,12	4,13	176,01
IGP Codru	2020	2174,00	10,55	75,19
IGP Valul lui Traian	2018	2659,16	-0,92	84,81
IGP Valul lui Traian	2019	2479,39	1,14	43,42
IGP Valul lui Traian	2020	2398,00	7,04	53,45
IGP Stefan Voda	2018	2662,69	4,57	-56,57
IGP Stefan Voda	2019	2503,83	5,90	-28,00
IGP Stefan Voda	2020	2292,41	8,80	-28,90

Conform metodei de clasificare prezentate în tabelul 3.4., în republica Moldova sunt nopți foarte reci, IGP Codru este de la sub-umed la umed, IGP Valul lui Traian de la moderat uscat la sub-umed, în timp ce IGP Ștefan Vodă este constant moderat uscat. Indicele HI indică diferențe semnificative între recolte, deși IGP Codru are un climat constant temperat cald, în general, recolta din 2020 este mai rece.

Utilizarea produselor fitosanitare

Rezultatele calculului pentru TFI sunt prezentate în tabelul 3.5. TFI reflectă strategiile de gestionare a podgoriilor, iar în podgoriile convenționale, TPI total se încadrează în intervalul 6-19, în timp ce SA_C se apropie foarte mult de o podgorie organică, cu o valoare totală a TPI de 5,8. CN_SV este o mostră de struguri provenită de la rezidenții locali, care nu a fost tratată chimic.

Tabelul 3.5. Rezultatele TFI pentru 10 podgorii din recolta anului 2020

Cod	TFI_M	TFI_F	TFI_I	Total TFI
FN_C	5,23	11,12	2,72	19,07
FA_C	5,60	6,86	0	12,46
SA_C	2,00	4,00	0	6,00
FN_VLT	5,23	11,12	2,72	19,07
FA_VLT	2,07	8,33	1,11	11,51
ME_VLT	4,58	5,33	1,00	10,91
FN_SV	4,71	7,08	2,08	13,87
PN_SV	0,80	5,00	0	5,80
VI_SV	6,00	8,13	1,00	15,13
CN_SV	0	0	0	0

Influență factorilor climatici și al TFI asupra populațiilor de levuri.

Coeficientul de corelație Pearson a fost calculat între populației de drojdii numărate prin diferite metode în eșantioanele de studiu și sub acțiunea diferitor factori, reprezentate în figura 3.5.

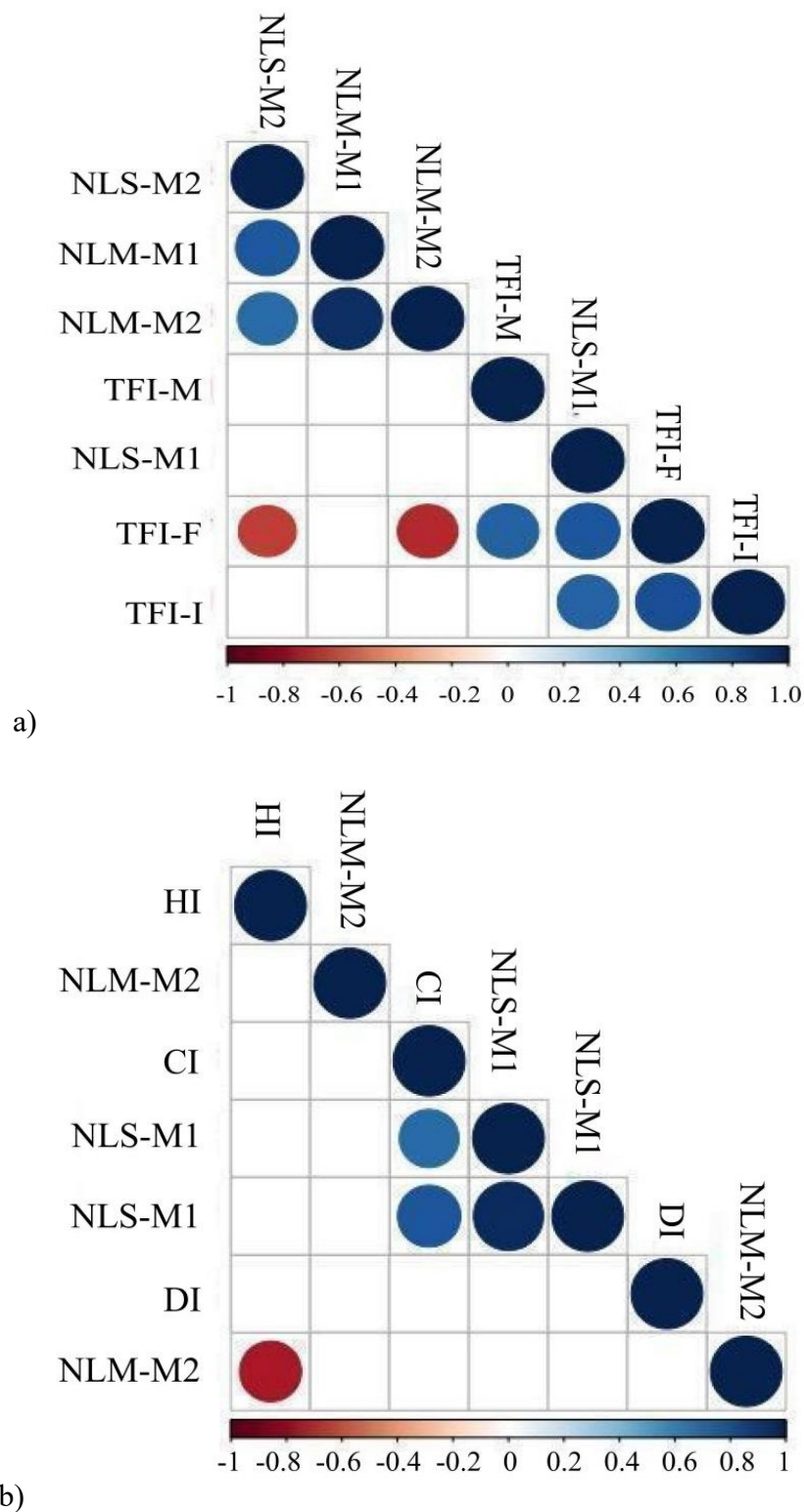


Figura 3.5. Corelație Pearson: a) între indicele de frecvență a tratamentelor fitosanitare (TFI) și numărul de levuri, b) între factorii climatici și numărul de levuri.

În figura 3.5 cercul albastru indică o corelație pozitivă, cercul roșu indică o corelație negativă, iar cel gol indică rezultate ne semnificative între rezultate. În care NLM-M1 numărul total de levuri din must, NLM-M2 reprezintă numărul de levuri cultivabile din must, NLS-M1 reprezintă numărul total de levuri de pe suprafața strugurilor, NLS-M2 reprezintă numărul de levuri cultivabile de pe suprafața strugurilor.

Relațiile dintre TFI_F și NLS-M2, NLM-M2 sunt negative, dar pozitive între acesta și NLS-M1. Diversitatea microbiană reflectă gestionarea podgoriilor [147], iar utilizarea produselor fitosanitare crește abundența drojdiilor pe boabele de struguri. Un rezultat complet diferit a fost găsit de [148], unde utilizarea produselor fitosanitare reducea populația de levuri. Figura 3.5 (a) poate oferi o nouă opinie, produse fitosanitare pentru combaterea fâinării reduc populația de levuri cultivate, dar cresc populația totală de levuri la suprafața bobului. În general, produse fitosanitare pe bază de sulf sunt eficiente în protejarea strugurilor de fâinării; în recolta din 2020, cele mai frecvent utilizate fungicide pentru combaterea fâinării au fost Cosavet și Kumulus (ingredient activ: 80% s.u. sulf). Sulful poate avea un efect antimicrobian dovedit asupra levurii, poate conduce la intrarea microorganismelor în starea VBNC (viabile, dar ne-cultivabile).

Impactul TFI (M) nu a fost identificat, dar TFI (I) are un impact asupra numărul total de levuri; tratamentul cu insecticide crește numărul total de levuri, dar nu prezintă o corelație cu levurile cultivate. Acest lucru poate fi atribuit alegerii diferite a produsului insecticid de către agronomi în îngrijirea/întreținerea podgoriilor. De exemplu, printre insecticidele utilizate în FN_SV, preparatul Pyrus, cunoscut și sub numele de fungicid pentru fungii din genul *Botrytis*, poate ucide unele specii de levuri, conducând la o populație mai mică de levuri cultivate.

Analiza comparativă a influenței tratamentelor fitosanitare utilizate în podgoriile gestionate convențional (utilizarea fungicidelor sintetice, penetrante) și podgoriile gestionate organic (utilizarea exclusivă a fungicidelor de contact pe bază de cupru) arată că cuprul poate crea stres pentru diferite specii de microorganisme. Acest fapt poate explica fenomenul paradoxal de ce podgoria gestionată organic posedă o populație mai mică de levuri cultivabile. Remarcăm că structura calitativă și cantitativă a microorganismelor în cele două metode de gestionare a podgoriilor (organică și convențională) nu este clară și necesită cercetări mai aprofundate.

Pentru factorii climatici, HI corelația este negativ pentru NLM_M1, ceea ce înseamnă că temperatura mai ridicată în perioada vegetativă reduce numărul total de levuri în mustul de struguri.

Un alt indice de temperatură, CI, influențează pozitiv pentru NLS_M1 și NLS_M2. Altfel spus, temperaturile reci ale nopților înaintea recoltării inhibă atât levurile cultivate, cât și populația totală de levuri. Factorii climatici sunt foarte complecși, iar există foarte puține explicații pentru populația de levuri în ceea ce privește acest factor. După cum a fost menționat în primul capitol, cercetarea actuală asupra factorilor climatici se concentrează mai mult asupra impactului asupra unor populații microbiene specifice.

3.2. Studiul diversității microbiene folosind secvențierii de tip amplicon cu NGS

Pentru a înțelege structura microbiană a strugurilor din RM și pentru a identifica amprenta microbiană, s-a efectuat secvențierea de tip amplicon cu NGS asupra trei soiuri și trei regiuni IGP.

3.2.1. Diversitatea microbiană

În secțiunea 3.2, Cod-urile utilizat pentru probe sunt formate din trei litere, prima literă reprezintă regiunea, astfel: C reprezintă IGP Codru, S reprezintă IGP Ștefan Vodă și V reprezintă IGP Valul lui Traian. Ultimele două litere reprezintă soiul de struguri, astfel: CH reprezintă Chardonnay, CS reprezintă Cabernet Sauvignon și FN reprezintă Fetească Neagră.

După secvențiere și optimizare, s-au obținut 428 215 secvențe fungice de înaltă calitate și 450 005 secvențe bacteriene de înaltă calitate (tabelul 3.6.) și o lungime medie de 186-222 bp. Curba de rarificare (figura 3.6.) a avut tendința de a se uniformiza, reflectând faptul că numărul efectiv de citiri îndeplinea cerințele, sugerând că rezultatele secvențierii sunt fiabile.

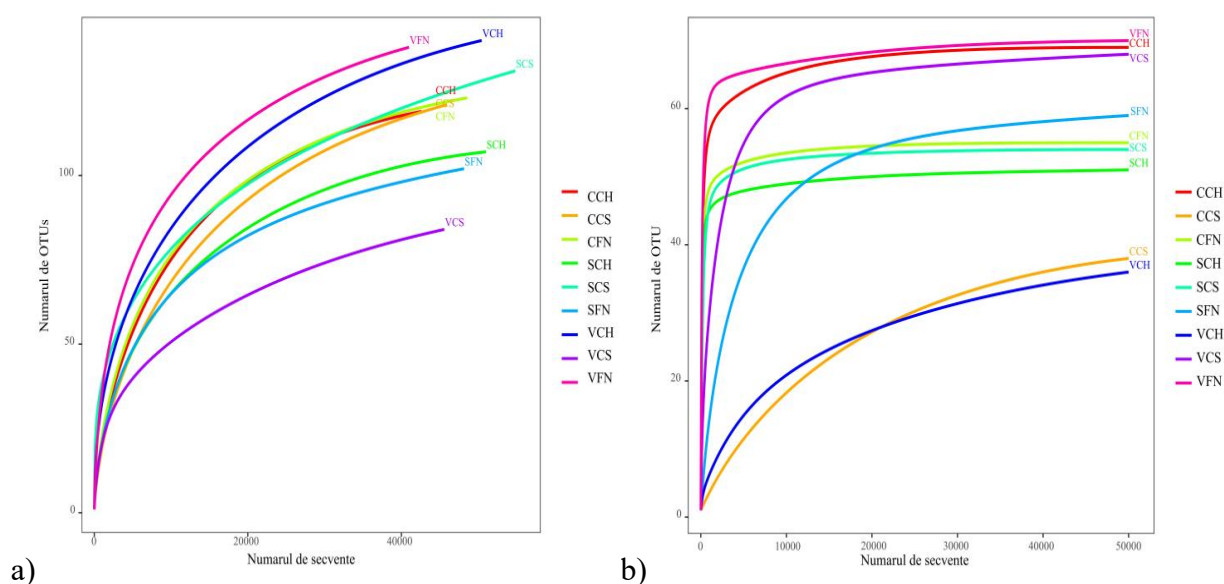


Figura 3.6 Curba de rarificare a secvențierii: a) pentru fungi și b) pentru bacterii

Tabelul 3.6. Rezultatele calității secvențierii

Specia	Codul probelor	Numerotare secvențe valide	Numerotare secvențe optimizate	Numărare de baze	Lungime medie
Fungi	CCH	44 910	42 637	9 494 681	222
	CCS	47 481	45 954	10 234 442	222
	CFN	51 132	48 581	10 816 704	222
	SCH	54 281	51 019	11 343 499	222
	SCS	60 331	54 839	10 254 771	186
	SFN	49 678	48 159	10 714 970	222
	VCH	52 167	50 455	10 967 585	217
	VCS	47 711	45 583	10 128 549	222
	VFN	43 665	40 988	9 063 708	221
Bacteria	CCH	66 760	50 002	18 890 792	377
	CCS	65 673	50 002	18 848 131	376
	CFN	66 570	49 999	18 884 302	377
	SCH	66 154	49 997	18 863 670	377
	SCS	71 555	49 999	18 854 486	377
	SFN	67 554	50 001	18 848 834	376
	VCH	60 225	49 998	18 749 917	375
	VCS	68 660	50 005	18 834 416	376
	VFN	74 346	50 002	18 823 593	376

Alpha diversitatea

Analiza alfa diversității a fost efectuată, iar indicii Chao, Ace, Shannon și Simpson sunt prezentați în tabelul 3.7, cu o acoperirea bună pentru toate probele (99%).

Pentru a analiza similaritatea și suprapunerea compoziției OTU a microbilor, s-a efectuat o analiză Venn (figura 3.7). 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.

Tabelul 3.7. Rezultatele diversității Alpha

Specia	Codul probelor	Acoperire bună	Specii observate	Chao	Ace	Shannon	Simpson	PD
Fungi	CCH	1,00	119	125,58	130,62	0,78	0,66	28,16
	CCS	1,00	121	138,65	142,12	0,36	0,89	27,24
	CFN	1,00	123	131,64	136,36	0,93	0,49	29,18
	SCH	1,00	107	109,60	114,35	1,02	0,46	25,80
	SCS	1,00	131	170,38	170,35	2,56	0,15	28,63
	SFN	1,00	102	119,50	116,61	0,32	0,91	24,27
	VCH	1,00	140	152,54	160,96	1,44	0,37	32,82
	VCS	1,00	84	100,87	110,02	1,03	0,44	19,66
	VFN	1,00	138	152,77	157,58	1,52	0,31	29,61
	VFN	1,00	138	152,77	157,58	1,52	0,31	29,61
Bacteria	CCH	1,00	69	69,00	69,00	3,25	0,06	9,72
	CCS	1,00	38	39,40	41,23	0,03	0,99	6,23
	CFN	1,00	55	55,00	55,00	3,03	0,10	7,65
	SCH	1,00	51	51,00	51,33	3,17	0,08	8,14
	SCS	1,00	54	54,00	54,00	1,89	0,34	8,30
	SFN	1,00	59	61,00	60,26	0,16	0,96	8,01
	VCH	1,00	36	39,50	42,39	0,10	0,97	5,46
	VCS	1,00	68	69,50	69,32	1,36	0,40	9,49
	VFN	1,00	70	70,00	7,40	2,93	0,16	8,62
	VFN	1,00	70	70,00	7,40	2,93	0,16	8,62

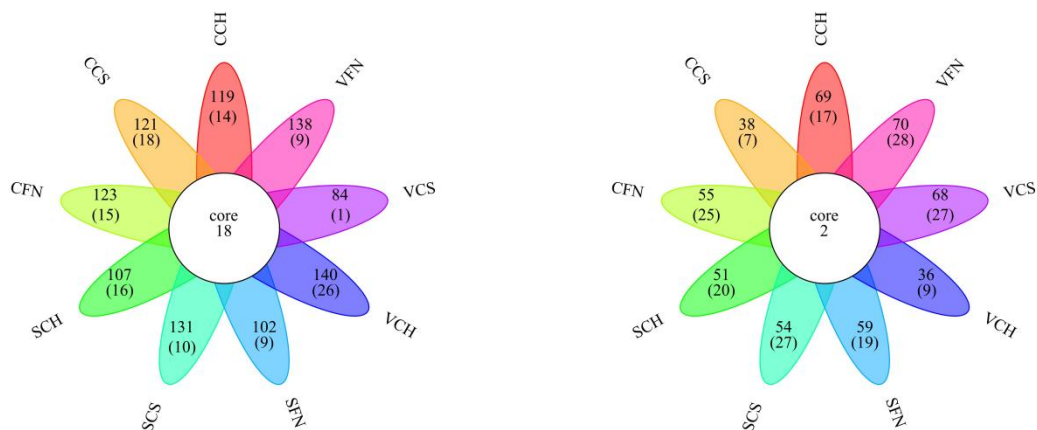


Figura 3.7. Diagrame Venn ale numărului de OTU-uri: a) pentru fungi b) pentru bacterii.

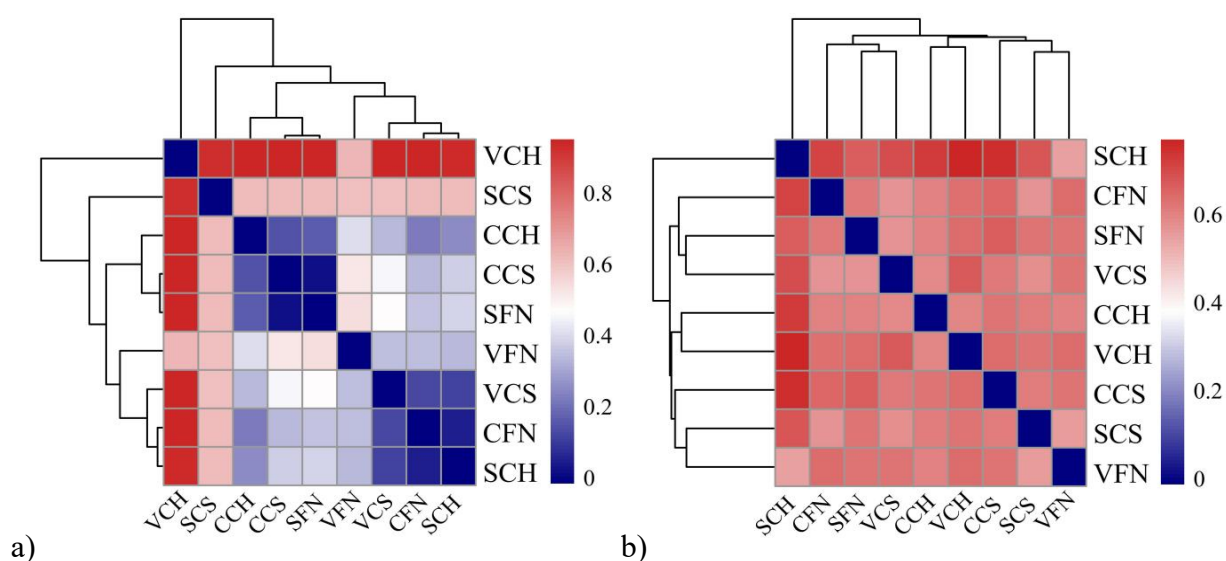
Pentru fungi, printre toate eșantioanele, VFN (138 OTU-uri) și VCH (140 OTU-uri) prezintă cele mai mari numere de OTU-uri, dar VCS, în fungi faptului că provine din aceeași regiune Valul lui Traian ca VFN și VCH, prezintă cel mai mic număr de OTU-uri. În plus, cu excepția VCS, toate celelalte eșantioane au avut OTU-uri unice pentru fungi, toate eșantioanele partajând 18 OTU-uri.

Diversitatea bacteriilor arată o bogăție mai mică decât fungii. În cazul bacteriilor, VCS prezintă un număr relativ mare de OTU-uri. Toate eșantioanele partajează 2 OTU-uri. Valul lui Traian rămâne zona cu cea mai bogată diversitate microbiană pentru OTU-uri bacteriene, cu două eșantioane clasate pe primul și al doilea loc în numărul de OTU-uri, deși VCH are cel mai scăzut nivel (cele mai multe OTU-uri pentru fungi).

IGP Valul lui Traian este regiunea IGP cu cea mai bogată diversitate microbiană din Republica Moldova, cu toate că există câteva cazuri speciale. Având în vedere dimensiunea relativ mică a eșantioanelor de studiu, concluzia exactă trebuie verificată prin experimente la scară largă.

Beta diversitatea

În situația în care sunt luate în considerare atât prezența sau absența OTU-urilor, cât și abundența (metoda Bray-Curtis), nu există o cluster-izare clară atât pentru regiunea de producție, cât și pentru varietate pe graficul Jaccard, Chardonnay-ul din IGP Codru și IGP Valul lui Traian prezintă o compoziție mai consistentă de fungi, în timp ce Chardonnay-ul din Ștefan Vodă este semnificativ diferit față de celelalte două. Conform tabelului 3.4. valoarea indicelui de ariditate (DI) din IGP Ștefan Vodă este semnificativ mai mic decât în celelalte două IGP-uri. IGP Ștefan Vodă este o regiune viticolă extrem de uscată, iar condițiile aride ar putea afecta mai mult calitatea fructelor soiurilor de struguri albi, cum ar fi conținutul de zahăr și umiditatea, ceea ce ar putea influența condițiile de supraviețuire ale fungilor de pe suprafața strugurilor. Cu toate acestea, această influență poate fi, de asemenea, afectată de alți factori, cum ar fi rezistența la secetă a soiurilor de struguri, tipul de sol, condițiile climatice, etc.



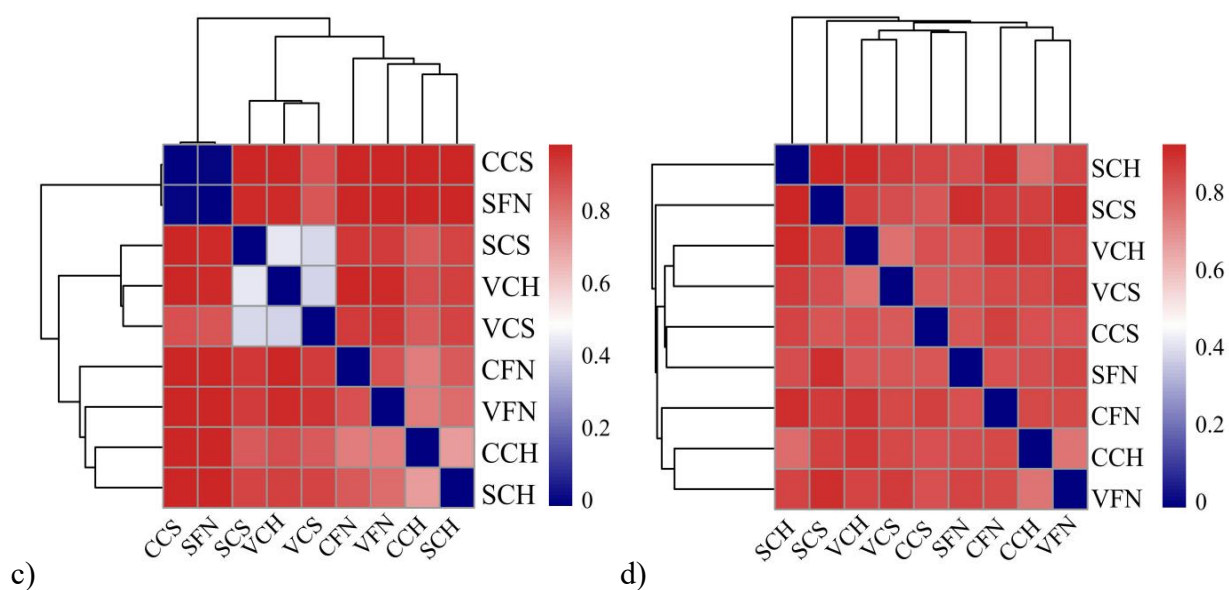


Figura 3.8. Heatmap-ul matricei diferențelor: a) pentru fungi, utilizând metoda Bray-Curtis, b) pentru fungi, utilizând metoda Jaccard, c) pentru bacterii, utilizând metoda Bray-Curtis și d) pentru bacterii, utilizând metoda Jaccard.

Figura 3.9. reprezintă o analiză PCoA a UniFrac neponderat. Din nefericire, în stadiile timpurii ale fermentației spontane, nici varietatea, nici regiunea nu s-au grupat clar, așa că analiza ANOSIM a fost suplimentată.

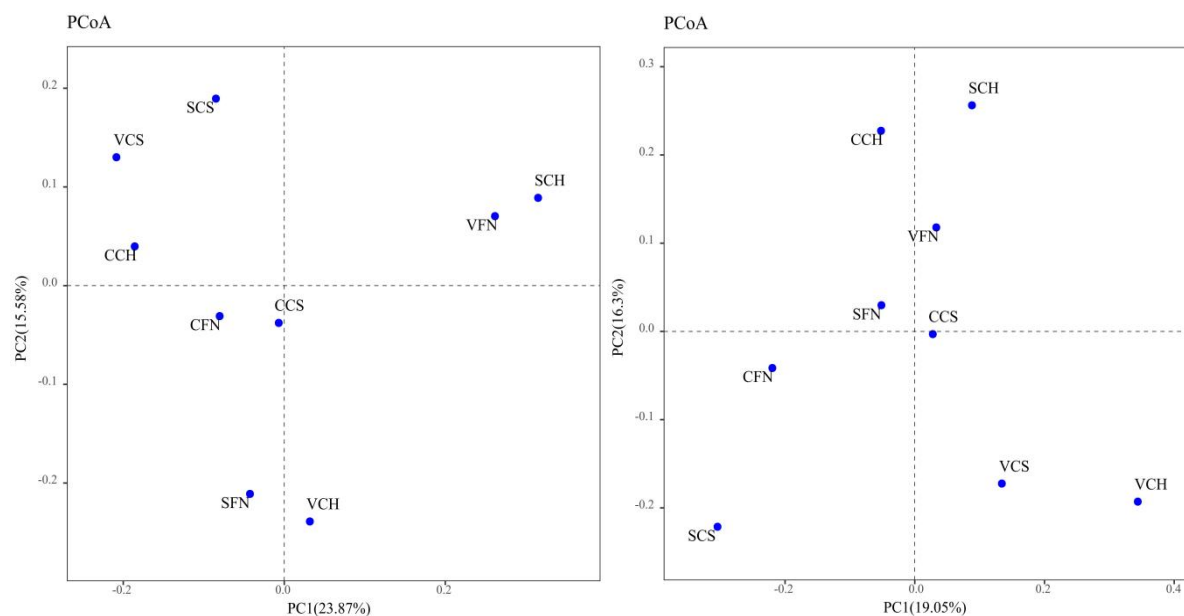


Figura 3.9. Analiza coordonatelor principale (PCoA) bazată pe distanțele UniFrac neponderate pentru: a) fungi și b) bacteria.

Tabelul 3.8. Rezultatele ANOSIM privind influența Varietății și a regiunilor IGP asupra compoziției microbiene

Factorii	Fungi		Bacteria	
	R	Semnificație	R	Semnificație
Soiul	-0,177	0,945	0,095	0,392
IGP	0,004	0,453	-0,226	0,910

Pe baza analizei PCoA și ANOSIM, 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 [149].

3.2.2. Componenta microbială

La nivel de încrengătura, fungii (figura 3.10. a) din toate eșantioanele sunt clasificați în 5 încrengături: *Ascomycota* (98,8%), *Mortierellomycota* (0,6%), *Basidiomycota* (0,5%), *Mucoromycota* (0,06%), *Rozellomycota* (0,04%). Doar eșantionul VCH are *Rozellomycota*.

Într-o altă cercetare despre fermentația spontană a strugurilor, abundența *Ascomycetelor* în fiecare eșantion 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.

Bacteriile sunt clasificate în 16 încrengături (figura 3.10. b), 10 dintre ele reprezentând o proporție relativ mare ($>0,1\%$), așa cum se poate observa: *Proteobacteria* (75,3%), *Bacteroidetes* (7,9%), *Actinobacteria* (7,8%), *Firmicutes* (7,6%), *Deinococcus-Thermus* (0,6%), *Gemmatimonadetes* (0,2%), *Acidobacteria* (0,1%), *Spirochaetae* (0,1%), *Aquificae* (0,1%) și *Fusobacteria* (0,1%).

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 abundența sa a fost observată să crească pe parcursul fermentației acestora [150].

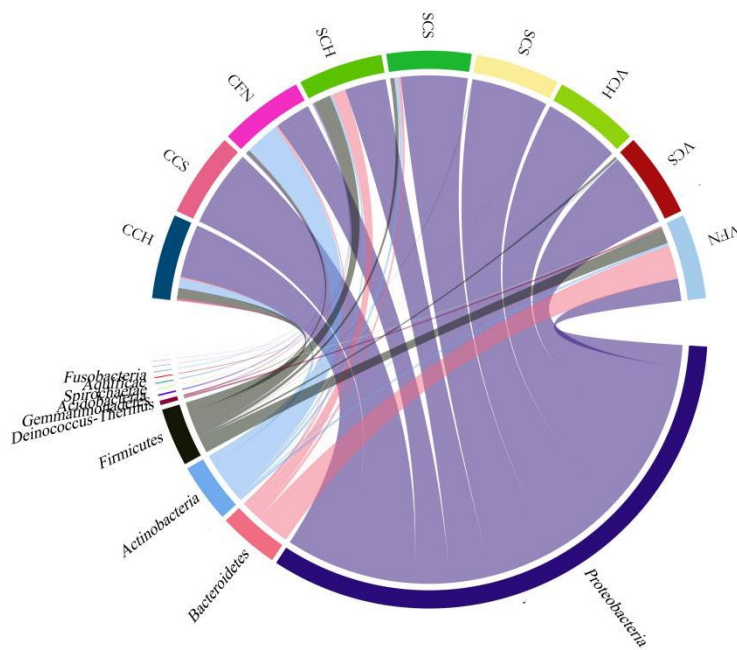
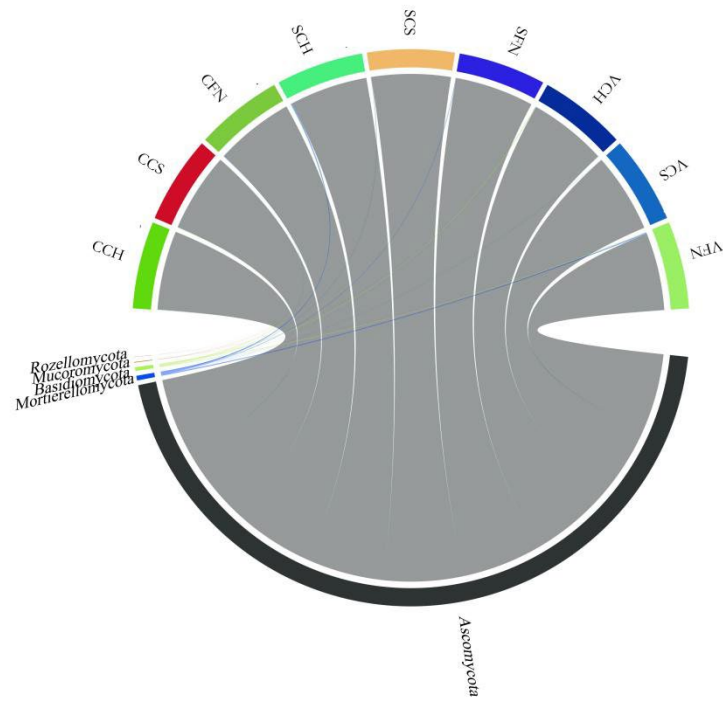


Figura 3.10. Structura microbiană la nivel de încrângătura: a) pentru fungi și b) pentru bacterii

Structura microbiană la nivel de genuri este prezentată în diagrama cu bare, figura 3.11.

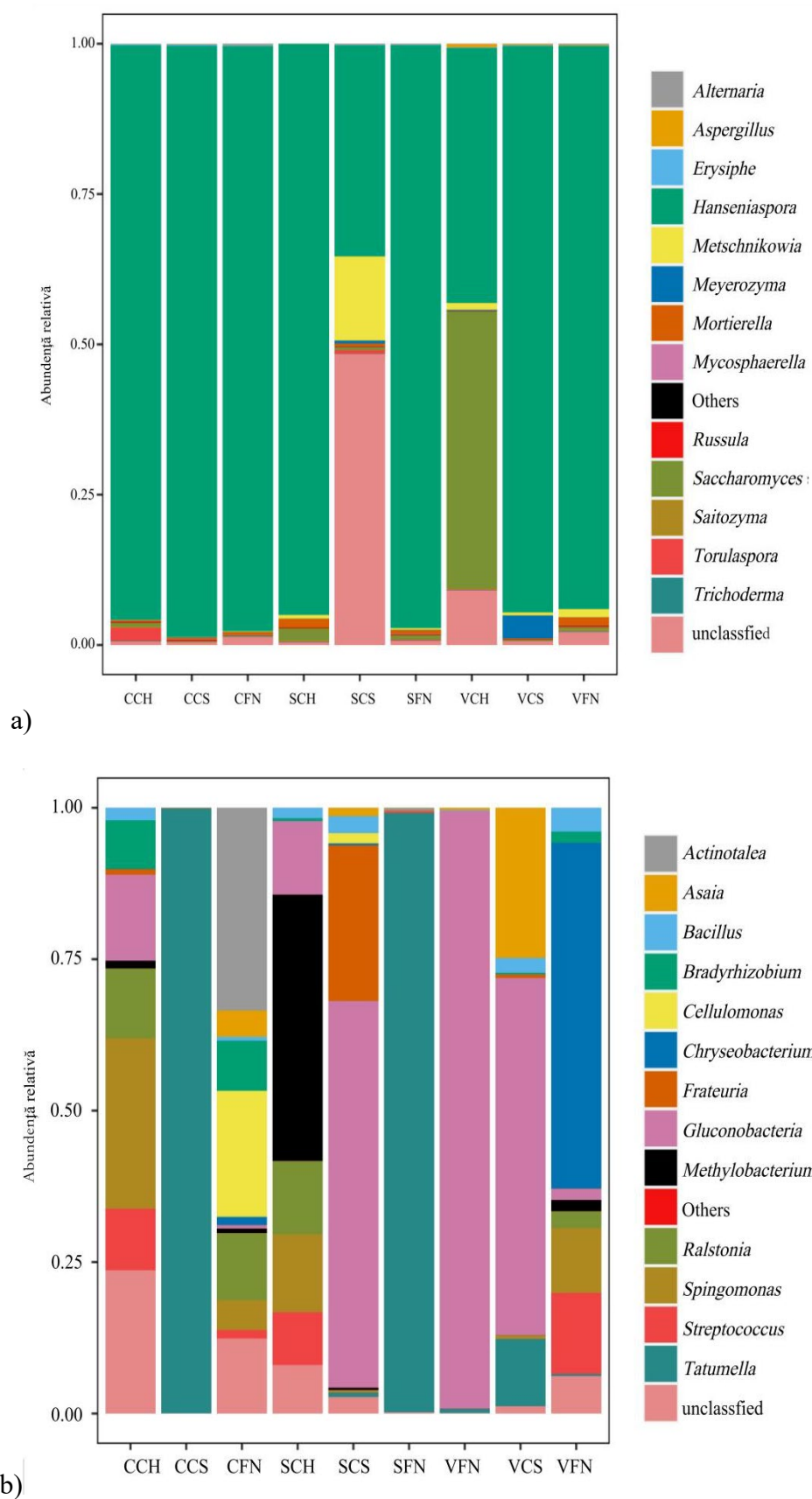


Figura 3.11. Cele mai frecvente 15 genuri: a) de fungii și b) de bacterii la nivel de gen

În cazul fungilor (figura 3.11. a), genurile cele mai frecvente găsite în toate eșantioanele au fost: *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%).

Pentru genurile fungilor, *Hanseniaspora* este confirmat ca fiind cel mai răspândit gen al strugurilor [151, 152]. *Erysiphe* (mușgaiul pulberii), *Aspergillus* (mușgaiul negru) și *Mycosphaerella* sunt considerate fungi patogene ale plantelor, iar *Alternaria* cauzează putrezire. Dar, de fapt, abundența relativă a acestora este redusă, mai mică de 1%.

Pentru bacterii (figura 3.11. b), genurile cele mai frecvente au fost: *Gluconobacter* (25,3%), *Tatumella* (23,4%), *Chryseobacterium* (4,6%), *Sphingomonas* (4,3%), *Asaia* (4,2%), *Methylobacterium* (4,2%), *Ralstonia* (3,2%), *Actinotalea* (3,0%), *Frateuria* (2,7%), *Streptococcus* (2,7%), *Cellulomonas* (2,5%), *Bradyrhizobium* (2,5%) și *Bacillus* (1,8%).

Într-o altă cercetare privind fermentarea spontană, s-a constatat că *Tatumella* are cea mai mare abundență relativă printre bacterii. S-a descoperit că abundența lui *Tatumella* crește odată cu orele de fermentație spontană [153]. Potențialii producători de compuși organici volatili care contribuie la caracteristicile senzoriale ale vinurilor sunt: *Methylobacterium*, *Sphingomonas* și *Bacillus*. Specia *Sphingomonas* este găsit pe tot parcursul procesului de fermentare a vinului, indicând o relație între bacterii și terroirul microbial al vinurilor. Este, de asemenea, un biomarker pentru compoziția chimică a vinului [154]. Abundența mare a speciilor *Sphingomonas* și *Methylobacterium* pe tot parcursul etapelor de fermentare indică importanța lor în proces, deși rolul lor în calitatea vinului rămâne necunoscut. Aceste genuri sunt epifite de struguri înregistrate adesea anterior în vin.

Cel mai răspândit gen de LAB legat de MLF, *Oenococcus*, nu a fost detectat, totuși, a fost identificată o abundență redusă de: *Lactobacillus* (CCH: 0,79%, SCS: 0,26%, SFN: 0,02%, VCS: 0,12) și *Weisella*. Toate bacteriile acetice aparținând genului *Gluconobacter spp.* [155] au avut cea mai mare populație în perioada fermentației spontane.

Asaia poate provoca alterarea băuturilor răcoritoare [156], iar *Bacillus* este considerat cauza aspectului vâscos al vinului. S-a observat, de asemenea, posibilitatea de alterare a alimentelor a genului *Chryseobacterium* [157].

După cum a menționat mai sus, structura microbiană a strugurilor din Republicii Moldova nu prezintă diferențe semnificative între diferitele regiuni IGP și soiurile de struguri. S-a efectuat o analiză ANOVA pentru a afla dacă un anumit gen poate fi marker între regiunile IGP sau soiuri. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.9.

Tabelul 3.9. Rezultatele ANOVA privind apariția genurilor microbiene între regiunile IGP și soiurile de struguri.

Specia	Valoarea p		Specia	Valoarea p	
Fungi	IGP	Soiul	Bacteria	IGP	Soiul
<i>Hanseniaspora</i>	0,148	0,543	<i>Gluconobacter</i>	0,259	0,394
<i>Saccharomyces</i>	0,571	0,169	<i>Tatumella</i>	0,693	0,583
<i>Mortierella</i>	0,226	0,721	<i>Chryseobacterium</i>	0,432	0,400
<i>Meyerozyma</i>	0,448	0,387	<i>Sphingomonas</i>	0,597	0,297
<i>Torulaspora</i>	0,432	0,444	<i>Asaia</i>	0,471	0,426
<i>Erysiphe</i>	0,031*	0,741	<i>Methylobacterium</i>	0,448	0,416
<i>Alternaria</i>	0,081	0,441	<i>Ralstonia</i>	0,317	0,294
<i>Metschnikowia</i>	0,060	0,669	<i>Actinotalea</i>	0,422	0,422
<i>Russula</i>	0,265	0,731	<i>Frateuria</i>	0,441	0,405
<i>Saitozyma</i>	0,203	0,376	<i>Streptococcus</i>	0,904	0,396
<i>Mycosphaerella</i>	0,159	0,383	<i>Cellulomonas</i>	0,452	0,452
<i>Trichoderma</i>	0,154	0,328	<i>Bradyrhizobium</i>	0,110	0,524
<i>Cladosporium</i>	0,277	0,228	<i>Bacillus</i>	0,592	0,750

Fiecare microb pare să fi apărut întâmplător, cu excepția lui *Erysiphe*, care a prezentat diferențe foarte semnificative între podgorii. Abundența relativă a lui *Erysiphe* din cele 3 podgorii este: Codru $0,049 \pm 0,017a$, Ștefan Voda $0,011 \pm 0,018ab$ și Valul lui Traian $0,007 \pm 0,010b$. specia *Erysiphe* este un gen de fungi în familia *Erysiphaceae*. Multe dintre speciile din acest gen sunt agenți patogeni ai plantelor care cauzează mușgai pudră. Prin urmare, această diferență se datorează gestionării diferite a podgoriilor. Interacțiunile microbiene au fost importante pentru menținerea structurii comunității microbiene. Pentru a ilustra topologia rețelei benefice sau antagoniste între comunitățile microbiene, s-au calculat coeficienții de corelație Pearson și valorile p (figura 3.12.).

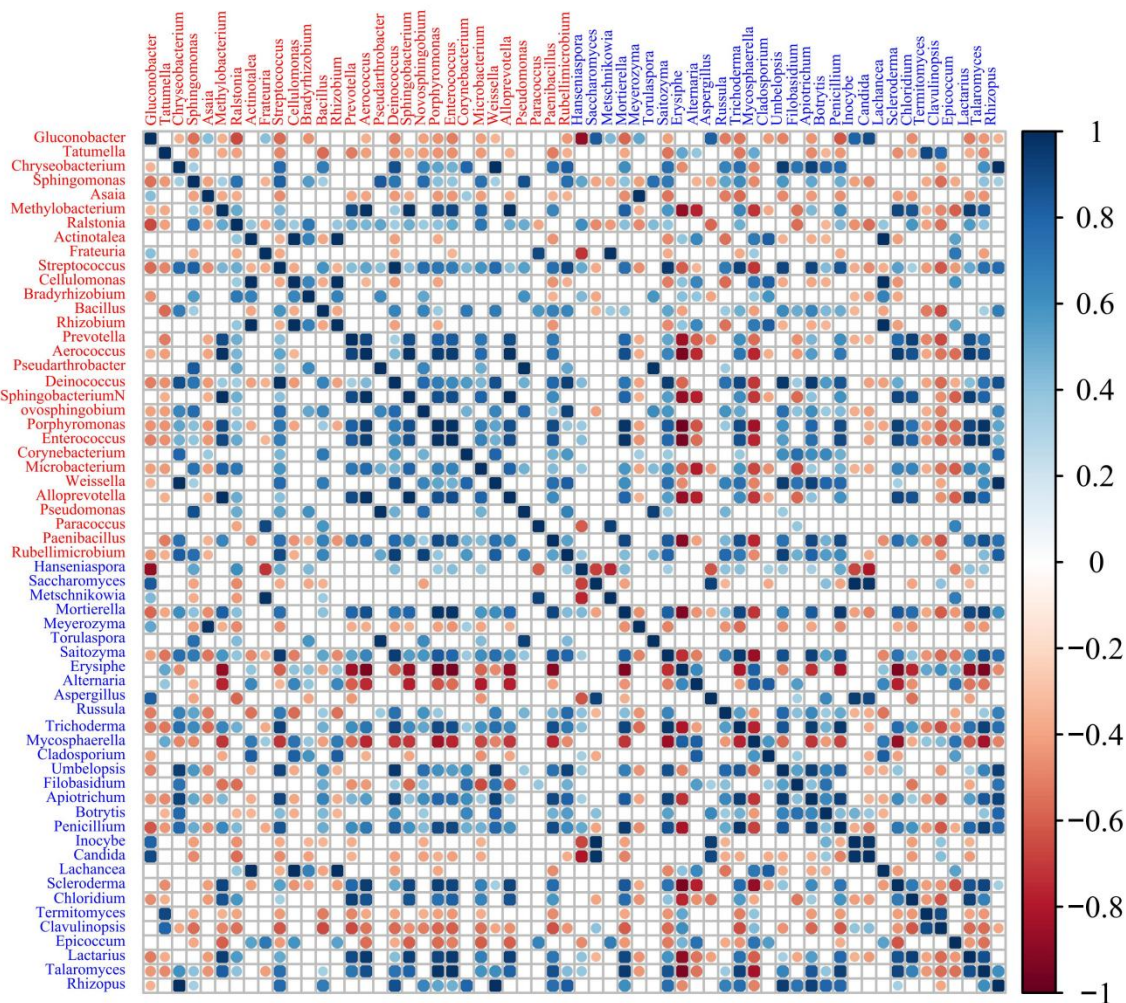


Figura 3.12. Corelația Pearson a primelor 30 forme de fungi și bacterii

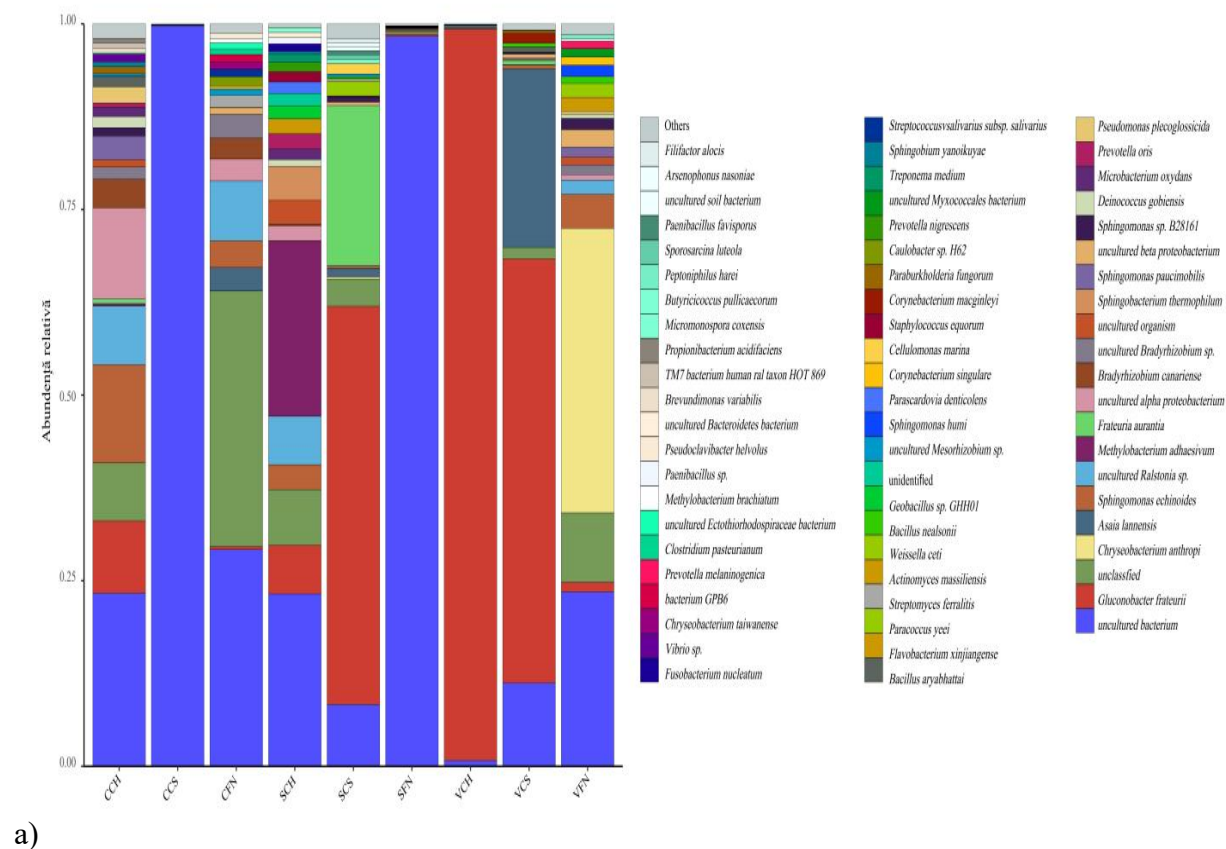
Conform calculelor din figura 3.12. se observă că formele *Mortierella* și *Saitozyma* au o corelație negativă cu cele *Erysiphe*, *Alternaria* și *Mycosphaerella*, reprezentând trei agenți patogeni ai plantelor, în timp ce *Hanseniaspora* inhibă, de asemenea, *Aspergillus*. *Meyerozyma* și majoritatea bacteriilor și fungilor sunt corelați negativ.

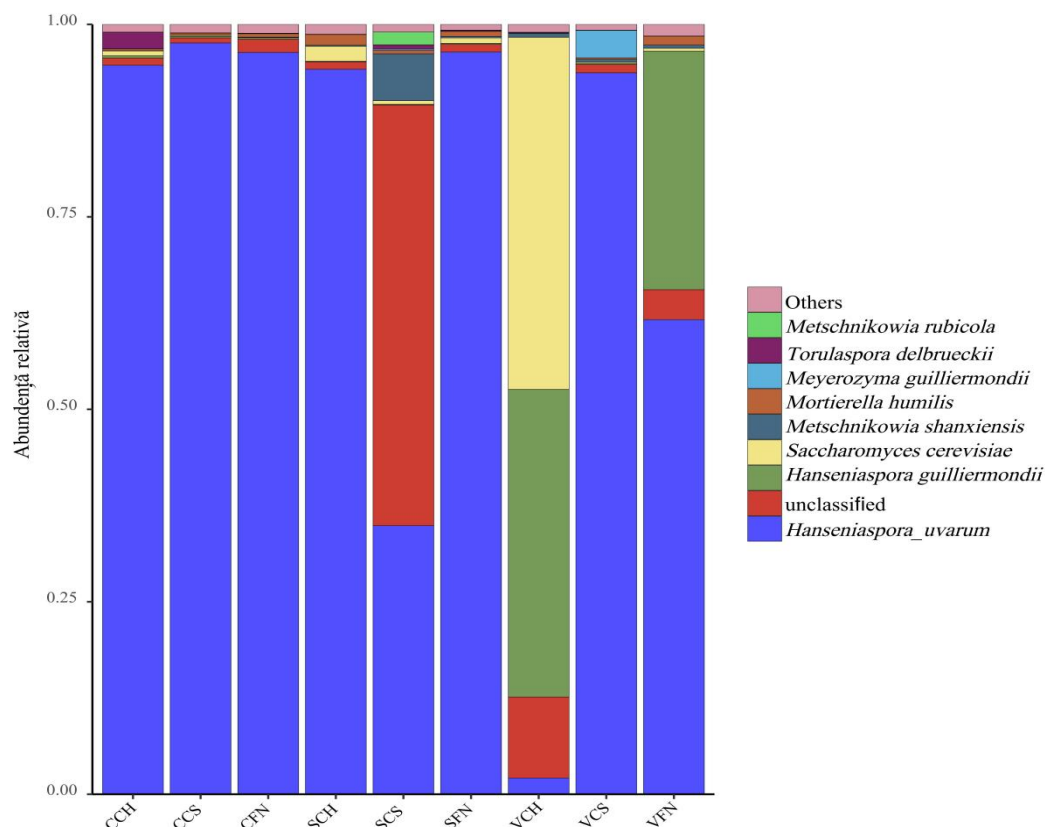
Folosirea drojdiei ca agenți de control biologic (BCA) a fost dezvoltată recent, drojdia ce produce compuși organici volatili pentru a inhiba creșterea agenților patogeni. Aplicarea drojdiei ca agenți de control biologic reprezintă una dintre cele mai investigate alternative la fungicide, datorită capacității acestor microorganisme de a crește și supraviețui în nișe ecologice heterogene și în condiții de stres severe. Mai mult, activitatea competitivă ridicată a drojdiei nu suferă de efectele secundare (producția de compuși alergenicici pentru oameni sau metaboliți secundari toxici) întâlnite uneori în cazul aplicării altor specii microbiene ca agenți de control biologic, extinzând astfel, potențialul lor de aplicare în protecția ecologică a produselor agricole și a derivatelor [158].

Lipsa protecției împotriva oxigenului și fermentațiile lente vor favoriza dezvoltarea bacteriilor acetice [159]. Se poate observa în figura 3.12 că *Saccharomyces* prezintă o corelație pozitivă cu *Gluconobacter*. *Gluconobacter* face parte din familia *Acetobacteraceae* și este cunoscut pentru capacitatea sa de a produce compuși acizi, cum ar fi acidul gluconic și alți acizi organici, prin oxidarea alcoolilor și zaharurilor. În procesul de fermentație a vinului, prezența excesivă a bacteriilor acetice, în special a *Gluconobacter*, poate conduce la continuarea oxidării aldehidei și acidului acetic din vin, ceea ce poate genera acidifierea acestuia. Cu toate acestea, relația dintre *Saccharomyces* și *Hanseniaspora*, *Mortierella* este negativă.

Cele mai atractive non-*Saccharomyces*, *Metschnikowia* și *Torulaspora*, nu au corelații cu alte fungi, 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 (0,8-1).

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





b)

Figura 3.13. Structura microbiană la nivel de specie (abundența relativă mai mare de 0,1%): a) de bacterii și b) de fungii

Cele mai importante specii de fungi (cu o relativă abundență mai mare de 0,1%) în toate probele, conform figurii 3.13. sunt: *H.uvarum* (74,6%), *H.guilliermondii* (8,0%), *S.cerevisiae* (5,6%), *M.shanxiensis* (0,9%), *M.humilis* (0,5%), *M.guilliermondii* (0,4%), *T.delbrueckii* (0,3%) și *M.rubicola* (0,2%).

Printre levuri non-*Saccharomyces*, levura apiculată *Hanseniaspora uvarum* (anamorf *Kloeckera apiculata*) este una dintre speciile cele mai frecvente prezente pe struguri și găsite în cantități mari în mustul de struguri [151]. În recolta din 2018, a fost de asemenea izolată pe medii de cultură specifice.

Se observă în figura 3.13 că relativ, abundența lui *H. uvarum* este diferită între probe, fiind cea mai mare în CCS (97,6%) și cea mai mică în VCH (2,1%), în timp ce VCH are cea mai mare prezență a *S.cerevisiae* (45,7%). Alți compuși legați de performanța fermentației (cum ar fi zahărul și etanolul) și/sau anumiți metaboliti secretați de *S. cerevisiae* ar putea fi legați de scăderea bruscă a capacității de cultivare a speciei *H. uvarum*. Așa cum a fost analizat de Wang et al. s-a confirmat

că metabolitii proveniți de la *S. cerevisiae* au indus lipsa de cultivabilitate a *H. uvarum*, totuși, etanolul și alți compuși posibili nu păreau să inducă acest efect, ci au jucat un anumit rol în proces [160]. Această specie a fost testată în culturi mixte de starter ca alternativă la inocularea doar a speciilor de drojdii *Saccharomyces*, valorificând caracteristicile exclusive ale ambelor specii. Utilizarea de *H. uvarum* în fermentația mixtă cu *S. cerevisiae* a fost raportată că determină obținerea unor vinuri semnificativ diferite față de cele obținute prin culturi pure de *S. cerevisiae* [161]. În detaliu, s-a înregistrat o creștere a concentrației de alcooli superiori, acetali și arome variate. Cu toate acestea, levurile *Hanseniaspora* pot fi asociate cu producția de concentrații semnificative și nefavorabile ale unor compuși, cum ar fi acidul acetic, selecția levurilor este crucială, deoarece s-a raportat o mare varietate între diferitele tulpini de *Hanseniaspora*. O altă specie, *H. guilliermondii*, a fost detectată cu o relativă abundență mai mare în probele VCH (40,0%) și VFN (31,0%). O tulpină de *H. guilliermondii*, s-a distins printr-o activitate marcată de β -glucosidază extracelulară și un potențial fermentativ bun.

Metschnikowia spp. este un tip de levură non-*Saccharomyces*, care efectuează fermentația înainte ca fermentația alcoolică să aibă loc, fiind recunoscută pentru o capacitate mai scăzută de producere a alcoolului față de *S. cerevisiae*, care poate varia între 20% - 30%. Avantajul acestui lucru este că aroma varietală nu este mascată de concentrația ridicată de alcool [162]. Cu toate că *M. pulcherrima* a fost izolată în recoltele din 2018 și 2020, rezultatele NGS din 2022 au arătat că două specii cu frecvență mare aparțin genului *Metschnikowia*: *M. rubicola* și *M. shanxiensis*. Genul de levuri ascomycetous *Metschnikowia* cuprinde peste 80 de specii [163]. *M. pulcherrima* cu spori mici și cinci specii înrudite (*M. andauensis*, *M. fruticola*, *M. shanxiensis*, *M. sinensis* și *M. ziziphicola*) produc pulcherrimin, un pigment roșu-brun în celulele lor și, de asemenea, extern, în mediu, observabil sub forma de halo în jurul coloniilor care cresc pe medii de agar [164]. Majoritatea speciilor *Metschnikowia* nu sunt răspândite ecologic, dar prezintă un grad ridicat de specializare [165, 166]. Speciile *M. pulcherrima* par să fie asociate, în principal, cu insectele care se hrănesc cu fructe. În mediile legate de podgorii și vinuri, s-au raportat speciile *M. pulcherrima*, *M. fruticola* și *M. viticola* [167], în acest studiu, *M. viticola* a fost detectată în proba SCH (0,5%). *M. pulcherrima* nu a fost detectată. Având în vedere inexactitatea metodelor tradiționale de secvențiere, menționată în capitolul I, este posibil ca levurile izolate în 2018 și 2020 să fie *M. shanxiensis*, care pot produce, de asemenea, pigment roșu.

Torulaspora delbrueckii a fost găsită în toate probele cu excepția celei din VFN, unde CCH a fost mai mare. *T. delbrueckii* este cea mai studiată și comercializată specie non-*Saccharomyces* în vinificație [168]. Managementul lui *T. delbrueckii* este relativ ușor în comparație cu alte specii non-*Saccharomyces* datorită puterii sale relativ ridicate de fermentație de până la 9-10% volum, în timp ce mai multe specii non-*Saccharomyces*, cum ar fi: *M. pulcherrima*, *P. guilliermondii*, *P. kluyveri*, *S. stellata* și *H. vineae*, nu tolerează concentrații de etanol mai mari de 4% volum. Datorită rezistenței la etanol, această specie poate influența semnificativ calitatea produsului final al vinului pe parcursul celei mai mari părți a perioadei de fermentație alcoolice.

Una dintre primele avantaje atribuite speciei *T. delbrueckii* a fost reducerea concentrației de aciditate volatilă din vinuri. Unii autori au raportat reduceri ale concentrației finale de acid acetic în jur de 0,14-0,28 g/dm³ în comparație cu *S. cerevisiae*. Aplicarea *T. delbrueckii* poate reduce concentrația finală de etanol în vinuri cu până la 1%, în timp ce crește concentrația de glicerol de la 0,2 la 0,9 g/dm³. Mai mulți autori raportează că *T. delbrueckii* eliberează mai multe manoproteine decât *Saccharomyces* și alte specii non-*Saccharomyces*. Consumul moderat de acid malic de către *Saccharomyces* a fost frecvent observat în fermentările secvențiale, în cantități cuprinse între 20% și 25%.

T. delbrueckii poate îmbunătăți intensitatea și calitatea aromei vinului, crescând impresia generală și caracterele varietale și fructate [169]. *T. delbrueckii* este capabil să reducă concentrațiile de alcooli superiori atunci când este utilizat în fermentații secvențiale cu *S. cerevisiae* [170]. Acest efect contribuie la o creștere în percepția a caracterului varietal. Cu toate acestea, s-a raportat și o creștere a producției de alcool [171]. Mai mulți autori au raportat producerea de concentrații finale mai mari de esteri fructați. În contrast, alte studii au raportat efectul opus [172]. Aceste diferențe în formarea alcoolilor superiori și a esterilor au fost explicate prin variabilitatea mare a tulpinilor în diversitate de specie [169, 173]. *T. delbrueckii* se presupune că eliberează terpene conjugate în unele soiuri de vin caracterizate de acești compuși varietali. În plus, selecția corespunzătoare a tulpinii de *T. delbrueckii* permite eliberarea unor concentrații mai mari de tioli, care cresc caracterul varietal al soiurilor precum Sauvignon Blanc sau Verdejo [168].

Alte aspecte de interes biotehnologic ale acestei specii au fost larg descrise în literatură, astfel, s-a demonstrat că *Torulaspora delbrueckii* este capabilă să producă hidroxitirozol, cunoscut ca compus bioactiv [173]. Interacțiunea *S. cerevisiae* cu *T. delbrueckii* poate juca un rol major prin

activarea sau inhibarea anumitor căi metabolice [174], în special în metabolismul carbohidraților și azotului. Având în vedere proprietățile *T. delbrueckii*, reprezentanții de preparate oenologice comercializează această specie pentru aplicații oenologice mixte.

Specia *T. delbrueckii* în Republica Moldova poate să apară natural în struguri, fapt ce permite utilizarea sa ca potențial promotor al fermentației, cu precădere aplicații în industria vinicolă locală și neapărat verificate ulterior abilitățile acestora.

O altă specie *Mortierella spp.* este un fung filamentos răspândit, adesea găsit în soluri, considerat un fung favorizant creșterii plantelor, cu creștere rapidă și rezistență în medii sărace în nutrienți [175]. Acest reprezentant a fost descoperită în fiecare eșantion, dar în SCH (1,54%) și VFN (1,40%) relativ abundența este mai mare, în timp ce în celelalte eșantioane este mai mică de 1%. Relativ abundența *Mortierella* pe struguri este adesea accidentală, putând fi influențată de factori de mediu externi, cum ar fi sporii din sol depuși pe suprafața strugurilor prin intermediul vântului sau insectelor, sau prin influența anumitor microbi specifici.

Meyerozyma guilliermondii este recunoscută pentru funcția sa de îmbunătățire a culorii vinului, acest fung se găsește într-o abundență relativă mai mare în VCS (3,7%). Este vorba despre o specie de fung cu o activitate enzimatică ridicată de decarboxilare a hidroxicinamatului, producând adaosuri de pirano-antocianină, care se condensează cu antocianinele din struguri pentru a produce compuși cu culoare stabilă. Acest fung este apreciat și pentru funcția sa antagonistică, reprimă creșterea patogenilor, fie prin competiție cu aceștia pentru spațiu și nutrienți, fie prin eliberarea de compuși antifungici, așa cum se evidențiază în tabelul 3.7. Se observă că numărul speciilor în proba VCS este cel mai scăzut, indicând posibilă inhibare a creșterii altor fungi de către acesta [176].

3.2.3. Prognoza funcțională

În vederea prognozării funcționalității microbiomului studiat au fost utilizate funcțiile Trophic Mode (descrie modul de nutriție al microorganismelor) și Guild (indică rolul ecologic al acestora). Saprotrofele sunt microorganisme care obțin energie și nutrienți prin descompunerea materiei organice și au un rol important în descompunerea materiilor organice. Ele pot fi saprotrofe nedefinite (Undefined Saprotroph) sau tipuri specifice de saprotrofe (cum ar fi patogenii plantelor). Pathotrofele reprezintă microorganisme adesea asociate cu boli sau parazitism și au un rol

important în patogenitatea microorganismelor vegetale sau animale. Symbiotrofele sunt microorganisme ce formează relații simbiotice cu alte organisme și pot fi micorize endotroifice (*Endomycorrhizal*) sau micorize ectotroifice (*Ectomycorrhizal*), sau pot forma alte tipuri de relații simbiotice cu plantele sau animalele.

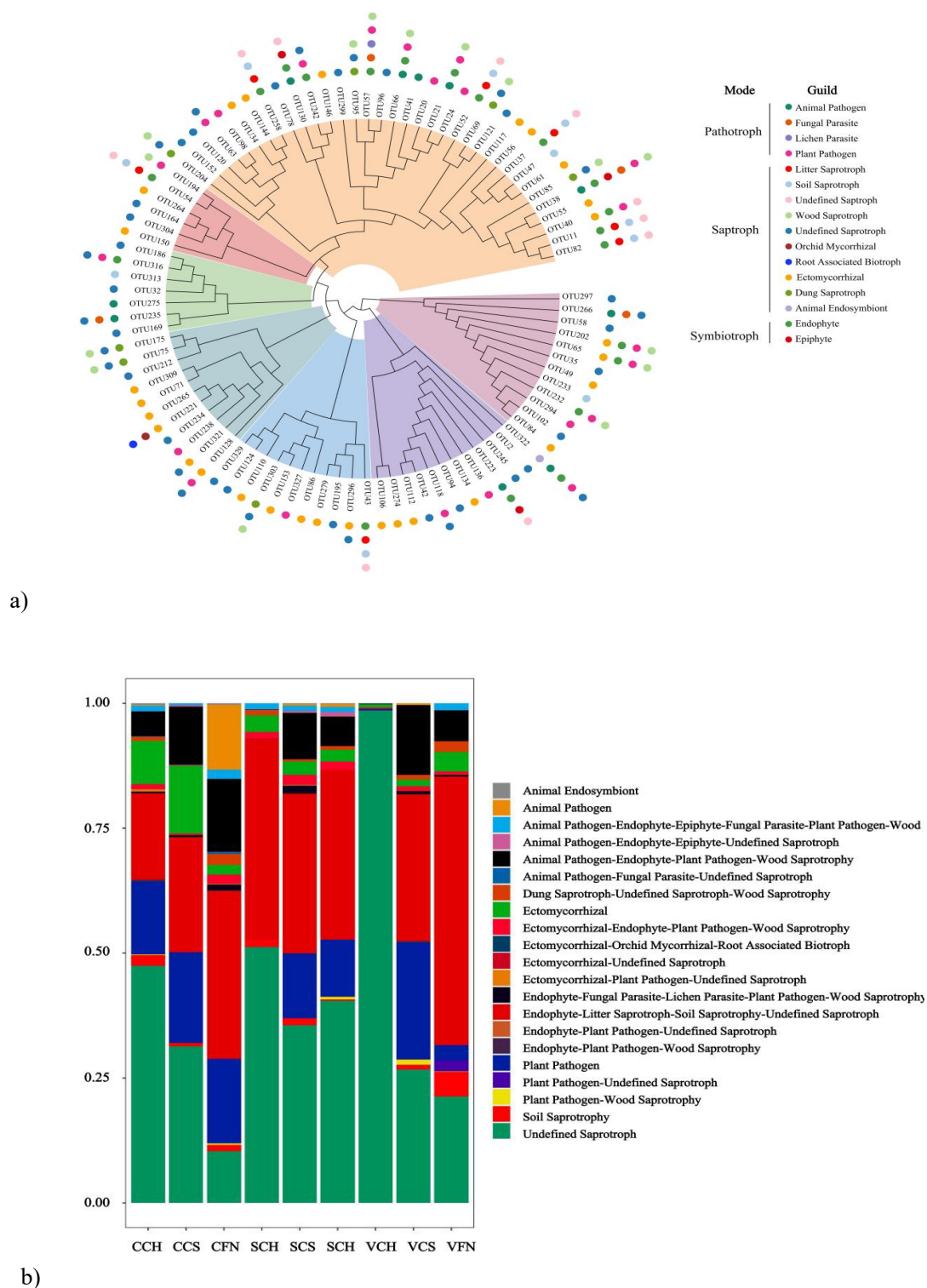


Figura 3.14. Prognoza funcțională a fungilor.

Saprotrofia este modul trofic fungal cel mai abundent în toate probele, cu toate acestea, doar câteva OTU-uri se potrivesc cu baza de date (CCH: 1,4%, CCS: 1,4%, CFN: 1,5%, SCH: 1,5%, SCH: 3,8%, SCS: 1,5%, SFN: 2,0%, VCH: 46,5%, VCS: 0,6% și VFN: 2,5%). Proba VCH are o abundență relativ mai mare a OTU-urilor potrivite, datorită conținutului mai ridicat de *S. cerevisiae* în această probă, *S. cerevisiae* fiind clasificată ca „Saprotrof nedefinit” (figura 3.14 a). Saprotrofele au un rol important în procesul de fermentare a vinului, descompunând materia organică, promovând proliferarea drojdiilor și bacteriilor și influențând aroma și calitatea vinului, având un impact asupra procesului de fermentare a vinului și a calității produsului final.

În timpul fermentării vinului, microorganismele parazite pot avea efecte negative, incluzând competiția și controlul microorganismelor benefice, influențarea vitezei și eficienței fermentării, modificarea aromei și aromei vinului, precum și reducerea calității acestuia. În figura 3.14. b se poate observa că principalii agenți patogeni sunt Patogeni vegetali, acești microbi fiind adesea asociate cu bolile plantelor și pot fi prezenți în timpul maturării și recoltării strugurilor. În proba CFN, s-a observat o cantitate semnificativă de Patogeni animalii, acest lucru se datorează probabil influenței animalelor sălbatice din jurul viței-de-vie, aceste animale putând intra în contact cu strugurii sau pot fi prezente în apropierea viței-de-vie în timpul maturării, potențial introducând patogeni animalii în struguri.

Ieșirea KEGG este vastă, pentru o analiză generală, rezultatele KEGG au fost împărțite în 3 grupuri (C: IGP Codru, S: IGP Stefan Voda, V: IGP Valul lui Traian) și analizate comparativ. Caracteristicile funcționale ale bacteriilor au fost analizate cu ajutorul PICRUST, care este proiectat pentru a prezice profilul metabolic al microorganismelor din datele de secvențiere ale genei de marcator utilizând baza de date KEGG, reprezentare inclusă în figura 3.15.

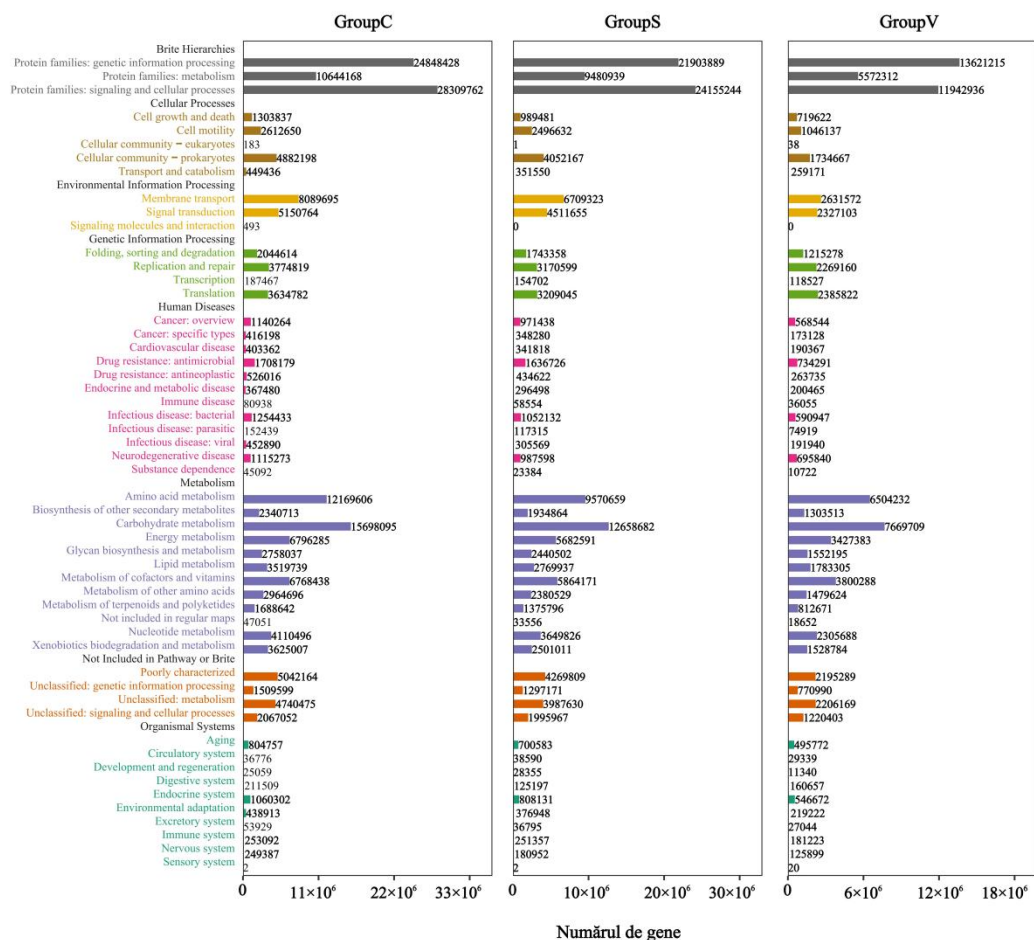


Figura 3.15. Caracteristicile funcționale ale bacteriilor

Chiar dacă baza de date KEGG clasifică funcțiile bacteriilor într-o varietate de moduri, cum se arată în figura 3.15, în procesul de fermentație a vinului, prezintă interes funcția metabolică a bacteriilor.

Pentru procesul de fermentare, căile metabolice ale bacteriilor găsite în mustul de struguri sunt de cea mai mare importanță, având în vedere că produsele lor metabolice contribuie la aromele vinului și pot avea efecte pozitive sau negative asupra calității vinului. În figura 3.16. sunt reprezentate categoriile metabolice pentru fiecare eșantion. În general, proporțiile diferitelor căi metabolice nu diferă semnificativ între cele 9 eșantioane de studiu. Printre acestea, metabolismul carbohidraților, metabolismul aminoacizilor și metabolismul co-factorilor și vitaminelor sunt predominante, ceea ce duce la producerea de metaboliți benefici.

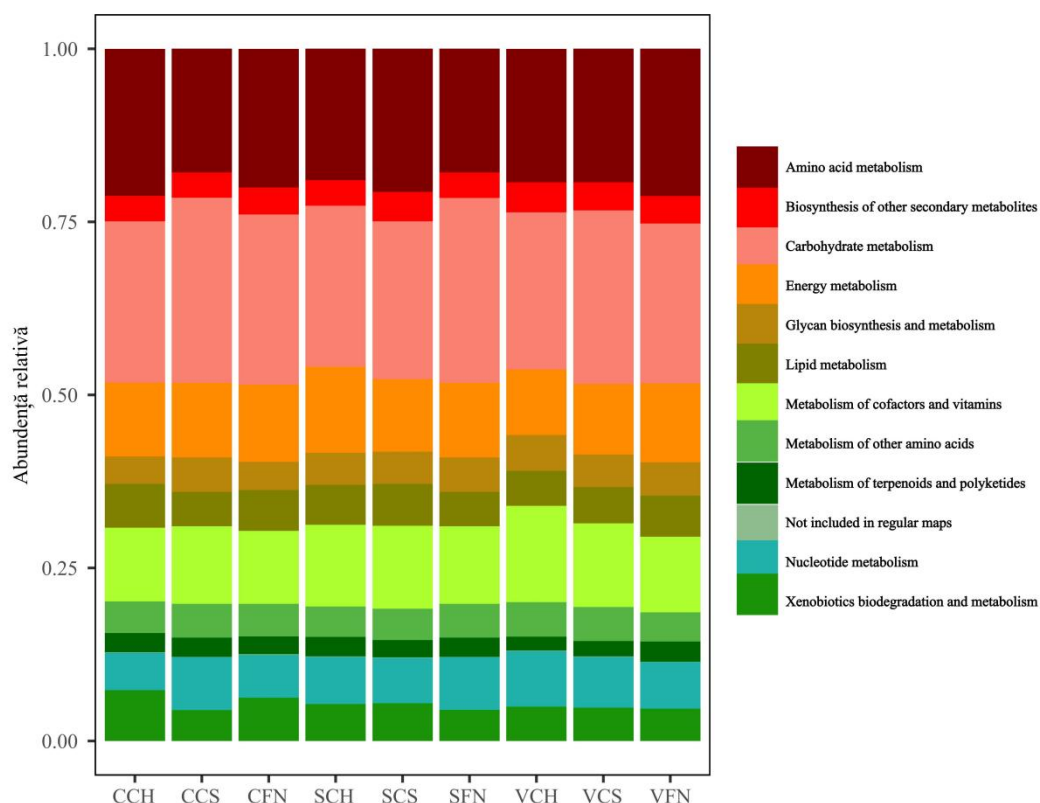


Figura 3.16. Abundența relativă a diferitelor funcții metabolice bacteriene în fiecare probă

În aceste căi metabolice, metabolismul carbohidraților ocupă cea mai mare proporție. Bacteriile care utilizează căile metabolice ale carbohidraților pot juca un rol important în fermentarea vinului, acestea putând folosi surse de carbon precum glucoza pentru fermentație și producția de alcool și acizi organici. Pe locul doi este metabolismul aminoacizilor, iar în procesul de fermentare a vinului, bacteriile care utilizează această cale metabolică pot participa la eliberarea surselor de azot din proteine și aminoacizi și la transformarea acestora în aminoacizi care servesc ca sursă de energie pentru creșterea și metabolismul microorganismelor. Pe locul trei în procesul de fermentare a vinului este metabolismul co-factorilor și vitaminelor. Această cale metabolică implică sinteza, degradarea și utilizarea cofactorilor și vitaminelor, ceea ce este crucial pentru creșterea microorganismelor, metabolismul și o varietate de reacții biochimice în procesul de fermentare a vinului.

3.3. Concluzii la Capitolul III

Microorganismele de pe strugurii din RM au fost studiate în perioada recoltărilor din 2018 până în 2020, cu accent pe cuantificarea (analiza cantitativa) microorganismelor folosind diferite metode. Microorganismele au fost izolate de pe suprafața boabelor de strugure și din must,

dezvăluind populații variabile de levuri și bacterii în diferite recolte, soiuri de struguri și regiuni. Numărul de levuri de pe suprafața boabelor de strugure a variat de la 2,2 E+04 până la 3,9 E+07 UFC/bob cu metoda 1 și de la 4,1E+02 la 8,0E+06 folosind metoda 2. Similar, izolarea din must a arătat populații de levuri variabile de la niveluri foarte scăzute până la 3,1E+06 UFC/bob pentru metoda 1 și de la 3,0E+03 la 2,0E+05 pentru metoda 2. Numărul bacteriilor a fost constant scăzut în toate metodele și recoltele realizate, cu câteva excepții.

Analiza comparativă prin diagrame box-plot a relevat diferențe semnificative în populațiile de levuri în funcție de recoltă și soi, dar nu neapărat de regiune. ANOVA a evidențiat recolta ca fiind un factor semnificativ care afectează numărul de levuri, în special numărul de levuri de pe suprafața boabelor strugure, în timp ce soiul a influențat semnificativ numărul de levuri din must. Rezultatele izolării au dezvăluit diverse specii de levuri și bacterii, inclusiv: *Rhodotorula glutins*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Aurebasidium pullulans*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pediococcus damnosus*, *Lactobacilles breis*, *Lactobacilles fermentum* și *Gluconbacter oxydans*. Diferitele recolte au prezentat schimbări în speciile microbiene predominante, cu diferențe remarcabile în tulpinile de *S. cerevisiae* între anii 2018, 2019 și 2020.

Metoda de spălare a bobitelor de struguri s-a dovedit a fi mai eficientă în îndepărtarea microorganismelor de pe suprafețele strugurilor, în timp ce numărul de levuri a variat semnificativ în funcție de recoltă și soi de struguri. Numărul bacterian a rămas constant scăzut.

Influența climatului și a utilizării produselor fitosanitare asupra numărului de levuri a fost examinată, evidențiind corelații între condițiile climatice, tratamentele fitosanitare și numărul de levuri în diferite recolte și regiuni. Analiza indicilor climatici (HI, CI, DI) în trei recolte și regiuni IGP a arătat modele climatice variate, cu diferențe observate în temperatură și umiditate. Recolta din 2020 a prezentat temperaturi mai scăzute în comparație cu anii anteriori, afectând potențialul numărului de levuri.

Utilizarea produselor fitosanitare, măsurată prin TFI, a variat între podgorii, cu podgorii convenționale care prezintă valori mai mari ale TFI-ului. Analiza de corelație Pearson a dezvăluit relații complexe între utilizarea produselor fitosanitare și populațiile de levuri. Produsele fitosanitare pentru combaterea fâinării reduc numărul de levuri cultivate, dar cresc numărul total de levuri de pe suprafața bobului. În plus, corelația între factorii climatici și populațiile de levuri a arătat relații contrastante: temperaturile reci ale nopților înaintea recoltării strugurilor inhibă atât

levurile cultivate, cât și numărul total de levuri, pe când temperatura mai ridicată în perioada vegetativă reduce numărul total de levuri în mustul de struguri.

Studiul diversității microbiene realizat în recolta din 2022 a avut ca scop caracterizarea structurii microbiene a strugurilor din Moldova și identificarea amprentelor microbiene în trei regiuni cu Indicație Geografică Protejată (IGP). După secvențiere și optimizare, s-au obținut secvențe fungice și bacteriene de înaltă calitate, îndeplinind cerințele pentru rezultate de secvențiere fiabile. Curbele de rarificare au indicat o adâncime suficientă a secvențierii.

Analiza Venn a relevat similarități și diferențe în compoziția unităților taxonomice operaționale (OTU) între mostrele microbiene. Numărul de OTU-uri microbiene a variat între mostre, în care s-a stabilit că IGP Valul lui Traian prezintă cea mai bogată diversitate microbiană.

Analiza structurii microbiene la nivel de filum și gen a dezvăluit valoarea informatică privind compoziția fungilor și bacteriilor asociate cu strugurii din Moldova. Astfel, la nivelul încrângătura, fungii au fost predominant clasificați în cinci filume, cu *Ascomycota* fiind cel mai abundent. Bacteriile au fost clasificate în 16 încrângătura, cu *Proteobacteria* dominând comunitatea microbiană.

La nivel de gen, *Hanseniaspora* a fost cel mai prevalent gen fungic, urmat de *Saccharomyces* și *Metschnikowia*. Printre bacterii, *Gluconobacteria*, *Tatumella* și *Chryseobacterium* au fost cele mai abundente genuri. Prezența anumitor genuri, cum ar fi *Hanseniaspora* și *Tatumella*, a fost asociată cu procesele de fermentație spontană realizate.

Analiza ANOVA nu a identificat genuri specifice ca biomarkeri pentru regiunile IGP sau soiurile de struguri, cu excepția tipului *Erysiphe*, care a prezentat diferențe semnificative între podgorii, probabil din cauza variațiilor în practicile de management al viței-de-vie.

Interacțiunile microbiene joacă un rol crucial în modelarea structurii comunității microbiene asociate cu strugurii din RM, așa cum au evidențiat diverse studii. Coeficienții de corelație Pearson și valorile P au fost calculate pentru a ilustra topologia rețelei benefice sau antagoniste între comunitățile microbiene. Analiza de corelație (ilustrată în figura 3.12) denotă că anumiți fungi precum *Meyerozyma* au fost găsiți să coreleze negativ cu majoritatea bacteriilor și fungilor. Acest lucru sugerează un posibil rol de biocontrol pentru *Meyerozyma*, deoarece speciile de drojdii au fost dezvoltate ca agenți de biocontrol (BCA-uri) pentru a inhiba creșterea patogenilor. Prezența *Saccharomyces* a arătat o corelație pozitivă cu bacteriile acide acetice (AAB)

Gluconobacter, indicând că odată cu progresia fermentației spontane, apar mai multe AAB. În plus, *Metschnikowia* și *Torulaspora*, două genuri de levuri non-*Saccharomyces*, au fost găsite să coreleze pozitiv cu anumite bacterii, sugerând interacțiuni potențiale între aceste microorganisme în timpul fermentației. Pe de altă parte, apariția tipului *Tatumella* a prezentat o corelație negativă cu aproape toate celelalte genuri bacteriene, indicând un posibil efect inhibitor asupra altor bacterii. La nivel de specie, *Hanseniaspora uvarum* a fost cea mai abundentă specie de levuri în funcție de mostre. Aplicarea *H. uvarum* în fermentația mixtă cu *Saccharomyces cerevisiae* a fost raportată să producă vinuri semnificativ diferite față de culturile pure de *S. cerevisiae*, cu concentrații crescute de alcooli superiori și acetat. Speciile *Metschnikowia* au fost, de asemenea, detectate, cunoscute pentru capacitatea lor mai slabă de producere a alcoolilor în comparație cu *S. cerevisiae*, permițând o mai bună conservare a aromei varietale a vinurilor.

Torulaspora delbrueckii, o specie non-*Saccharomyces*, a fost găsită în toate mostrele cu excepția uneia, cu avantaje raportate incluzând reduceri în concentrația de aciditate volatilă și în concentrația finală de etanol în vinuri. Tipul *T. delbrueckii* este, de asemenea, cunoscută pentru îmbunătățirea intensității și calității aromei vinului prin creșterea caracterelor fructate ale acestora.

Predicția funcțională a diversității fungice în stadiile timpurii ale fermentației spontane a fost realizată folosind baza de date FUNGuild. OTU-urile fungice din toate mostrele au fost clasificate în 16 categorii și 3 moduri trofice. Saprotroph a fost identificat ca fiind modul trofic fungic cel mai abundent în toate mostrele. Cu toate acestea, doar câteva OTU-uri s-au potrivit cu baza de date, cu variații ale abundențelor relative între mostre. Mostrele VCH au prezentat o abundență relativă mai mare a OTU-urilor potrivite, atribuită conținutului mai mare de *S. cerevisiae*, clasificat ca un „Saprotrof nedefinit”.

Caracteristicile funcționale ale bacteriilor au fost analizate folosind PICRUST, proiectat pentru a prezice profilurile metabolice ale microorganismelor din datele de secvențiere ale genelor marcatoare folosind baza de date KEGG. Căile metabolice ale bacteriilor găsite în mustul de struguri au fost deosebit de interesante pentru procesele de fermentație, deoarece produsele lor metabolice contribuie la aromele și calitatea vinului. Categoriile metabolice dominante au inclus metabolismul carbohidraților, urmat de metabolismul aminoacizilor și metabolismul co-factorilor și vitaminelor, conducând la producerea de metaboliți benefici.

IV. IMPLEMENTAREA TEHNOLOGIEI DE BIOPROTECȚIE ȘI OPTIMIZAREA PREGĂTIRII MAIELEI DE LEVURI INDIGENE PENTRU ASIGURAREA FERMENTAȚIILOR ALCOOLICE SUB CERTIFICAREA ECOLOGICĂ

În ultimul deceniu se încearcă cu mare insistență să se promoveze pe eticheta vinului mențiunea „vin ecologic” sau „vin ecologic”. Este bine cunoscut aspectul că, vinul este un produs mai „biologic” și mai „ecologic” decât majoritatea băuturilor nealcoolice răcoritoare, conservelor, produselor alimentare, etc., fiindcă conțin în rețetă conservanți ce au fost aboliți de multă vreme de legislația vinicolă.

Ideea de bioprotecție 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 SO₂.

Validarea rezultatelor cercetărilor și implementarea tehnologiei de valorificare a comunității microbiene din cadrul studiului practic au fost realizate la ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L. la producerea vinurilor ecologice. În rezultatul implementării tehnologiei inovative în baza rezultatelor studiului experimental-practic a fost obținut vinului „Native de Purcari”. Strugurii prelucrați tehnologic au fost cultivați în podgoriile de la Purcari, pe o parcelă aflată în conversie la agricultura biologică, pe care sunt aplicate agrotehnici prietenoase mediului ambiant, biodiversității și fertilității solului. Conversia înseamnă trecerea de la agricultura convențională la cea ecologică pe o perioadă determinată de timp.

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

În procesul de dezvoltare a vinului cu bioprotecție au fost implicate mai multe soiuri de struguri și două tipuri de vin: roșu și rose sec. În acest capitol, discuția se concentrează doar pe vinul sec roșu din soiul Rară Neagră, utilizat ca exemplu de caz. Printre levuriile non-*Saccharomyces* utilizate ca agenți de bioprotecție sau într-o aplicație secvențială, speciile *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima* au fost luate în considerare. Prima, în asociere cu *S. cerevisiae* în inocularea secvențială, a demonstrat că eliberează esteri și astfel crește

intensitatea fructuozității vinurilor roșii [168]. Mai mult, *Torulaspora delbrueckii* s-a dovedit a fi un candidat promițător pentru colonizarea mustului și reducerea defectelor vinului.

În această secțiune, comparația este făcută între grupul de control al grupului C 1 și grupul de bioprotecție al vinului BP, fiecare grup incluzând două replicări. Aceeași specie de *S. cerevisiae* utilizată, iar cele *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima* au fost utilizate ca agent de bioprotecție adăugate la începutul vinificației, detaliul este prezentat în Anexa 2.

Rezultatele cineticii fermentării alcoolice sunt incluse în figura 4.1., din care se atestă o viteză de fermentare a vinului BP mai lentă decât cea a grupului C1, deși aceeași tulpină de *S. cerevisiae* a fost inoculată.

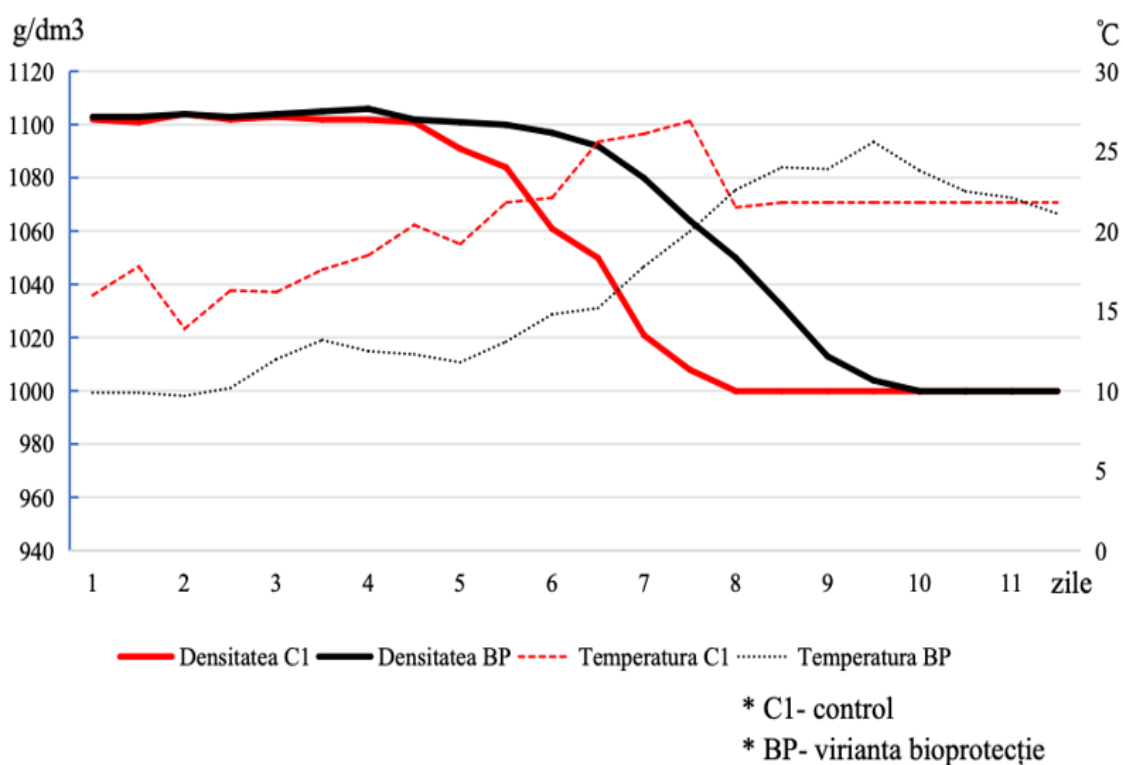


Figura 4.1. Dinamica fermentației alcoolice a probelor de vin studiate experimental .

Acest lucru se datorează activității antimicrobiene a speciei *M. pulcherrima* [178], care produce acid pulcherriminic și ulterior un complex de fier pulcherrimin, care ar putea încetini implantarea altor tulpini selectate în fermentația mixtă, sau ar putea întârzia dezvoltarea tulpinilor native sau inoculate de *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* capabile să epuizeze zaharurile în timpul fermentației.

Având în vedere rezultatele fizico-chimice ale probelor de studiu din tabelul 4.1, vinurile din Rară Neagră produse cu levuri non-*Saccharomyces* ca bioprotecție au fost caracterizate prin conținuturi mai mari a acizilor volatili și substanțelor fenolice totale, antociani totali, IPT predominant. Polifenolii și antocianii sunt compuși chimici esențiali care determină capacitatea antioxidantă și potențialul de maturare al vinului.

Tabelul 4.1. Analiza fizico-chimica a vinurilor de studiu
(* C1-Control, *BP-Bioprotecție)

Parametrii fizico-chimici	Unitatea de măsură	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 totali	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 substanțelor fenolice totale	mg/ dm ³	899,95±132,02b	1312,35±15,34a
Concentrația în masă a antocianilor totali	mg/ dm ³	191,65±14,64b	492,00±3,39a

Cu cât conținutul de polifenoli este mai mare, cu atât vinul poate rezista mai bine la oxidare, menținându-și mai bine aromele și structura pe parcursul maturării. Antocianii reprezintă principala sursă a culorii vinurilor roșii, putând forma polimeri care interacționează cu taninurile, îmbunătățind astfel corpul și stabilitatea culorii. Conform studiului practic Simonin, S. et al. [129] celulele *M. pulcherrima* au fost încă detectate la sfârșitul fermentației alcoolice. Produsul său metabolic, concentrația în masă a acidității volatile mare, explică concentrațiile ridicate de aciditate volatilă observate în grupul BP, care au fost semnificativ mai mari decât în grupul C1. Această observație este în acord cu studiul lui Sadoudi et al. [179], care arată că unele tulpini de *T. delbrueckii* produc cantități similare sau chiar mai mari de aciditate volatilă decât *S. cerevisiae*. Totuși, aciditatea volatilă a vinului de bioprotecție este totuși mai mică decât limita de 1,2 g/dm³. Deși, aciditatea volatilă este adesea considerată un ușor defect al vinului care conferă un gust de oțet sau un miros etereal și la concentrații scăzute se crede că crește complexitatea aromei fermentului natural.

În această cercetare, s-a observat o cantitate mai mare de antociani totali, ceea ce este complet contrar concluziei unui alt studiu, însă s-a presupus că diferențele semnificative observate depind în principal de compoziția fenolică inițială a matricei-strugurii de Rara Neagră.

Conținutul de polifenoli și antociani din grupul martor (C1) este de 899,95 mg/dm³ și respectiv de 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 mg/dm³, semnificativ mai mare decât grupul C1. Tehnologia de bioprotecție a crescut considerabil conținutul de antociani și polifenoli în vinuri. Creșterea conținutului de antociani și polifenoli sugerează că vinurile din grupul BP pot menține o culoare, structură și complexitate mai stabile pe parcursul maturării ulterioare a acestora. Nivelul ridicat de polifenoli poate contribui la o astringență mai pronunțată, însă acest aspect nu a fost observat în evaluarea senzorială.

În acest studiu, lipsesc datele referitoare la compoziția fenolică, însă există dovezi că *Bruxellensis* produce fenoli volatili și influențează negativ proprietățile vinului. Se poate presupune că rezultatele bioprotecției nu sunt aceleași ca ale SO₂, ele conduc la o concentrație diferită de *Bruxellensis* viu, ceea ce conduce la un IPT și substanțe fenolice totale evident mai mari. Și compoziția fenolică specială a grupului BP conduce la o cantitate mai mare de antociani. Concomitent cu capacitatea antioxidantă a SO₂, rolul important de a preveni izurile/defectele neplăcute în vin. Speciile non-*Saccharomyces* pot ajuta în biocontrolul formării izurilor neplăcute prin bioprotecție ca rezultat al competiției cu/sau eliminării microorganismelor sălbatice contaminate, prin producția de aciditate, prin competiția și epuizarea nutrienților, prin epuizarea precursorilor mirosurilor neplăcute sau prin adsorbția moleculelor defecte pe pereții celulelor.

Pentru a înțelege dacă bioprotecția funcționează bine în caracteristicile senzoriale, s-a efectuat o analiză senzorială între vinul cu bioprotecție și vinul de control. Procesul de degustare este descris în secțiunea 2.2.4., iar fișa de degustare utilizat în evaluarea senzorială este inclusă în figura 2.1 a, iar rezultatele medii ale aprecierii gustative sunt incluse în tabelul 4.2.

Tabelul 4.2. Rezultatele analizei organoleptice ale vinurilor de studiu
(* C1-Control, *BP-Bioprotecție)

Parametrul	Grupul C1	Grupul BP
Culoare		
Intensitatea	2,48±0,03a	2,81±0,12a
Nuanța	3,77±0,32a	4,10±0,28a
Aroma		
Intensitatea	2,15±0,08b	3,34±0,22a
Fructe	2,19±0,12b	3,76±0,05a
Vegetale	1,57±0,10a	1,87±0,33a
Complexitatea	2,30±0,56a	2,49±0,30a
Gust		
Structura	2,46±0,37a	2,90±0,01a
Corp	2,42±0,31a	2,95±0,06a
Tanin	2,05±0,06a	2,20±0,28a
Echilibru	3,17±0,66a	2,96±0,33a
Persistență	2,84±0,48a	2,90±0,01a

Conform datelor prezentate în tabelul 4.2, grupul BP a demonstrat îmbunătățiri semnificative (marcajele de semnificație statistică „a” și „b” evidențiază diferențe semnificative între grupuri) pentru următorii parametri:

- Intensitatea aromei (Aroma - Intensitatea) grupul BP a obținut un scor semnificativ mai mare comparativ cu grupul C1 (3,34 ± 0,22a față de 2,15 ± 0,08b).
- Aroma fructată (Aroma - Fructe) grupul BP a înregistrat un scor semnificativ mai ridicat față de grupul martor C1 (3,76 ± 0,05a față de 2,19 ± 0,12b).

Pentru ceilalți parametri (intensitatea culorii, complexitatea, echilibrul), deși scorurile grupului BP au fost mai mari, diferențele observate nu au fost semnificative din punct de vedere statistic (toate marcate cu „a”). Această lipsă de semnificație statistică ar putea fi atribuită variațiilor în date sau unei dimensiuni insuficiente a eșantionului.

Rezultatele analizei senzoriale au fost distribuite în diagrama radar inclusă în figura 4.2., din care scorul pentru aroma fructată al grupului BP a fost 3,76, ceea ce indică faptul că tehnologia de bioprotecție a îmbunătățit semnificativ caracteristicile fructate ale vinului.

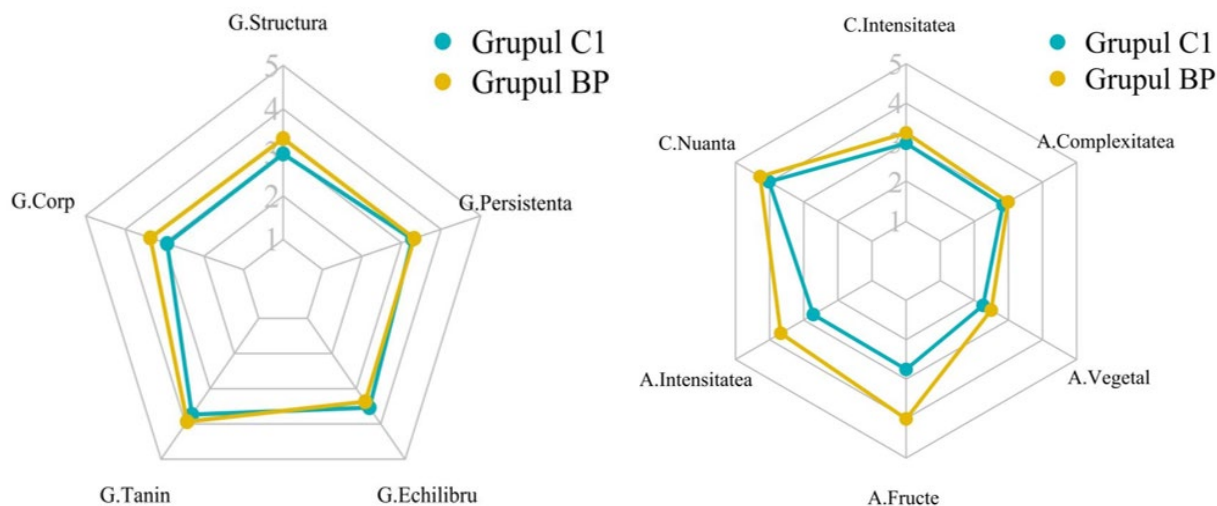


Figura 4.2. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu bioprotecție

În ceea ce privește intensitatea culorii (Culoare - Intensitatea), grupul BP a obținut un scor de 2,81, ușor mai mare decât cel al grupului C1 (2,48), însă diferența nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic (ambele marcate cu „a”). Acest lucru ar putea fi explicat prin faptul că diferența de conținut a antocianilor dintre cele două grupuri nu a fost suficient de mare pentru a se traduce într-o îmbunătățire perceptibilă a intensității culorii de către degustători.

Grupul BP a obținut scoruri mai mari și la parametrii „structură” (2,90), „corp” (2,95) și „tanin” (2,20), ceea ce sugerează că tehnologia de bioprotecție a contribuit la îmbunătățirea acestor caracteristici prin creșterea conținutului de polifenoli. Cu toate acestea, scorul pentru „echilibru” (Echilibru) al grupului BP a fost ușor mai scăzut (2,96 față de 3,17 în grupul C1), ceea ce ar putea fi descris de concentrații mai mari ai acidității volatile, care a generat o ușoară senzație de dezechilibru gustativ.

În ansamblu, grupul BP a demonstrat o performanță superioară față de grupul C1 în majoritatea parametrilor analizați. Tehnologia de bioprotecție a îmbunătățit semnificativ intensitatea aromei și caracterul fructat al vinului, aspecte esențiale pentru atractivitatea senzorială față de consumatori. De asemenea, scorurile mai mari pentru „structură”, „corp” și „tanin” sugerează o complexitate crescută și o mai bună integrare a componentelor fenolice.

Specia Torulaspora delbrueckii persistă în timpul fermentației alcoolice și influențează semnificativ compoziția vinului. Rezultatele acestui studiu confirmă lucrările anterioare care au evidențiat utilizarea *Torulaspora delbrueckii* în aplicații secvențiale și o percepție mai mare a fructozității și a aromei fermentate în comparație cu proba de control [181, 182].

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

Vinul cu MLI este o metodă tradițională, iar MLI-ul fermentat spontan, datorită prezenței mai multor tipuri de levuri autohtone, atât *S.cerevisiae* cât și non-*Saccharomyces*, este adesea considerat că ar adăuga vinului un stil local/authentic specific regiunii de cultivare a strugurilor. În această subsecțiune, pe lângă MLI-ul tradițional, a fost explorat și MLI-ul optimizat.

4.2.1. MLI tradițional

Rezultatele cineticii fermentării alcoolice în procesul de pregătire a MLI (anexa 3) sunt incluse în figura 4.3., din care fermentația alcoolică este lentă până la a 5 zi, după care are loc reducerea densității mediului fermentativ în următoarele zile. Dinamica variației temperaturii pe durata fermentației alcoolice a MLI este în limitele 15 – 28 °C, fără o evoluție ascendentă stabilă a parametrului de control.

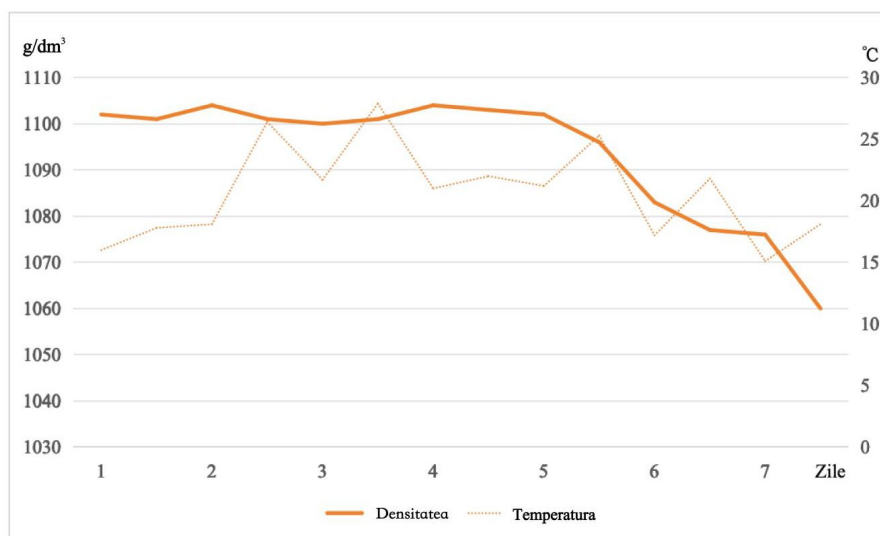


Figura 4.3. Dinamica fermentației alcoolice la pregătirea MLI

Conform dinamicii fermentației probelor MLI și C2 din figura 4.4., procesul de fermentație al grupului C2 este mai rapid și mai concentrat, densitatea scăzând brusc între zilele 6 și 7, ceea ce indică o activitate mai intensă a levurilor și o eficiență mai mare în conversia zaharurilor. În schimb, fermentația în grupul MLI este mai lentă, cu o scădere a densității mai graduală. Acest lucru poate fi atribuit implicării levurilor indigene non-*Saccharomyces*, care determină căi metabolice mai complexe, prelungind astfel durata procesului de fermentație.

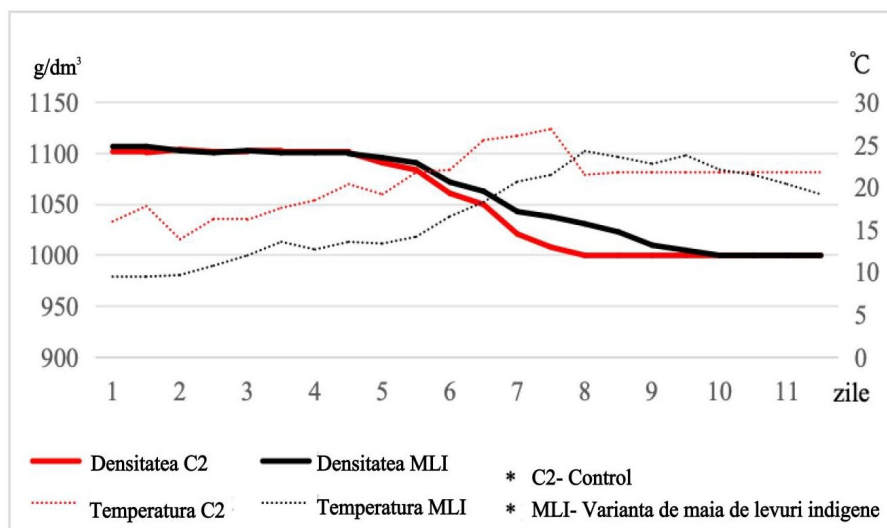


Figura 4.4. Dinamica fermentației alcoolice a MLI și vinului de control C2

Fermentația mai lentă din grupul MLI poate fi benefică pentru păstrarea aromei și complexității vinului, deoarece procesele mai lente permit un control mai bun al fluctuațiilor de temperatură și reduc acumularea prea rapidă a alcoolului, care ar putea afecta negativ profilul aromatic al produsului final. Deși tendințele de variație a temperaturii sunt similare între cele două grupuri, temperatura din grupul MLI este ușor mai ridicată, în special în a doua jumătate a fermentației (ziua 8-10). Acest lucru ar putea fi explicat prin activitatea metabolică intensificată a levurilor indigene, care generează mai multă căldură și conduce la o creștere moderată a temperaturii.

Rezultatele analizelor fizico-chimice din tabelul 4.3., arată că grupul MLI prezintă diferențe semnificative în compoziția chimică, evidențiind caracteristicile metabolice unice ale levurilor non-*Saccharomyces* implicate în procesul de fermentație. În primul rând, conținutul de acetat de etil al grupului MLI ($70,25 \pm 0,35a$) este semnificativ mai mare decât cel al grupului C2 ($60,55 \pm 0,35b$), ceea ce sugerează că activitatea metabolică a levurilor non-*Saccharomyces*, cum *Hanseniaspora uvarum*. De asemenea, creșterea semnificativă a izopentanolului ($244,45 \pm 5,87a$) ajută la sporirea complexității aromatice. Totuși, conținuturile mai scăzute de n-propanol și izobutanol în grupul MLI sugerează o posibilă inhibare metabolică a *S. cerevisiae* de către levurile non-*Saccharomyces*, ceea ce poate influența negativ corpul și structura vinului. Conținutul de acid succinic în grupul C2 ($0,45 \pm 0,11a$) este mai mare decât în grupul MLI ($0,30 \pm 0,11a$), ceea ce indică o eficiență metabolică mai ridicată a speciei *S. cerevisiae*.

Tabelul 4.3. Analiza fizico-chimica a vinurilor de studiu

(* C2-Control, *MLI- maia de levuri indigene)

Parametrul	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		
Aldehidă acetică	4,35±1,20a	4,30±2,97a
Etilacetat	60,55±0,35b	70,25±0,35a
Methanol	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	5,40±0,14a	5,70±1,27a
Concentrația în masă a 2,3-	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
Antociani, % din suma totală		
Delfinidin-3-glucozida	2,50±0a	3,10±0a
Cianidin-3-glucozida	0,90±0,14a	1,20±0a
Diglucozid malvidol	0,50±0,14a	0,25±0,07a
Petunidin-3-glucozida	4,00±0,14b	4,50±0a
Peonidin-3-glucozida	17,00±0,28b	18,30±0,28a
Malvidin-3-glucozida	64,35±1,77a	63,60±0,57a
ΣAntociani combinați	8,45±0,21a	6,20±0,99b

Nivelul de acid lactic, însă, nu prezintă diferențe semnificative între cele două grupuri (1,43±0,04a față de 1,52±0,23a), confirmând că activitatea metabolică a bacteriilor lactice sau a *S. cerevisiae* rămâne stabilă în ambele condiții.

Analiza antocianilor dezvăluie diferențe suplimentare între cele două grupuri în ceea ce privește culoarea și proprietățile antioxidante. Conținutul semnificativ mai mare de peonidin-3-glucozid în grupul MLI ($18,30 \pm 0,28a$ față de $17,00 \pm 0,28b$) sugerează un aport metabolic important al *T. delbrueckii*, ceea ce poate contribui la o intensitate mai ridicată a culorii percepute. Totuși, nivelul mai scăzut al antocianilor combinați în grupul MLI ($6,20 \pm 0,99b$ față de $8,45 \pm 0,21a$ în grupul C2) indică o posibilă degradare a acestora din cauza activității levurilor non-*Saccharomyces*, ceea ce poate afecta stabilitatea pe termen lung a culorii vinului.

Pe baza evaluării senzoriale (tabelul 4.4), diferențele generale de scor între grupul MLI și grupul C2 nu sunt semnificative, ceea ce indică faptul că cele două procese prezintă caracteristici senzoriale similare, dar unele tendințe specifice merită analizate și investigate în continuare.

Tabelul 4.4. Rezultatele analizei senzoriale ale vinului cu MLI

(* C2-Control, *MLI- maia de levuri indigene)

Parametru	Grupul C2	Grupul MLI
Culoare		
Intensitatea	$2,46 \pm 0,03a$	$2,50 \pm 0,71a$
Nuanța	$3,75 \pm 0,32a$	$3,67 \pm 0,04a$
Aroma		
Intensitatea	$2,46 \pm 0,08a$	$2,54 \pm 0,37a$
Fructe	$2,16 \pm 0,12a$	$2,16 \pm 0,48a$
Vegetale	$1,57 \pm 0,10a$	$1,76 \pm 0,08a$
Complexitatea	$2,30 \pm 0,56a$	$2,40 \pm 0,57a$
Gust		
Structura	$2,46 \pm 0,37a$	$2,63 \pm 0,24a$
Corp	$2,42 \pm 0,31a$	$2,63 \pm 0,51a$
Tanin	$2,05 \pm 0,06a$	$1,81 \pm 0,12a$
Echilibru	$3,17 \pm 0,66a$	$2,38 \pm 0,03a$
Persistență	$2,84 \pm 0,48a$	$2,57 \pm 0,04a$

Intensitatea culorii la grupul MLI ($2,50 \pm 0,71a$) este ușor mai mare decât în grupul C2 ($2,46 \pm 0,03a$), însă scorul pentru nuanță ($3,67 \pm 0,04a$ față de $3,75 \pm 0,32a$) este mai mic, ceea ce sugerează o performanță vizuală ușor inferioară în grupul MLI. Această diferență poate fi asociată cu nivelurile

mai scăzute de antociani combinați, care joacă un rol important în stabilitatea culorii pe termen lung. Intensitatea aromei în grupul MLI ($2,54 \pm 0,37a$ față de $2,46 \pm 0,08a$) și notele vegetale ($1,76 \pm 0,08a$ față de $1,57 \pm 0,10a$) sunt mai pronunțate decât în grupul C2, în timp ce notele fructate nu prezintă diferențe semnificative (ambele fiind $2,16 \pm 0,12a$). Aceste diferențe ar putea fi asociate cu nivelurile mai ridicate de acetat de etil și izopentanol în grupul MLI, compuși volatili cunoscuți pentru contribuția lor la arome dulci, fructate și la complexitatea aromatică generală.

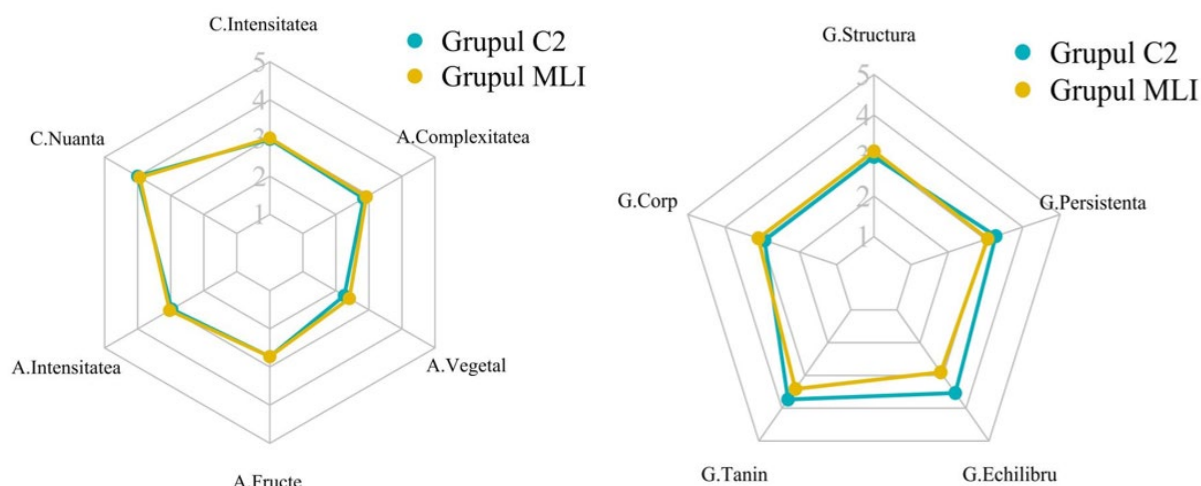


Figura 4.5. Diagrama radar a analizei senzoriale ale vinurilor cu MLI

Grupul MLI a înregistrat scoruri mai mari pentru „structură” ($2,63 \pm 0,24a$ față de $2,46 \pm 0,37a$) și „corp” ($2,63 \pm 0,51a$ față de $2,42 \pm 0,31a$). Cu toate acestea, scorurile pentru „tanin” ($1,81 \pm 0,12a$ față de $2,05 \pm 0,06a$) și „echilibru” ($2,38 \pm 0,03a$ față de $3,17 \pm 0,66a$) au fost mai mici în grupul MLI. Aceste diferențe pot fi explicate prin nivelurile mai scăzute de acid succinic și unii alcooli superiori, combinate cu o aciditate volatilă mai ridicată, care poate contribui la o ușoară senzație de dezechilibru.

4.2.2. MLI optimizat

MLI optimizat a fost realizat în laborator, iar procesul de vinificație s-a desfășurat conform descrierii din secțiunea 2.2.2. Figura 4.6. prezintă influența dinamicii fermentației asupra densității mustului în cazul MLI-T (MLI tradițional) și MLI-O (MLI optimizat). Curba MLI-O indică o viteză de fermentație mai rapidă, densitatea scăzând semnificativ în după-amiaza celei de-a doua zile și apropiindu-se de finalizare între zilele 4 și 5, ceea ce sugerează o conversie rapidă a zahărului în alcool și dioxid de carbon. Acest fenomen poate fi atribuit adăugării de vin în timpul procesului de pregătire a MLI-O, acțiune ce a inhibat activitatea unor drojdii non-*Saccharomyces* și bacterii, permițând prioritate activității fermentative a *S. cerevisiae*.

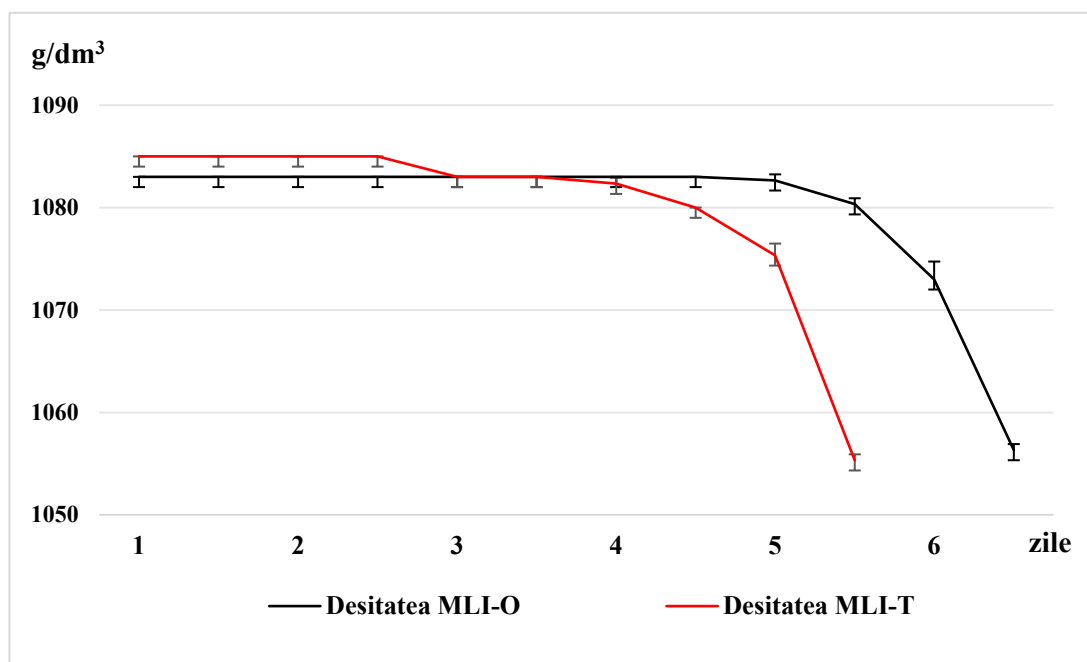


Figura 4.6. Dinamica fermentației alcoolice a pregătirii MLI-T și MLI-O

În contrast, curba MLI-T este mai lină, iar scăderea semnificativă a densității începe abia în ziua a treia, cu finalizarea principalului proces de fermentație între zilele 5 și 6, indicând o activare mai lentă a levurii în MLI-T. În plus, barele de eroare din grafic arată că metoda MLI-O produce rezultate experimentale mai consistente, în timp ce metoda MLI-T prezintă o variabilitate ușor mai mare, posibil legată de diversitatea microbiană din timpul fermentației.

În timpul pregătirii MLI, au fost prelevate mostre pentru studiul microbian la cele trei momente cheie în fiecare metodă: a) suc de struguri netratat (etape inițiale); b) începerea fermentației (etapa intermediară); c) finalizarea pregătirii MLI (etapa finală).

Diagrama 4.7 prezintă curbele de fermentație alcoolică ale celor trei grupe, în care au fost adăugate MLI-T, MLI-O și *S. cerevisiae* comercială. Deoarece în procesul de pregătire a MLI-O s-a adăugat aproximativ 120 ml de vin, iar în cazul MLI-T s-a adăugat 120 ml de apă sterilă, lichidul adăugat în cele două grupe de experimentare a dus la diluarea zahărului din mustul inițial. Așa cum este prezentat în diagrama 4.7, concentrațiile inițiale de zahăr nu sunt uniforme în cele trei loturi, precum și influența diferitelor metode de tratare asupra eficienței fermentației.

Grupul MT a prezentat cea mai mare eficiență a fermentației în fazele inițiale, în special între zilele 1 și 3, când densitatea a scăzut rapid. Acest rezultat se datorează, probabil, proliferării levurilor în timpul pregătirii MLI și diluării concentrației inițiale de zahăr prin adăugarea de apă, reducând astfel efectul inhibitor al presiunii osmotice.

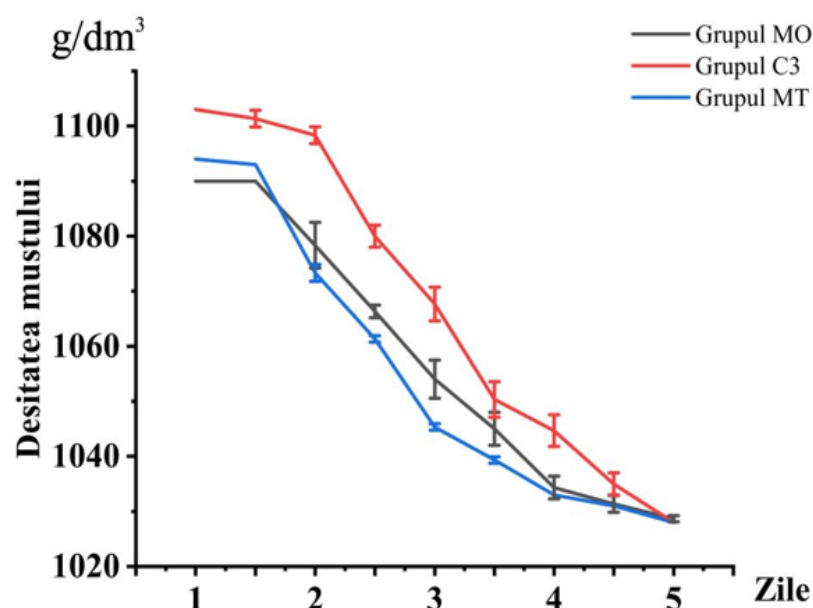


Figura 4.7. Dinamica fermentației alcoolice pentru cele două vinuri cu MLI și cel control.

În contrast, grupul MO a avut un început de fermentație mai lent, dar a înregistrat o viteză stabilă începând cu ziua a doua, ajungând aproape de final în ziua a cincea, ceea ce sugerează că adăugarea de vin a inhibat concurența microorganismelor nedorite, sporind stabilitatea fermentației. Grupul C3, pe de altă parte, a avut un început mai lent, posibil din cauza necesității de reactivare și adaptare a speciei *S. cerevisiae* comercială, deși viteza fermentației a crescut în etapele ulterioare, eficiența generală a rămas inferioară grupurilor MO și MT. Liniile de eroare arată că grupul MO a avut o consistență ridicată a rezultatelor experimentale.

În ceea ce privește analiza defectelor, toate cele trei seturi de 18 probe nu au prezentat defecte în ceea ce privește culoarea și gustul. Două treimi (4/6) dintre degustători au identificat defecte de aromă în toate probele din grupul MT, categorizând aceste defecte conform listei din tabelul 4.5. Cu toate acestea, trebuie menționat că aceste defecte, respectiv „bezină” și „redus”, transmit în principal sensuri similare. Jumătate dintre degustători au identificat defecte în proba MO1, în special „redus”.

Tabelul 4.5. Defectele vinurilor de studiu

Tipul probei	Degustător 1	Degustător 2	Degustător 3	Degustător 4	Degustător 5	Degustător 6
MT1	Benzină	Redus	Scăzut	Nu	Ceapă, benzină	Nu
MT2	Nu	Volatil	Nu	Nu	Ceapă, benzină	Nu
MT3	Ouă	Redus	Nu	Nu	Redus	Nu
MO1	Redus	Nu	Închis	Nu	Redus	Nu

Analiza PCA (Analiză de Componente Principale) efectuată pe scorurile degustătorilor este inclusă în figura 48. În plus, cele trei grupuri experimentale prezintă un clustering excelent în distribuția PCA. Este demn de remarcat faptul că mostra MO1, discutată anterior ca având defecte legate de aromă de către jumătate dintre degustători, este vizual distanțată de MO2 și MO3 în graficul PCA. Acest lucru sugerează că MO1 ar fi putut suferi evenimente neașteptate în timpul fermentației.

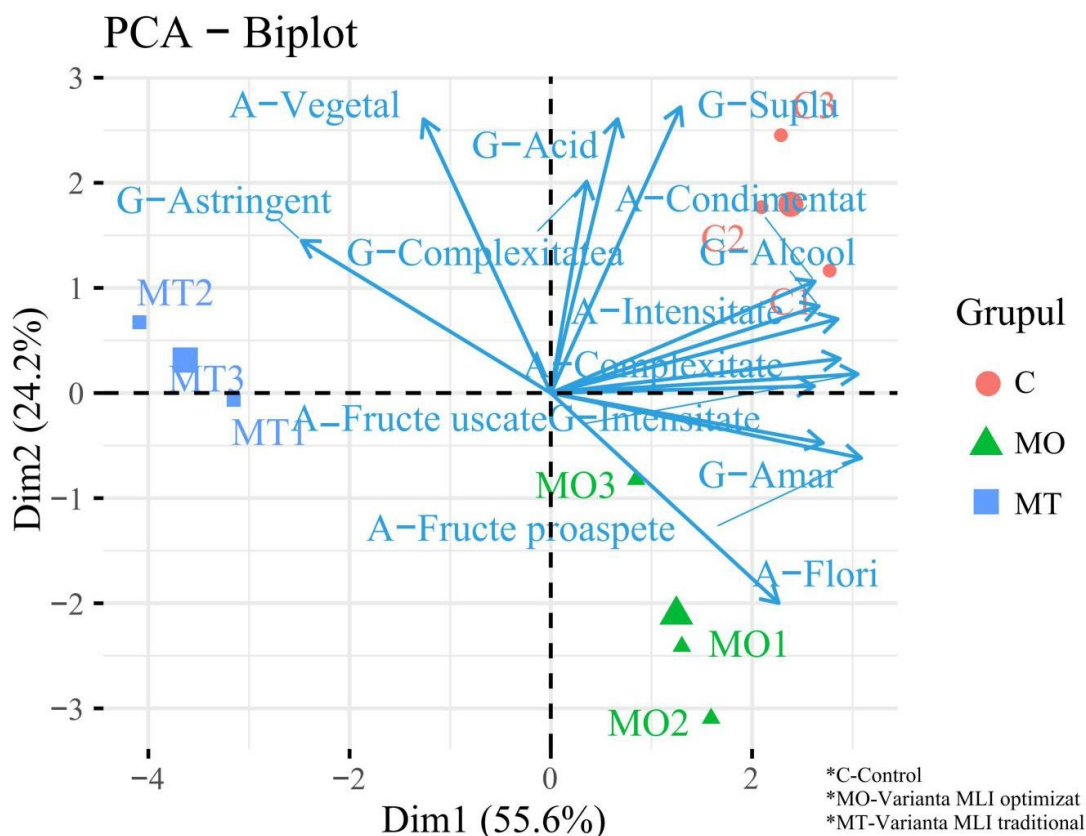


Figura 4.8. Analiza PCA a analizei senzorial

În analiza PCA, două componente principale pot explica $55.6\% + 24.2\% = 79.8\%$ din variație, indicând o putere de explicare puternică. Această analiză PCA este considerată eficientă. 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 MO2 și MO3 sunt apropiate de atributele „Fructe proaspete” și „Flori”, evidențiind caracteristici puternice de fructe proaspete și note florale. Cu toate acestea, MO1 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. **Dim1** este condus de attribute senzoriale pozitive, indicând direcția percepțiilor favorabile, în timp ce **Dim2** reflectă influența atributelor negative (cum ar fi „Amar”) și a unor attribute pozitive specifice (cum ar fi „Flori”), oferind o separare detaliată a probelor.

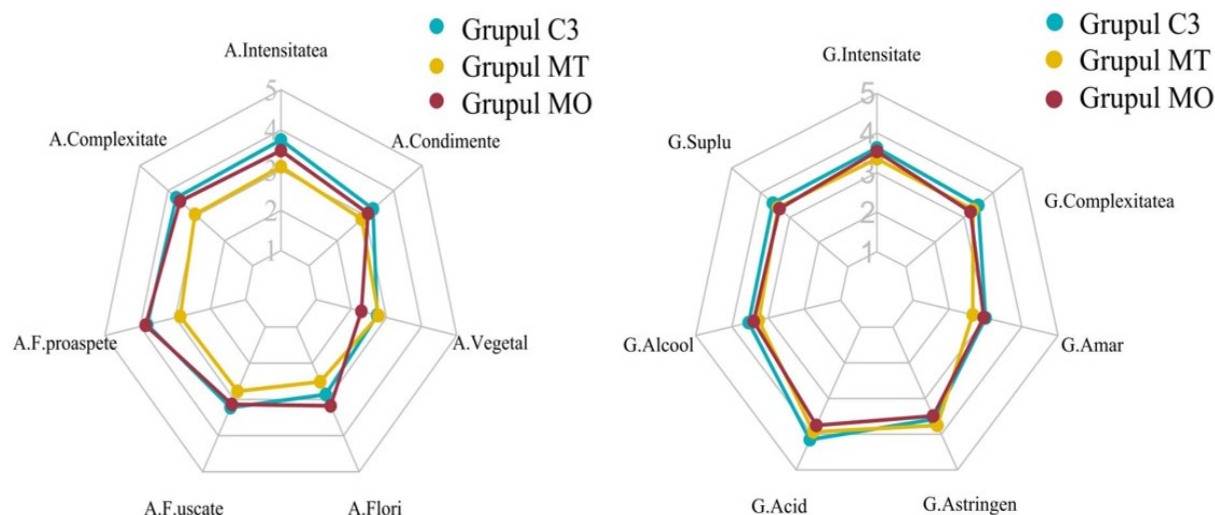
Per ansamblu, grupul C demonstrează cea mai bună calitate senzorială, grupul MO este aproape de C, dar MO1 indică posibile neconcordanțe în condițiile de fermentare. Grupul MT prezintă cea mai scăzută calitate senzorială, posibil datorită dezechilibrelor microbiene sau contribuției negative a compușilor volatili, ceea ce este în concordanță cu rezultatele anterioare ale analizei senzoriale descrise în tabelul 4.5.

Rezultatele evaluării senzoriale detaliate incluse în tabelul 4.6., denotă că grupurile C3 și MO nu prezintă diferențe semnificative la majoritatea indicatorilor de evaluare. Deși pe diagrama radar se observă scoruri de degustare mai mici pentru grupul MO în comparație cu grupul de control, doar Vegetal, Acid și Suplu prezintă diferențe semnificative. În mod specific, în grupul MO, acidul este mai mare decât în control, în timp ce celelalte două indicatori sunt mai mici.

Tabelul 4.6. Rezultatele analizei senzoriale

(* C3-Control, *MT- MLI tradițional și *MO- MLI optimizat)

Parametru	Grupul C3	Grupul MT	Grupul MO
Aroma			
Intensitate	3,44±0,19a	2,61±0,10b	3,11±0,19a
Complexitate	3,39±0,10a	2,56±0,19 b	3,22±0,19a
Fructe proaspete	3,50±0a	2,33±0,17b	3,56±0,10a
Fructe uscate	2,78±0,10a	2,22±0,10b	2,67±0a
Flori	2,33±0,17ab	1,89±0,25b	2,72±0,35a
Vegetal	2,17±0,17a	2,22±0,10a	1,61±0,10b
Condimente	2,83±0a	2,33±0,17b	2,61±0,19ab
Gust			
Intensitate	3,28±0,10a	2,94±±0,10b	3,17±0,17ab
Suplu	3,22±0,10a	3,00±0b	2,94±0,10b
Alcool	3,17±0,17a	2,83±0b	3,00±0a
Acid	3,94±0,10a	3,67±0,17ab	3,44±0,19b
Astringent	3,22±0,10ab	3,44±0,10a	3,11±0,10b
Amar	2,50 ±0,17a	2,06±0,10b	2,44±0,19a
Complexitate	3,11±0,10a	2,89±0,42a	2,78±0,10a



Pe de altă parte, grupul MT demonstrează diferențe semnificative față de grupurile MO și C3 în majoritatea indicatorilor, cu scoruri în general mai mici. După cum s-a menționat anterior, fiecare probă din grupul MT a fost observată să prezinte defecte de aromă. În această configurație experimentală, metoda MLI fortificată poate fi considerată o alternativă eficientă la fermentația spontană, grupul MO obține rezultate apropiate de cele obținute cu *S. cerevisiae* comercială.

Rezultatele analizelor fizico-chimice privind cele 3 probe de studiu sunt descrise în tabelul 4.7., în baza cărora nivelurile de aciditate volatilă ale vinurilor MLI din cele două grupuri (MO: $0,41 \pm 0,01b$ și MT: $0,43 \pm 0,01b$) au fost semnificativ mai scăzute decât cele din grupul de control (C3: $0,51 \pm 0a$).

Tabelul 4.7. Analiza fizico-chimica a vinurilor elaborate cu MLI optimizat

(* C3-Control, *MT- MLI tradițional și *MO-Varianta MLI optimizat)

Parametru	Grupul C 3	Grupul MO	Grupul MT
Concentrația alcoolică, % vol.	$12,08 \pm 0,02a$	$11,14 \pm 0,48a$	$12,03 \pm 0,80a$
Concentrația în masă a zahărului rezidual, g/dm ³	$3,75 \pm 0,05a$	$3,30 \pm 0,02a$	$3,46 \pm 0,26a$
pH	$3,44 \pm 0,02a$	$3,41 \pm 0,01a$	$3,47 \pm 0,02a$
Concentrația în masă a acizilor totali, g/dm ³	$5,33 \pm 0,01a$	$5,16 \pm 0,02a$	$5,16 \pm 0,25a$
Concentrația în masă a acizilor volatili, g/dm ³	$0,51 \pm 0a$	$0,41 \pm 0,01b$	$0,43 \pm 0,01b$
Concentrația în masă a acizilor organici, g/dm ³			
Malic	$0,60 \pm 0a$	$0,55 \pm 0,01b$	$0,55 \pm 0b$
Lactic	$0,59 \pm 0,01a$	$0,49 \pm 0,04a$	$0,59 \pm 0,07a$
Tartric	$1,92 \pm 0,11a$	$2,07 \pm 0,20a$	$2,00 \pm 0,02a$
Citric	$0,19 \pm 0,01a$	$0,21 \pm 0,01a$	$0,19 \pm 0,02a$

Conform valorilor fizico-chimice proba MLI prezintă o diversitate mai mare a comunităților microbiene, fermentația a fost controlată eficient în condiții de laborator, evitând generarea excesivă de subproduse. De asemenea, nivelurile de acid malic din cele două grupuri MLI (MO: $0,55 \pm 0b$ și MT: $0,55 \pm 0b$) au fost semnificativ mai scăzute decât cele din grupul de control ($0,60 \pm 0a$), ceea ce sugerează un grad mai mare de fermentație malo-lactică în grupurile MLI. Deși vinul MLI-O a fost pregătit cu adăugarea a 1,5% vol. de vin, conținutul final de alcool din grupul MO a fost mai scăzut decât cel din celelalte două grupuri, dar diferența nu a fost semnificativă.

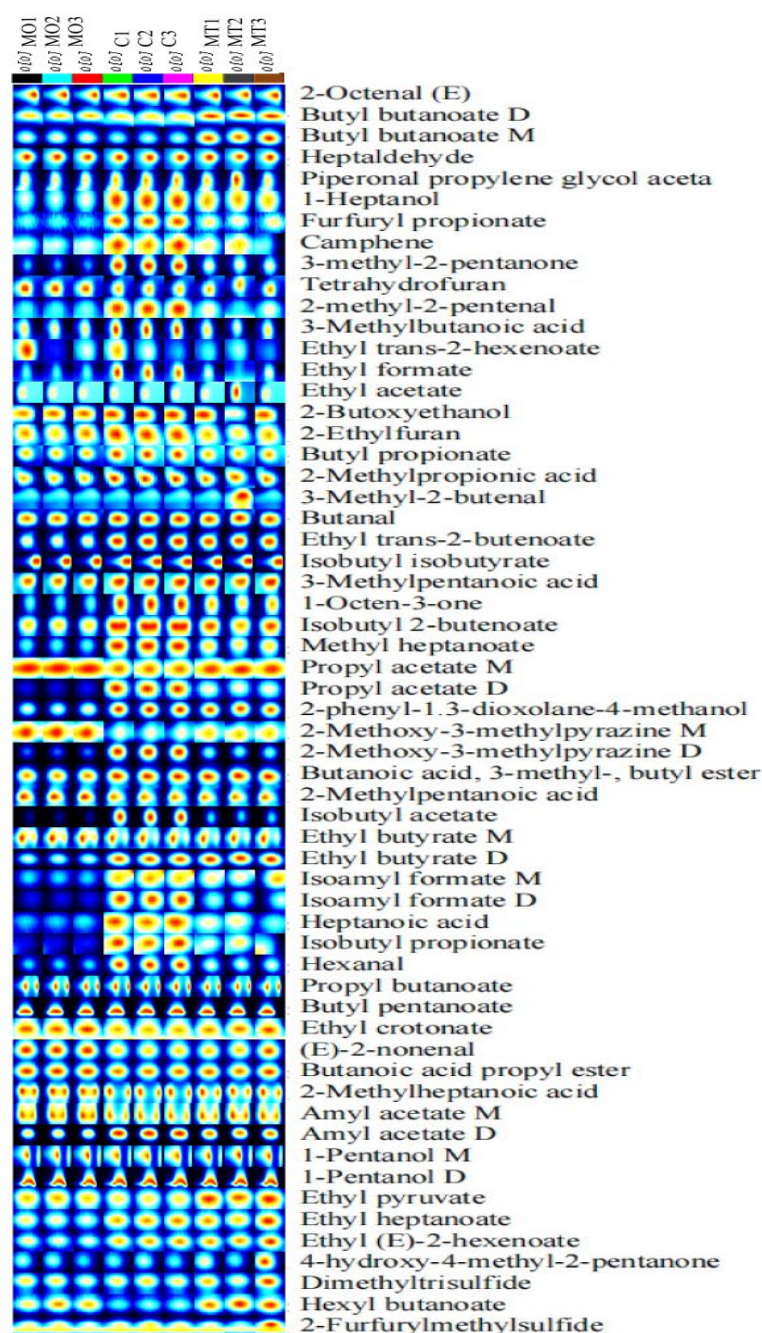


Figura 4.10. Amprelele compușilor volatili în două grupuri MDI și grupul de control.

Un total de 59 de compuși volatili au fost identificați, inclusiv 30 esteri, 6 alcooli, 7 aldehide, 3 cetone, 1 terpenă, 6 acizi, 2 tiole, 2 pirazine și 2 alți compuși. Rezultatele calitative sunt prezentate în figura 4.10. 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. Conform figurii 4.10 se poate observa că cele trei grupuri de vinuri prezintă concentrații relative foarte asemănătoare pentru compuși precum: 2-octenal (E), heptaldehidă, 2-butoxietanol, isobutil izobutirat, acid 3-metilpentanoic, butanoat de butil, acid 3-metil, acid 2-metilpentanoic, 1-pentanol (D), 1-pentanol (M), acetat de amil (D), acetat de amil (M), acid 2-metilheptanoic, butanoat de propil, butanoat de pentil și propanoat de butil. Acest profil poate fi asociat caracteristicilor aromatice ale soiului Fetească Neagră. Butanoatul de propil contribuie senzorial cu note de prune sau caise uscate, fiind direct legat de aroma de prune uscate. Acetatul de amil (D, M) și isobutil izobutirat pot, în anumite cazuri, să intensifice dulceața fructelor roșii, fiind apropiate de aroma de cireșe, pe când 2-Octenal (E) și heptaldehida pot oferi, la concentrații scăzute, note de piper negru. Aceste constatări sunt în concordanță cu caracteristicile senzoriale descrise pentru Fetească Neagră în studiul lui Wang [185, 186].

Grupul MT prezintă concentrații relative mai ridicate pentru 2-furfurilmetilsulfură și dimetiltrisulfură, compuși volatili care sunt de obicei considerați defecte senzoriale, aducând note de ceapă și alte arome neplăcute. Interacțiunile dintre compușii volatili sunt extrem de complexe. Deși grupul MO conține concentrații relativ mai scăzute ale unor esteri care contribuie la arome plăcute, acesta prezintă, de asemenea, un conținut redus de aldehide și compuși sulfurici care pot genera arome neplăcute. Acest echilibru contribuie la un profil aromatic mai agreabil pentru MO.

Rezultatele analizelor microbiologice în cadrul celor trei etape principale ale procesului de pregătire pentru MLI-T și MLI-O (înainte de începerea fermentației, etapa intermediară și finală) denotă o scădere a densității populației microbiomului (rezultate prezentate în figura 4.11.).

În timpul procesului de fermentare spontană a pregătirii MDI-T, MT1 a întâmpinat probleme la mijlocului fermentației, indicate de prezența crescută a fungilor neclasificați la etapa finală MT1, împreună cu o cantitate insuficientă de *S. cerevisiae*. Acest lucru a fost confirmat și de evaluarea senzorială, prin care un număr mai mare de degustători au sesizat defecte olfactive în MT1.

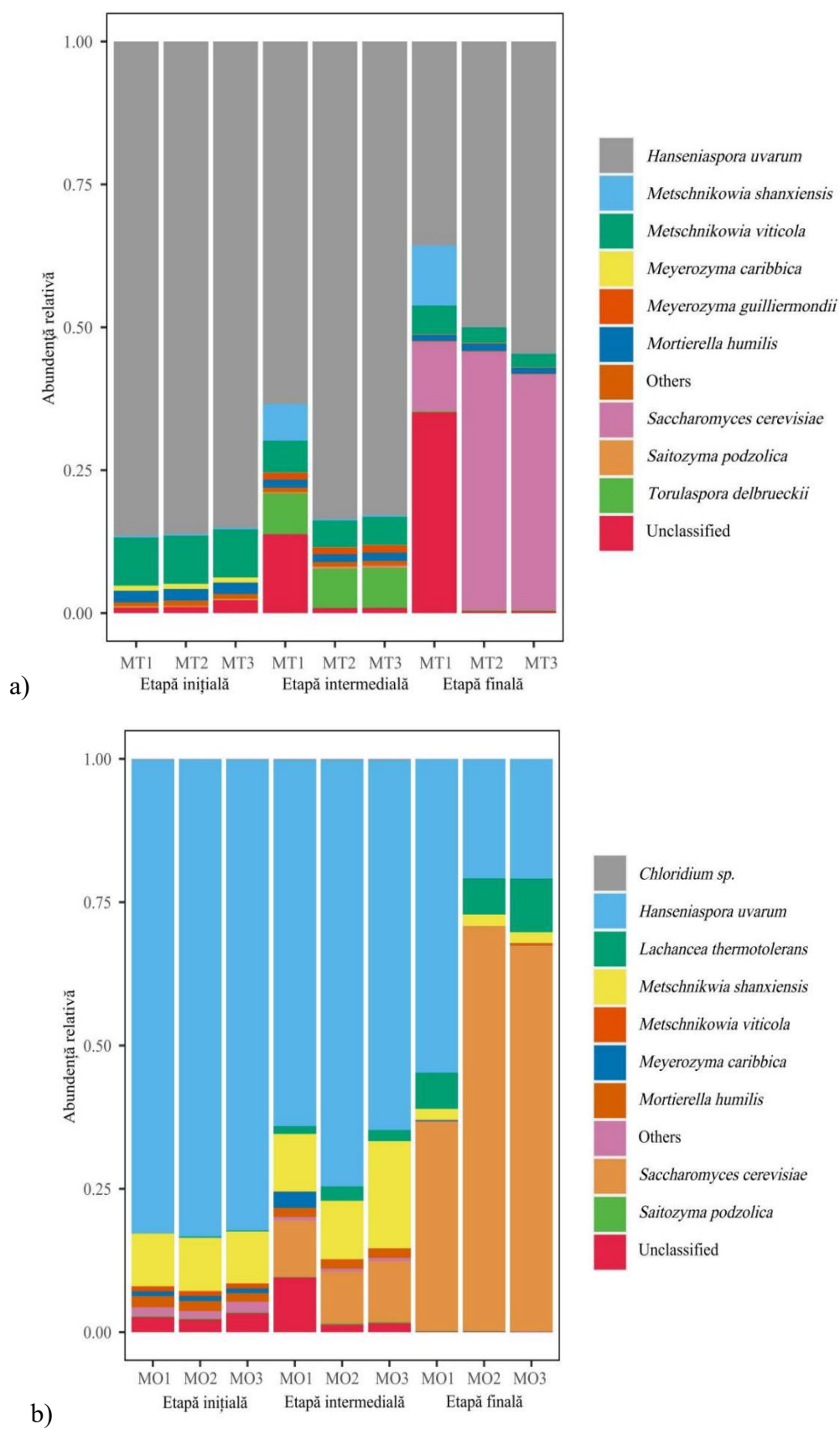


Figura 4.11. Abundența relativă a primilor 10 fungi în pregătirea MLI-T (a) și MLI-O (b).

Similar, în timpul procesului de pregătire a MDI-O, MO1 a întâmpinat probleme similare, cu niveluri mai ridicate ale organismelor neclasificate la mijlocul 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 MDI, este evident că au fost implicați mai mulți levuri 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 contribuitor 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. Specia *Lanchancea* are o toleranță la alcool de până la 10 % vol. și deoarece alcoolul a fost adăugat la începutul acestui experiment, a inhibat activitatea unor drojdii non-*Saccharomyces*. Odată cu fermentația ulterioară, pe măsură ce nivelurile de alcool au crescut, doar *Lanchancea* a continuat să joace un rol. Atât *Lanchancea*, cât și *Metschikowia* sunt considerate responsabile de îmbunătățirea aromei fructate a vinului.

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.

4.3. Concluzii la Capitolul IV

Acest capitol, bazat pe cercetările efectuate la ÎM „Vinăria Purcari” S.R.L, analizează sistematic aplicarea tehnologiei de bioprotecție în vinificație și metodele de optimizare a pregătirii maiei de levuri indigene în condiții de laborator. Scopul acestor tehnologii implică sporirea stabilității și calității proceselor de FA, respectând totodată cerințele certificării ecologice.

Capitolul este structurat în două secțiuni principale: implementarea practică a tehnologiei de bioprotecție pentru vinurile roșii și comparația dintre metodele tradiționale și optimizate de pregătire a maiei de levuri indigene.

În cadrul acestui studiu, s-au utilizat struguri de Rară Neagră proveniți dintr-o vie ecologică din Olănești, Republica Moldova. Două specii de levuri non-*Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii* și *Metschnikowia pulcherrima*, au fost utilizate ca agenți de bioprotecție. Aceste levuri nu doar că reduc competiția dintre microorganismele contaminante, dar contribuie și la îmbunătățirea aromelor vinului. Rezultatele studiului au evidențiat că viteza de fermentație a grupului de bioprotecție (BP) este mai lentă, datorită efectului inhibitor al metaboliților produși de *M. pulcherrima*, însă procesul general de fermentație este controlabil și eficient. Concentrația de aciditate volatilă în grupul BP (0,45 g/dm³) este semnificativ mai mare decât în grupul de control (0,21 g/dm³), dar sub limita defectului senzorial (1,2 g/dm³). Grupul BP a prezentat valori semnificativ mai ridicate pentru compușii fenolici totali, antociani și IPT, acești compuși fiind esențiali pentru capacitatea antioxidantă, potențialul de maturare și stabilitatea culorii vinului. În evaluările senzoriale, vinurile din grupul BP au avut un scor semnificativ mai mare la intensitatea aromei comparativ cu grupul C1 (3,34 față de 2,15) și un scor semnificativ mai ridicat de aromă fructată (3,76 față de 2,19), demonstrând astfel avantajele tehnologiei de bioprotecție în creșterea calității aromelor și a structurii vinului.

Pentru a explora potențialul levurilor indigene, capitolul compară metodele tradiționale (MLI-T) și optimizate (MLI-O) de pregătire a maielei, folosind struguri Pinot Noir. În metoda optimizată, s-a adăugat 1,5 % vol. alcool în cultura inițială pentru a regla structura comunităților microbiene. În cadrul pregătirii maielei prin metoda tradițională (MLI-T), fermentația a fost mai lentă, cu o scădere semnificativă a densității observată abia din ziua a treia. Acest lucru se datorează complexității mai mari a levurilor indigene, ale căror căi metabolice diverse prelungesc durata procesului de fermentație. În schimb, metoda optimizată (MLI-O) a avut o fermentație mai rapidă, cu o scădere vizibilă a densității deja din ziua a doua, iar procesul a fost mai consistent și mai controlabil. În grupul MLI-T, *S. cerevisiae* a avut o pondere finală mai mică, cu o prezență mai mare a levurilor non-*Saccharomyces*, ceea ce a condus la apariția defectelor senzoriale în unele probe. În grupul MLI-O, alcoolul adăugat a inhibat parțial levurile non-*Saccharomyces* și microorganismele nedorite, permițând *S. cerevisiae* să devină predominantă (peste 80 % din drojdiile de fermentare) în etapele finale ale fermentației. În plus, speciile *Lachancea* au arătat o activitate ridicată, contribuind împreună cu *Metschnikowia* la intensificarea fructuozității vinului.

Metoda optimizată (MLI-O) a prezentat niveluri mai scăzute ale acidității volatile ($0,41 \text{ g/dm}^3$) și acidului malic ($0,55 \text{ g/dm}^3$) comparativ cu grupul de control (C3), ceea ce indică un control mai eficient al fermentației malo-lactice. În evaluările senzoriale, vinurile din grupul MLI-O au avut performanțe apropiate de cele produse cu levuri comerciale, obținând scoruri ridicate pentru attributele „fructe” și „flori”, în timp ce attributele negative, precum „vegetal” sau „astringent”, au fost semnificativ mai scăzute față de metoda tradițională.

Acest capitol demonstrează că tehnologia de bioprotecție și metodele optimizate de pregătire a maielei de levuri indigene sunt metode viabile pentru producerea vinurilor ecologice de înaltă calitate. Tehnologia de bioprotecție îmbunătățește semnificativ intensitatea fructuozității, structura vinului și stabilitatea chimică, oferind o alternativă eficientă la utilizarea sulfiților. Metodele optimizate de pregătire a maielei indigene asigură o fermentație mai uniformă și rezultate comparabile cu levurile comerciale, oferind un fundament solid pentru explorarea potențialului levurilor autohtone.

Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe optimizarea selecției și combinării levurilor non-*Saccharomyces* și pe adaptarea acestor tehnologii la diferite soiuri de struguri și condiții climatice pentru a sprijini dezvoltarea durabilă a vinurilor ecologice.

CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI PRACTICE

În această lucrare s-a studiat diversitatea microbiană a diferitelor soiuri de struguri din trei zone IGP din Republica Moldova folosind diverse metode de cercetare, se concluzionează:

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 $8,0E+06$. Numărul total de levuri din must variază de la $<8,9E+02$ până la $4,25E+06$ UFC/cm³, iar numărul de levuri cultivabile variază de la $8,9E+02$ până la $9,0E+05$ UFC/ cm³. S-a determinat că, cu mici excepții, cantitatea populațiilor bacteriene este redusă și prezența unui număr mai mic de levuri din must decât cel de pe suprafața strugurilor (subsecțiunea 3.1.1.).

2. S-a efectuat o analiză statistică a factorilor climatici și a utilizării produselor fitosanitare, ajungându-se la următorul aspect practic: produsele fitosanitare utilizate pentru combaterea fâinării reduc numărul de levuri cultivabile, dar contribuie la creșterea numărului total de levuri. Produsele fitosanitare pentru fâinare determină trecerea drojdiilor de pe suprafața strugurilor în starea VBNC (viabile, dar necultivabile), ceea ce duce la scăderea numărului de drojdii din mustul de struguri. O sumă a temperaturilor mai ridicate pe durata perioadei vegetative reduce numărul total de levuri din mustul de struguri, iar temperaturile reci pe durata nopților înaintea recoltării strugurilor inhibă atât creșterea levurilor cultivabile, cât și numărul total de drojdii de pe suprafața acestora (subsecțiunea 3.1.3.).

3. Tehnologia NGS a fost folosită pentru a studia comunitățile microbiene în stadiile timpurii ale fermentației spontane a trei soiuri de struguri din trei regiuni IGP. Zona IGP Valul lui Traian a arătat cea mai mare diversitate microbiană. Între soiurile de struguri și regiunile IGP din R. Moldova nu există diferențe semnificative în componența microbiană (subsecțiunea 3.2.1.).

4. Componența fungilor și bacteriilor strugurilor din Republica Moldova la nivel de încrengătura, denotă că fungii din cele cinci încrengături cea mai frecventă fiind cei din *Ascomycota*. Bacteriile au fost clasificate în 16 încrengături, dintre care cea mai răspândită fiind *Proteobacteria*. *Hanseniaspora* s-a dovedit a fi cel mai răspândit gen fungic, urmat de *Saccharomyces* și *Metschnikowia*. S-a stabilit că genurile de bacterii *Gluconobacteria*, *Tatumella* și *Chryseobacterium* sunt cele mai răspândite, iar genurile de bacterii lactice sunt extrem de reduse ca predominanță (subsecțiunea 3.2.2.).

5. Genul de fungi *Meyerozyma* a fost găsit să se coreleze negativ cu majoritatea bacteriilor și fungilor după interacțiunile microbiene (subsecțiunea 3.2.2.).

6. Producerea vinurilor cu bioprotecție s-a efectuat folosind două levuri non-*Saccharomyces*: *M.pulcherrima* și *T.delbrueckii*, întâlnite frecvent pe strugurii din RM. Vinul produs a prezentat o calitate bună, cu un buchet de arome mai pronunțat de fructe și un conținut mai ridicat de compuși fenolici și antociani. (secțiunea 4.1.)

7. Procesele de fermentație a vinului prin MLI au fost îmbunătățite prin fortificarea cu vin, până la conținutul de alcool 1,5 % vol. Acest aspect tehnologic a permis obținerea unor vinuri cu conținuturi ale acidității volatile și acidului malic mai scăzute în comparație cu cele obținute la utilizarea levurilor comerciale, având totodată un buchet de arome fructate mai pronunțat. Pe baza studiilor microbiene, adăugarea timpurie de vin în MLI inhibă activitatea unor levuri non-*Saccharomyces*, permițând levurii *Saccharomyces* să domine procesul de fermentație. În plus, levura *Lachancea thermotolerans*, caracterizată printr-o toleranță ridicată la alcool, a contribuit la fermentația alcoolică și a fost considerată un potențiator al aromelor fructate (secțiunea 4.2.).

Recomandări practice:

✓ Produsele fitosanitare chimice reduc semnificativ numărul de levuri din mustul de struguri. Se recomandă reducerea treptată sau înlocuirea acestor substanțe cu soluții de protecție organică și biologică, cum ar fi utilizarea pesticidelor pe bază de microorganisme (*Meyerozyma*, identificată în subsecțiunea 3.2.2 ca fiind prezentă în comunitățile microbiene autohtone).

✓ Alegerea levurilor non-*Saccharomyces* potrivite pentru tehnologia de bioprotecție. Două levuri non-*Saccharomyces* (*M. pulcherrima* și *T. delbrueckii*) au demonstrat capacitatea de a dezvolta vinuri cu un profil aromatic fructat. Totuși, levurile non-*Saccharomyces* utilizate în bioprotecție sunt variate, iar metaboliții lor pot avea caracteristici diferite. Este esențial ca vinificatorii să selecteze levurile non-*Saccharomyces* adecvate în funcție de soiurile de struguri folosite și de stilul de vin dorit.

✓ Selecția tulpinilor de levuri indigene adecvate. Tulpinile de levuri *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* oferă multiple beneficii. Acest aspect nu doar îmbunătățește complexitatea aromatică a vinului, ci sprijină și practicile de vinificație durabilă. În special în anii calzi, când numărul de levuri din must este redus, adăugarea de levuri indigene în must contribuie la eficiența și calitatea fermentației.

✓ Strategia adăugării de vin pentru prepararea MLI-optimizat. În condiții de stres pentru comunitățile microbiene (noapțile reci înaintea recoltării sau temperaturi ridicate în perioada vegetativă), utilizarea vinului în prepararea MLI s-a dovedit a fi o metodă eficientă și naturală. Pentru rezultate optime, volumul de vin adăugat trebuie ajustat în funcție de situația specifică. În acest studiu, un adaos de 1,5% vin a demonstrat rezultate excelente, dar proporția poate varia în funcție de compoziția mustului și de stilul de vin dorit.

BIBLIOGRAFIE

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., Papaix, 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. Franco-Duarte, R., et.al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. In: *Microorganisms*. 2019, vol. 7, nr. 5, pp.1-32. ISSN 2076-2607.
13. Morgan, H. H., Du Toit, M., & Setati, M. E. The grapevine and wine microbiome: insights from high-throughput amplicon sequencing. In: *Frontiers in Microbiology*. 2017, vol. 8, pp.1-15. ISSN 1664-302X.
14. Kovacs, A., Yacoby, K., Gophna, U. A systematic assessment of automated ribosomal intergenic spacer analysis (ARISA) as a tool for estimating bacterial richness. In: *Research in microbiology*. 2010, vol. 161, nr. 3, pp.192-197. ISSN 2616-9312.
15. Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. In: *International Dairy Journal*. 2002, vol.12, nr.5, pp. 407-411. ISSN 1879-0143.
16. Di Bella, J. M., Bao, Y., Gloor, G. B., Burton, J. P., & Reid, G. (2013). High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research. In: *Journal of microbiological methods*. 2013, vol.95, nr.3, pp.401-414. ISSN 0167-7012.
17. Větrovský, T., Baldrian, P. Analysis of soil fungal communities by amplicon pyrosequencing: current approaches to data analysis and the introduction of the pipeline SEED. In: *Biology and Fertility of Soils*. 2013, vol. 49, pp.1027-1037. ISSN 0178-2762.
18. 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.
19. Langille, M. G., et.al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. In: *Nature biotechnology*. 2013, vol.31, nr.9, pp.814-821. ISSN 1087-0156.
20. **Yao, M.**, Microbial diversity on grape surface and its research status. In: *Journal of Engineering Sciences*. 2023, vol.2, pp.158-172. ISSN 2587-3474.
21. Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. In: *International journal of food microbiology*. 2012, vol.154, nr.3, pp.152-161. ISSN 1879-3460.
22. Ranade, Y., Sawant, I., Saha, S., Chandrashekar, M., Pathak, P. Epiphytic microbial diversity of *Vitis vinifera* fructosphere: Present status and potential applications. In: *Current Microbiology*. 2021, vol.78, pp. 1086-1098. ISSN 1432-0991.
23. Mathidza, B. *Bacterial diversity of Cabernet Sauvignon must from different locations and the dynamics during wine fermentation*. tz. de doct. în inginerie. Stellenbosch. 2022. 89 p.
24. Kačániová, M. et. al. Microbiota of different wine grape berries. In: *Potravinarstvo*. 2019, vol.13, nr.1, pp.9. ISSN 1337-0960.
25. Corinto, G. L., Pioletti, A. M. (2019). Viticulture and landscape in the Italian northwestern alpine region. In: *Geography Notebooks*, 2019, vol.2, nr.2, pp. 53-67. ISSN 2611-7207.
26. Kántor, A., Kačániová, M. Diversity of bacteria and yeasts on the surface of table grapes. In: *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. 2015, vol.48, nr.1, pp.149-149. ISSN 1841-9364.

27. Testempasis, S. I., Papazlatani, C. V., Theocharis, S., Karas, P. A., Koundouras, S., Karpouzas, D. G., Karaoglanidis, G. S. Vineyard practices reduce the incidence of *Aspergillus* spp. and alter the composition of carposphere microbiome in grapes (*Vitis vinifera* L.). In: *Frontiers in Microbiology*. 2023, vol. 14, pp.1-15. ISSN 1664-302X.
28. Palliotti, A., Tombesi, S., Silvestroni, O., Lanari, V., Gatti, M., Poni, S. Changes in vineyard establishment and canopy management urged by earlier climate-related grape ripening: A review. In: *Scientia Horticulturae*. 2014, vol.178, pp.43-54. ISSN 0304-4238.
29. Freire, L., Passamani, F. R. F., Thomas, A. B., Nassur, R. D. C. M. R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., ... & Batista, L. R. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. In: *International journal of food microbiology*. 2017, vol.241, pp.181-190. ISSN 0168-1605.
30. Ding, S., Li, N., Cao, M., Huang, Q., Chen, G., Xie, S. , Li, W. Diversity of epiphytic fungi on the surface of Kyoho grape berries during ripening process in summer and winter at Nanning region, Guangxi, China. In: *Fungal biology*. 2019, vol. 123, nr. 4, pp.283-289. ISSN 1878-6146.
31. Behera, A. D., Das, S. Ecological insights and potential application of marine filamentous fungi in environmental restoration. In: *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2023, vol.22, pp.281-318. ISSN 1572-9826.
32. Carmichael, P. C., Siyoum, N., Chidamba, L., Korsten, L. Exploring the microbial communities associated with *Botrytis cinerea* during berry development in table grape with emphasis on potential biocontrol yeasts. In: *European Journal of Plant Pathology*. 2019, vol.154, pp.919-930. ISSN 1573-8469.
33. Kioroglou, D., Kraeva-Deloire, E., Schmidtke, L. M., Mas, A., Portillo, M. C. Geographical origin has a greater impact on grape berry fungal community than grape variety and maturation state. In: *Microorganisms*. 2019, vol.7, nr.12, pp.1-14. ISSN 2076-2607.
34. Drumonde-Neves, J., Fernandes, T., Lima, T., Pais, C., Franco-Duarte, R. Learning from 80 years of studies: A comprehensive catalogue of non-Saccharomyces yeasts associated with viticulture and winemaking. In: *FEMS Yeast Research*. 2021, vol. 21, nr. 3, pp.1-13. ISSN 1567-1356.
35. Lukša, J., Vepškaitė-Monstavičė, I., Apšegaitė, V., Blažytė-Čereškienė, L., Stanevičienė, R., Strazdaite-Žielienė, Ž., Servienė, E. Fungal microbiota of sea buckthorn berries at two ripening stages and volatile profiling of potential biocontrol yeasts. In: *Microorganisms*. 2020, vol. 8 nr. 3, pp.1-18. ISSN 2076-2607.
36. Galli, V., Romboli, Y., Barbato, D., Mari, E., Venturi, M., Guerrini, S., Granchi, L. Indigenous *Aureobasidium pullulans* strains as biocontrol agents of *Botrytis cinerea* on grape berries. In: *Sustainability*. 2021, vol. 13, nr. 16, pp.1-11. ISSN 2162-5689.
37. Cureau, N. *Phylogenetic Diversity of Arkansas Vineyard and Wine Microbiota*. tz. de doct. în inginerie. Fayetteville. 2020. 297 p.
38. Liu, D., Zhang, P., Chen, D., Howell, K. From the vineyard to the winery: how microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. In: *Frontiers in Microbiology*. 2019, vol. 10, pp.1-13. ISSN 1664-302X

39. Tronchoni, J., Setati, M. E., Fracassetti, D., Valdetara, F., Maghradze, D., Foschino, R., Bauer, F. F. Identifying the Main Drivers in Microbial Diversity for Cabernet Sauvignon Cultivars from Europe to South Africa: Evidence for a Cultivar-Specific Microbial Fingerprint. In: *Journal of Fungi*. 2022, vol.8, nr.10, pp.1-25. ISSN 2309-608X
40. Li, R., Yang, S., Lin, M., Guo, S., Han, X., Ren, M., Huang, W. The biogeography of fungal communities across different Chinese wine-producing regions associated with environmental factors and spontaneous fermentation performance. In: *Frontiers in Microbiology*. 2022, vol. 12, pp.1-14. ISSN 1664-302X.
41. Liu, D., Legras, J. L., Zhang, P., Chen, D., Howell, K. Diversity and dynamics of fungi during spontaneous fermentations and association with unique aroma profiles in wine. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2021, vol. 338, pp.1-35. ISSN 1879-3460.
42. Wei, R., Ding, Y., Chen, N., Wang, L., Gao, F., Zhang, L., Wang, H. Diversity and dynamics of microbial communities during spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different regions of China and their relationship with the volatile components in the wine. In: *Food Research International*. 2022, vol.156, pp.1-24. ISSN 1873-7145.
43. Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., Mills, D. A. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. In: *MBio*. 2016, vol.7, nr.3, pp. 1-12. ISSN 2150-7511.
44. Kordowska-Wiater, M., Pytko, M., Stój, A., Kubik-Komar, A., Wyrstek, J., Waśko, A. A metagenetic insight into microbial diversity of spontaneously fermented polish red wines and an analysis of selected physicochemical properties. In: *Applied Sciences*. 2022, vol. 12, nr. 9, pp. 1-14. ISSN 2076-3417.
45. Santos, J. A., et.al. A review of the potential climate change impacts and adaptation options for European viticulture. In: *Applied Sciences*. 2020, vol.10, nr. 9, pp. 1-28. ISSN 2076-3417.
46. Van Leeuwen, C., Seguin, G. The concept of terroir in viticulture. In: *Journal of wine research*. 2006, vol.17, nr.1, pp.1-10. ISSN 1469-9672.
47. Bramley, R. G. V., Ouzman, J., Boss, P. K. Variation in vine vigour, grape yield and vineyard soils and topography as indicators of variation in the chemical composition of grapes, wine and wine sensory attributes. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2011, vol.17, nr. 2, pp.217-229. ISSN 1755-0238.
48. Reynolds, A. G., & Heuvel, J. E. V. Influence of grapevine training systems on vine growth and fruit composition: a review. In: *American Journal of Enology and Viticulture*. 2009, vol.60, nr. 3, pp. 251-268. ISSN 1943-7749.
49. Galbán, S., Justel, A., González, S., Quesada, A. Local meteorological conditions, shape and desiccation influence dispersal capabilities for airborne microorganisms. In: *Science of The Total Environment*. 2021, vol.780, pp.1-12. ISSN 1879-1026.
50. Xu, X., Wang, N., Lipson, D., Sinsabaugh, R., Schimel, J., He, L., Tedersoo, L. Microbial macroecology: In search of mechanisms governing microbial biogeographic patterns. In: *Global Ecology and Biogeography*. 2020, vol. 29, nr.11, pp.1870-1886. ISSN 1466-822X.
51. Jara, C., Laurie, V. F., Mas, A., Romero, J. Microbial terroir in Chilean valleys: diversity of non-conventional yeast. In: *Frontiers in microbiology*. 2016, vol.7, pp.1-10. ISSN 1664-302X.

52. Schmidtke, L. M., Antalick, G., Šuklje, K., Blackman, J. W., Boccard, J., Deloire, A. Cultivar, site or harvest date: the gordian knot of wine terroir. In: *Metabolomics*. 2020, vol. 16, pp.1-17. ISSN 1573-3882.
53. Castrillo, D., & Blanco, P. Influence of vintage, geographical location and agricultural management on yeast populations in Galician grape musts (NW Spain). In: *OENO One*. 2022, vol. 56, nr. 4, pp. 65-79. ISSN 2494-1271.
54. Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U. C., Bauer, F. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. In: *PLoS One*. 2012, vol.7, nr.12, pp.1-11. ISSN 1544-9173.
55. **Yao, M.**, Wang, F., Arpentin, G. Studiul microorganismelor strugurilor din podgoriile Republicii Moldova: influența factorilor uman și natural. *Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”*. 2023, vol.70, nr.3, pp. 99-106.
56. Montalvo-Falcón, J. V., Sánchez-García, E., Marco-Lajara, B., Martínez-Falcó, J. Sustainability research in the wine industry: a bibliometric approach. In: *Agronomy*. 2023, vol. 13, nr.3, pp.1-29. ISSN 0065-4663.
57. Poni, S., Gatti, M., Palliotti, A., Dai, Z., Duchêne, E., Truong, T. T., Tombesi, S. Grapevine quality: A multiple choice issue. In: *Scientia horticulturae*. 2018, vol. 234, pp.445-462. ISSN 0304-4238.
58. Provost, C., Pedneault, K. The organic vineyard as a balanced ecosystem: Improved organic grape management and impacts on wine quality. In: *Scientia horticulturae*. 2016, vol. 208, pp. 43-56. ISSN 0304-4238.
59. Ross, C. F., Weller, K. M., Blue, R. B., & Reganold, J. P. Difference testing of Merlot produced from biodynamically and organically grown wine grapes. In: *Journal of Wine Research*. 2009, vol. 20, nr.2, pp. 85-94. ISSN 1179-1403.
60. Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F., Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. In: *Microbiological research*. 2015, vol.181, pp. 75-83. ISSN 1618-0623.
61. Döring, J., Collins, C., Frisch, M., Kauer, R. (2019). Organic and biodynamic viticulture affect biodiversity and properties of vine and wine: a systematic quantitative review. In: *American Journal of Enology and Viticulture*. 2019, vol.70, nr.3, pp. 221-242. ISSN 1943-7749.
62. **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.
63. Fazio, N. A., Russo, N., Foti, P., Pino, A., Caggia, C., Randazzo, C. L. Inside Current Winemaking Challenges: Exploiting the Potential of Conventional and Unconventional Yeasts. In: *Microorganisms*. 2023, vol.11, nr.5, 1-26. ISSN 2076-2607.
64. REYNOLDS, A.G. *Managing Wine Quality: Viticulture and Wine Quality*. Oxford: Woodhead Publishing, 2010. 606p. ISBN 978-1845-69-484-5
65. JAMES B.C., LEONARD K.N., DUANE R., DUANE H.D.R. *Harvard Case Histories in Experimental Science*, Volume II. Cambridge, MA and London: Harvard University Press, 1957. 313p. ISBN 978-0674-289-58-1.

66. Theron, J., Cloete, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. In: *Critical reviews in microbiology*. 2000, vol.26, nr. 1, pp. 37-57. ISSN 1040-841X.
67. Andorrà, I., Landi, S., Mas, A., Guillamón, J. M., Esteve-Zarzoso, B. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. In: *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, nr. 7, pp.849-856. ISSN 2626-7578.
68. Hung, N., et.al. Filamentous fungal keratitis in Taiwan: based on molecular diagnosis. In: *Translational Vision Science & Technology*. 2020, vol. 9, nr. 8, pp. 32-32. ISSN 2164-2591.
69. Safdar, N., Abbo, L. M., Knobloch, M. J., Seo, S. K. Research methods in healthcare epidemiology: survey and qualitative research. In: *Infection control & hospital epidemiology*. 2016, vol. 37, nr.11, pp.1272-1277. ISSN 0899-823X.
70. Wijayawardene, N. N., et.al. Current insight into culture-dependent and culture-independent methods in discovering Ascomycetous Taxa. In: *Journal of Fungi*. 2021, vol. 7, nr.9, pp.1-21. ISSN 2309-608X.
71. Ghiasian, M., AKHAVAN, S. A., Amoozegar, M. A., Saadatmand, S., Shavandi, M. Bacterial diversity determination using culture-dependent and culture-independent methods. In: *Global Journal of Environmental Science and Management*. 2017, vol. 3, nr.2, pp.153-164. ISSN 2383-3866.
72. Piao, H., et. al. Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. In: *Frontiers in microbiology*. 2015, vol. 6, pp.1-16. ISSN 1664-302X.
73. Andorrà Solsona, I. *Adaptation and development of culture-independent techniques for the indentification and enumeration of microorganisms in wine fermentations*. tz. de doct. în inginerie. Tarragona. 2010. 264 p.
74. Morgan, H. H. *Investigating the effect of leaf removal on the grape-associated microbiome through culture-dependent and-independent approaches* tz. de doct. în inginerie. Stellenbosch. 2016. 74 p.
75. Laforgue, R., Guérin, L., Pernelle, J. J., Monnet, C., Dupont, J., Bouix, M. (2009). Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. In: *Journal of Applied Microbiology*. 2009, vol.107, nr. 4, pp.1208-1218. ISSN 1365-2672.
76. Karatas, D. D., Kunter, B., Coppola, G., Velasco, R. Analysis of polymorphism based on SSCP markers in gamma-irradiated (Co60) grape (*Vitis vinifera*) varieties. In: *Genetics and Molecular Research*. 2010, vol.9, nr.4, pp. 2357-2363. ISSN 1676-5680.
77. Ghosh, S., Bagheri, B., Morgan, H. H., Divol, B., Setati, M. E. Assessment of wine microbial diversity using ARISA and cultivation-based methods. In: *Annals of microbiology*. 2015, vol.65, nr.4, pp.1833-1840. ISSN 2637-5346.
78. Garza, D. R., Dutilh, B. E. From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. In: *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015, vol.72, pp. 4287-4308. ISSN 1420-9071.
79. Lisanti, M. T., Blaiotta, G., Nioi, C., Moio, L. Alternative methods to SO₂ for microbiological stabilization of wine. In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, vol.18, nr.2, pp.455-479. ISSN 1541-4337.

80. Rousseaux, S., Diguta, C. F., Radoï-Matei, F., Alexandre, H., Guilloux-Bénatier, M. (2014). Non-Botrytis grape-rotting fungi responsible for earthy and moldy off-flavors and mycotoxins. In: *Food microbiology*. 2014, vol. 38, pp. 104-121. ISSN 2626-7578.
81. Quince, C., Walker, A. W., Simpson, J. T., Loman, N. J. Segata, N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. In: *Nature biotechnology*. 2017, vol.35, nr.9, pp. 833-844. ISSN 1087-0156.
82. Frey, J. C., Angert, E. R., Pell, A. N. Assessment of biases associated with profiling simple, model communities using terminal-restriction fragment length polymorphism-based analyses. In: *Journal of Microbiological Methods*. 2006, vol.67, nr.1, pp.9-19. ISSN 0167-7012.
83. Sobiah, R. et.al. Implications of targeted next generation sequencing in forensic science. In: *Journal of Forensic Research*. 2018, vol. 9, nr.02, pp.1-8. ISSN 1556-4029.
84. Buermans, H. P. J., Den Dunnen, J. T. Next generation sequencing technology: advances and applications. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2014, vol.1842, nr.10, pp.1932-1941. ISSN 0925-4439.
85. Kamilari, E., Mina, M., Karallis, C., Tsaltas, D. Metataxonomic analysis of grape microbiota during wine fermentation reveals the distinction of Cyprus regional terroirs. In: *Frontiers in Microbiology*. 2021, vol.12, pp.1-20. ISSN 1664-302X.
86. Bokulich, N. A., Joseph, C. L., Allen, G., Benson, A. K., & Mills, D. A. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. In: *PloS one*. 2012, vol.7, nr.5, pp.1-10. ISSN 1544-9173.
87. Cook, G. M., Rothenberger, J. P., Sikaroodi, M., Gillevet, P. M., Peters, E. C., Jonas, R. B. A comparison of culture-dependent and culture-independent techniques used to characterize bacterial communities on healthy and white plague-diseased corals of the *Montastraea annularis* species complex. In: *Coral Reefs*. 2013, vol.32, pp.375-388. ISSN 1432-0975.
88. Rivas, G. A., Semorile, L., Delfederico, L. Microbial diversity of the soil, rhizosphere and wine from an emerging wine-producing region of Argentina. In: *LWT Food science & technology*. 2022, vol. 153, pp.1-9. ISSN 1096-1127.
89. García-Izquierdo, I., Colino-Rabanal, V. J., Tamame, M., Rodríguez-López, F. Microbiota Ecosystem Services in Vineyards and Wine: A Review. In: *Agronomy*. 2024, vol.14, nr.1, pp.11-23. ISSN 0065-4663.
90. Freeland, J. R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. In: *Genome*. 2017, vol.60, nr.4, pp. 358-374. ISSN 0831-2796.
91. Aldrete-Tapia, J. A., Escalante-Minakata, P., Martínez-Peniche, R. A., Tamplin, M. L., Hernández-Iturriaga, M. Yeast and bacterial diversity, dynamics and fermentative kinetics during small-scale tequila spontaneous fermentation. In: *Food microbiology*. 2020, vol.86, pp.1-44. ISSN 2626-7578.
92. Leveau, J. H. J., Tech, J. J. *Grapevine microbiomics: bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons*. In: *Proceeding of the International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities*, October, 2010, Leesburg, USA. ISBN 978-90-66053-57-1.

93. Campisano, A., Antonielli, L., Pancher, M., Yousaf, S., Pindo, M., Pertot, I. Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management. In: *PloS one*. 2014, vol.9, nr.11, pp.1-10. ISSN 1544-9173.
94. Perazzolli, et.al. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and biological pesticides. In: *Applied and environmental microbiology*. 2014, vol.80, nr.12, pp.3585-3596. ISSN 0099-2240.
95. Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. In: *Soil Biology and Biochemistry*. 2015, vol.91, pp.232-247. ISSN 0038-0717.
96. Fadeev, E., et. al. Comparison of two 16S rRNA primers (V3–V4 and V4–V5) for studies of arctic microbial communities. In: *Frontiers in microbiology*. 2021, vol.12, pp.1-11. ISSN 1664-302X.
97. Campanaro, S., et. al. The anaerobic digestion microbiome: a collection of 1600 metagenome-assembled genomes shows high species diversity related to methane production. In: *BioRxiv*. 2019, nr. 680553, pp.1-46. ISSN 2692-8205
98. Bokulich, N. A., et. al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. In: *Nature methods*. 2013, vol.10, nr.1, pp.57-59. ISSN 1548-7105.
99. Lumini, E., Orgiazzi, A., Borriello, R., Bonfante, P., Bianciotto, V. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. In: *Environmental microbiology*. 2010, vol.12, nr.8, pp.2165-2179. ISSN 2373-6747.
100. Schreiner, R. P., Mihara, K. L. The diversity of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine roots (*Vitis vinifera* L.) in Oregon vineyards is seasonally stable and influenced by soil and vine age. In: *Mycologia*. 2009, vol.101, nr.5, pp.599-611. ISSN 2940-8342.
101. Schreiner, R. P. Depth structures the community of arbuscular mycorrhizal fungi amplified from grapevine (*Vitis vinifera* L.) roots. In: *Mycorrhiza*. 2020, vol.30, nr.1, pp.149-160. ISSN 2940-8342.
102. De Filippis, F., La Stora, A., Blaiotta, G. Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by 18S rRNA gene sequencing. In: *Food microbiology*. 2017, vol.63, pp.117-122. ISSN 2626-7578.
103. Martin, M. T., Cobos, R. Identification of fungi associated with grapevine decline in Castilla y León (Spain). In: *Phytopathologia Mediterranea*. 2007, vol.46, nr.1, pp.18-25. ISSN 1593-2095.
104. Dissanayake, A. J., et. al. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). In: *Fungal Diversity*. 2018, vol. 90, pp.85-107. ISSN 1878-9172.
105. Purahong, W., Wubet, T., Krüger, D., Buscot, F. Application of next-generation sequencing technologies to conservation of wood-inhabiting fungi. In: *Conservation biology*. 2019, vol.33, nr.3, pp.716-724. ISSN 2415-6965.

- 106.Oliveira, M., Arenas, M., Lage, O., Cunha, M., Amorim, M. I. Epiphytic fungal community in *Vitis vinifera* of the Portuguese wine regions. In: *Letters in applied microbiology*. 2018, vol. 66, nr.1, pp.93-102. ISSN 1472-765X.
- 107.Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C.,C. Gomes, A. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. In: *PLoS One*. 2014, vol.9, nr.1, pp.1-12. ISSN 1544-9173.
- 108.Englezos, V., Jolly, N. P., Di Gianvito, P., Rantsiou, K., Cocolin, L. Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. In: *Trends in Food Science & Technology*. 2022, vol.127, pp.99-113. ISSN 0924-2244.
- 109.PATRIZA R., MAURIZIO C., GRAMHAM H.F. *Yeasts in the Production of Wine: Yeast Ecology of Wine Production*. 1st ed. Dordrecht: Springer, 2019. 532p. ISBN: 978-1493-997-80-0.
- 110.Pretorius, I. S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. In: *FEMS yeast research*. 2020, vol.20, nr.1, pp.1-22. ISSN 1567-1356.
- 111.Vejarano, R. Non-Saccharomyces in winemaking: Source of mannoproteins, nitrogen, enzymes, and antimicrobial compounds. In: *Fermentation*. 2020, vol.6, nr.3, pp.1-18. ISSN 2311-5637.
- 112.Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., Varela, C. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. In: *Applied and environmental microbiology*. 2014, vol.80, nr.5, pp.1670-1678. ISSN 0099-2240.
- 113.Kim, D. H., Hong, Y. A., Park, H. D. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. In: *Biotechnology Letters*. 2008, vol.30, pp.1633-1638. ISSN 0141-5492.
- 114.Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., Romano, P. New insights on the use of wine yeasts. In: *Current Opinion in Food Science*. 2017, vol.13, pp.44-49. ISSN 2214-8000.
- 115.Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. In: *FEMS yeast research*. 2014, vol.14, nr.2, pp.215-237. ISSN 1567-1356.
- 116.Beckner Whitener, M. E., Stanstrup, J., Panzeri, V., Carlin, S., Divol, B., Du Toit, M., Vrhovsek, U. Untangling the wine metabolome by combining untargeted SPME–GCxGC–TOF–MS and sensory analysis to profile Sauvignon blanc co-fermented with seven different yeasts. In: *Metabolomics*. 2016, vol.12, pp.1-25. ISSN 1573-3882.
- 117.Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Food Microbiology*. 2011,vol. 28, nr.5, pp.873-882. ISSN 2626-7578.
- 118.Whitener, M. E. B., et.al. Early fermentation volatile metabolite profile of non-Saccharomyces yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT-Food Science and Technology*. 2015,vol. 64, nr.1, pp.412-422. ISSN 1096-1127.
- 119.Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., Varela, C. Evaluation of non-Saccharomyces yeasts for the reduction of alcohol content in wine. In: *Applied and environmental microbiology*. 2014, vol.80, nr.5, pp.1670-1678. ISSN 0099-2240.

- 120.Vilela, A. Use of nonconventional yeasts for modulating wine acidity. In: *Fermentation*. 2019, vol.5, nr.1, pp. 1-15. ISSN 2311-5637.
- 121.Ivit, N. N., Longo, R., Kemp, B. The effect of non-Saccharomyces and Saccharomyces non-cerevisiae yeasts on ethanol and glycerol levels in wine. In: *Fermentation*. 2020, vol.6, nr.3, pp.1-22. ISSN 2311-5637.
- 122.Xi, X., Xin, A., You, Y., Huang, W., Zhan, J. Increased varietal aroma diversity of Marselan wine by mixed fermentation with indigenous non-saccharomyces yeasts. In: *Fermentation*. 2021, vol.7, nr.3, pp.1-18. ISSN 2311-5637.
- 123.Rubio-Bretón, P., Gonzalo-Diago, A., Iribarren, M., Garde-Cerdán, T., Pérez-Álvarez, E. P. Bioprotection as a tool to free additives winemaking: Effect on sensorial, anthocyanic and aromatic profile of young red wines. In: *LWT-Food Science and Technology*. 2018, vol.98, pp.458-464. ISSN 1096-1127.
- 124.Silva, F. V., Van Wyk, S. Emerging non-thermal technologies as alternative to SO₂ for the production of wine. In: *Foods*. 2021, vol.10, nr.9, pp.1-18. ISSN 2304-8158.
- 125.Stockley, C. S. Wine and health: Sulfur dioxide and the wine consumer. In: *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*. 2005, vol.501, pp.73-76. ISSN 1446-8212.
- 126.Preetha, S. S., Narayanan, R. Factors influencing the development of microbes in food. In: *Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities*. 2020, vol.7, nr.3, pp. 57-77. ISSN 2582-0397.
- 127.Ghoul, M., Mitri, S. The ecology and evolution of microbial competition. In: *Trends in microbiology*. 2016, vol.24, nr.10, pp.833-845. ISSN 0966-842X.
- 128.Morata, A., Escott, C., Bañuelos, M. A., Loira, I., Del Fresno, J. M., González, C., Suárez-Lepe, J. A. Contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine freshness. A review. In: *Biomolecules*. 2019, vol.10, nr.1, pp.1-25. ISSN 2218-273X.
- 129.Simonin, S., et. al. Bio-protection as an alternative to sulphites: impact on chemical and microbial characteristics of red wines. In: *Frontiers in microbiology*. 2020, vol.11, pp.1-14. ISSN 1664-302X.
- 130.Börlin, M., et. al. The “pied de cuve” as an alternative way to manage indigenous fermentation: Impact on the fermentative process and Saccharomyces cerevisiae diversity. In: *OENO one*. 2020, vol.54, nr.3, pp.335-342. ISSN 2494-1271.
- 131.Álvarez-Barragán, J., et. al. Influence of spontaneous, “pied de cuve” and commercial dry Yeast fermentation strategies on wine molecular composition and sensory properties. In: *Food Research International*. 2023, vol.174, 1-14. ISSN 1873-7145.
- 132.Giorello, F., et. al. Genomic and transcriptomic basis of Hanseniaspora vineae's impact on flavor diversity and wine quality. In: *Applied and Environmental Microbiology*. 2019, vol.85, nr.1, pp.1-20. ISSN 0099-2240.
- 133.Martin, V., Boido, E., Giorello, F., Mas, A., Dellacassa, E., Carrau, F. Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by Hanseniaspora vineae strains. In: *Yeast*. 2016, vol.33, nr.7, pp.323-328. ISSN 1097-0061.
- 134.Morata, A., et. al. Lachancea thermotolerans as a tool to improve pH in red wines from warm regions. In: *European Food Research and Technology*. 2019, vol.245, pp.885-894. ISSN 1438-2385.

- 135.Rodríguez, M. E., Lopes, C., Valles, S., Giraudo, M. R., Caballero, A. Selection and preliminary characterization of β -glycosidases producer Patagonian wild yeasts. In: *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, vol.41,nr.6, pp.812-820. ISSN 0141-0229.
- 136.Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M. R.. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc. In: *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 2009, vol.15, nr.1, pp.1-8. ISSN 1755-0238.
- 137.Banilas, G., Sgouros, G., Nisiotou, A. Development of microsatellite markers for *Lachancea thermotolerans* typing and population structure of wine-associated isolates. In: *Microbiological Research*. 2016, vol.193, pp.1-10. ISSN 1618-0623.
- 138.Loira, I., et. al. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. In: *LWT-Food Science and Technology*. 2014, vol.59, nr.2, pp.915-922. ISSN 1096-1127.
- 139.ANTONIO M. *Red Wine Technology: The instrumental analysis of aroma-active compounds for explaining the flavor of red wines*. Cambridge, MA: Elsevier Academic Press, 2019. 318p. ISBN: 978-0128-143-99-5
- 140.Chen, Y., Jiang, J., Song, Y., Zang, X., Wang, G., Pei, Y., Liu, Y. Yeast diversity during spontaneous fermentations and oenological characterisation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* for potential as wine starter cultures. In: *Microorganisms*. 2022, vol.10, nr.7, pp.1-22. ISSN 2076-2607.
- 141.Renouf, V., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, vol. 75, pp.149-164. ISSN 0175-7598.
- 142.Tonietto, J., Carbonneau, A. A multicriteria climatic classification system for grape-growing regions worldwide. In: *Agricultural and forest meteorology*. 2004, vol.124, nr.1, pp. 81-97. ISSN 0168-1923.
- 143.Method OIV: nr. MA-AS315-27, 2016. In: *International organization of vine and wine*, 2016, nr.553, pp. 1-11.
- 144.Method OIV: nr. MA-AS313-19, 2011. In: *International organization of vine and wine*, 2011, nr.407, pp. 1-15.
- 145.Method OIV: nr. MA-AS315-11, 2007. In: *International organization of vine and wine*, 2007, nr.12, pp. 1-13.
- 146.Likar, M., Stres, B., Rusjan, D., Potisek, M., Regvar, M. Ecological and conventional viticulture gives rise to distinct fungal and bacterial microbial communities in vineyard soils. In: *Applied Soil Ecology*. 2017, vol.113, pp. 86-95. ISSN 0929-1393.
- 147.Viviani-Nauer, A., Hoffmann-Boller, P., Gafner, J. Characterization and identification of yeasts. In: *Agrarforschung*. 1996. ISSN 1663-7909.
- 148.Berbegal, C., et. al. A metagenomic-based approach for the characterization of bacterial diversity associated with spontaneous malolactic fermentations in wine. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, vol.20, nr.16, pp.1-22. ISSN 1422-0067.
- 149.Yang, X. C., Hu, C. F., Zhang, P. L., Li, S., Hu, C. S., Geng, R. X., Zhou, C. H. Coumarin thiazoles as unique structural skeleton of potential antimicrobial agents. In: *Bioorganic Chemistry*. 2022, vol.124, pp.1-9. ISSN 1608-1620.

- 150.GEOFFREY M.G.D.,SIMA S.W. *Advances in Applied Microbiology*, Volume 111. Cambridge, MA: Elsevier Academic Press, 2020. 170p. ISBN: 978-0128-207-05-5.
- 151.Martin, V., Valera, M. J., Medina, K., Boido, E., Carrau, F. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines—A review. In: *Fermentation*. 2018, vol.4, nr.3, pp.1-21. ISSN 2311-5637.
- 152.Bubeck, A. M., et. al. Bacterial microbiota diversity and composition in red and white wines correlate with plant-derived DNA contributions and botrytis infection. In: *Scientific reports*. 2020, vol.10, nr.1, pp.1-13. ISSN 2332-2675.
- 153.Wassermann, B., Korsten, L., Berg, G. Plant health and sound vibration: Analyzing implications of the microbiome in grape wine leaves. In: *Pathogens*. 2021, vol.10, nr.1, pp.63-82. ISSN 2076-0817.
- 154.Yassunaka Hata, N. N., Surek, M., Sartori, D., Vassoler Serrato, R., Aparecida Spinosa, W. Role of acetic acid bacteria in food and beverages. In: *Food technology and biotechnology*. 2023, vol.61, nr.1, pp. 85-103. ISSN 1334-2606.
- 155.Kregiel, D. Health safety of soft drinks: contents, containers, and microorganisms. In: *BioMed research international*. 2015, pp. 1-16. ISSN: 2314-6141
- 156.Bartowsky, E. J. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. In: *Letters in applied microbiology*. 2009, vol. 48, nr.2, pp.149-156. ISSN 1472-765X.
- 157.Mülner, P., et. al. Microbiota associated with sclerotia of soilborne fungal pathogens—a novel source of biocontrol agents producing bioactive volatiles. In: *Phytobiomes Journal*. 2019, vol.3, nr.2, pp.125-136. ISSN 2471-2906.
- 158.CARL A.B., MARY L.T. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Cambridge, MA: Elsevier Academic Press, 2014. 11860p. ISBN: 978-0123847300
- 159.Wang, C., Mas, A., Esteve-Zarzoso, B. Interaction between *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2015, vol.206, pp.67-74. ISSN 1879-3460.
- 160.Pietrafesa, A., Capece, A., Pietrafesa, R., Bely, M., Romano, P. *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* mixed starter cultures: Influence of microbial/physical interactions on wine characteristics. In: *Yeast*. 2020, vol.37, nr.11, pp.609-621. ISSN 1097-0061.
- 161.Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascués, E., Benito, S. Effects on varietal aromas during wine making: A review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. In: *Applied microbiology and biotechnology*. 2019, vol.103, pp. 7425-7450. ISSN 0175-7598.
- 162.Lachance, M. A. Metschnikowia: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. In: *Yeast*. 2016, vol.33, nr.11, pp.563-574. ISSN 1097-0061.
- 163.Sipiczki, M. Metschnikowia pulcherrima and related pulcherrimin-producing yeasts: Fuzzy species boundaries and complex antimicrobial antagonism. In: *Microorganisms*. 2020, vol.8, nr.7, pp.1-19. ISSN 2076-2607.
- 164.Guzmán, B., Lachance, M. A., Herrera, C. M. Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect–yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified?. In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2013, vol. 68, nr. 2, pp. 161-175. ISSN 1095-9513

- 165.Sipiczki, M., Horvath, E., Pfliegler, W. P. Birth-and-death evolution and reticulation of ITS segments of *Metschnikowia andauensis* and *Metschnikowia fructicola* rDNA repeats. In: *Frontiers in Microbiology*. 2018,vol.9, pp.1-16. ISSN 1664-302X.
- 166.Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: A phylo-functional study of wine related yeast species. In: *Frontiers in microbiology*. 2016, vol.7, pp.1-13. ISSN 1664-302X.
- 167.Benito, S. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. In: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018, vol.102, pp. 3081-3094. ISSN 0175-7598.
- 168.Yao, M., Wang, F., Arpentin, G. Bioprotection as a tool to produce natural wine: Impact on physicochemical and sensory analysis. In: *43rd World Congress of Vine and Wine*, Ensenada, Mexico, 2022, vol. 56, pp.1-4. ISSN 2273-1709.
- 169.Puertas, B., Jiménez, M. J., Cantos-Villar, E., Cantoral, J. M. Rodríguez, M. E. Use of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates. In: *Journal of applied microbiology*. 2017, vol.122, nr.3, pp.733-746. ISSN 1365-2672.
- 170.Canonico, L., Comitini, F., Ciani, M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. In: *International Journal of Food Microbiology*. 2017, vol.259, pp.7-13. ISSN 1879-3460.
- 171.Chen, D., Liu, S. Q. Impact of simultaneous and sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on non-volatiles and volatiles of lychee wines. In: *LWT-Food Science and Technology*. 2016, vol. 65, pp.53-61.
- 172.Álvarez-Fernández, M. A., Fernández-Cruz, E., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. Determination of hydroxytyrosol produced by winemaking yeasts during alcoholic fermentation using a validated UHPLC–HRMS method. In: *Food chemistry*. 2018, vol.242, pp.345-351. ISSN 1096-1127.
- 173.Tronchoni, J., Curiel, J. A., Morales, P., Torres-Pérez, R., Gonzalez, R. Early transcriptional response to biotic stress in mixed starter fermentations involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. In: *International journal of food microbiology*. 2017, vol. 241, pp. 60-68. ISSN 1879-3460.
- 174.Ozimek, E., Hanaka, A. *Mortierella* species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. In: *Agriculture*. 2020, vol.11, nr.1, pp.1-18. ISSN 1873-2305.
- 175.Kthiri, Z., et. al. Exploring the potential of *Meyerozyma guilliermondii* on physiological performances and defense response against *Fusarium* crown rot on durum wheat. In: *Pathogens*. 2021, vol.10, nr.1, pp.1-14. ISSN 2076-0817.
- 176.Tallei, T. E., et.al. Predictive microbial community and functional gene expression profiles in pineapple peel fermentation using 16S rRNA gene sequences. In: *Fermentation*. 2022, vol.8, nr.5, pp.1-15. ISSN 2311-5637.
- 177.Morata, A., Loira, I., González, C.,Escott, C. Non-*Saccharomyces* as biotools to control the production of off-flavors in wines. In: *Molecules*. 2021, vol.26, nr.15, pp.1-12. ISSN 2311-5637.

- 178.Sadoudi, M., Rousseaux, S., David, V., Alexandre, H., Tourdot-Maréchal, R. Metschnikowia pulcherrima influences the expression of genes involved in PDH bypass and glyceropyruvic fermentation in Saccharomyces cerevisiae. In: *Frontiers in microbiology*. 2017, vol.8, pp.1-11. ISSN 1664-302X.
- 179.Sizzano, F., et. al. Bioprospecting of a Metschnikowia pulcherrima Indigenous Strain for Chasselas Winemaking in 2022 Vintage. In: *Foods*. 2023, vol.12, nr.24, pp.1-17. ISSN 2304-8158.
- 180.Loira, I., Morata, A., Comuzzo, P., Callejo, M. J., González, C., Calderón, F., Suárez-Lepe, J. A. Use of Schizosaccharomyces pombe and Torulaspora delbrueckii strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality. In: *Food Research International*. 2015, vol. 76, pp.325-333. ISSN 1873-7145.
- 181.Renault, P., Coulon, J., de Revel, G., Barbe, J. C., Bely, M. Increase of fruity aroma during mixed T. delbrueckii/S. cerevisiae wine fermentation is linked to specific esters enhancement. In: *International Journal of Food Microbiology*, 2015, vol.207, pp.40-48. ISSN 1879-3460.
- 182.Pineau, B., Barbe, J. C., Van Leeuwen, C., Dubourdieu, D. Which impact for β -damascenone on red wines aroma?. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007, vol.55, nr.10, pp.4103-4108. ISSN 1520-5118.
- 183.Lytra, G., Tempere, S., Zhang, S., Marchand, S., De Revel, G., Barbe, J. C. Olfactory impact of dimethyl sulfide on red wine fruity esters aroma expression in model solution. In: *Oeno One*. 2014, vol. 48, nr.1, pp.75-85. ISSN 2494-1271.
- 184.Moschetti, G., et. al. Use of fortified pied de cuve as an innovative method to start spontaneous alcoholic fermentation for red winemaking. In: *Australian journal of grape and wine research*. 2016, vol. 22, nr.1, pp.36-45.ISSN 1755-0238.
- 185.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
- 186.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.

ANEXE

Anexa 1. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro*

Abrevierea dinaintea "-" reprezintă denumirea soiului de struguri, astfel: FN - Fetească Neagră, FA - Fetească Albă, SA - Sauvignon, ME-Merlot, CF - Cabernet Franc, PN - Pinot Noir, RN - Rară Neagră, VI - Viorica, CN – Couderc Noir.

Abrevierea de după "-" reprezintă regiunea, astfel: C reprezintă IGP Codru, VLT reprezintă IGP Valul lui Traian, SV reprezintă IGP Ștefan Vodă.

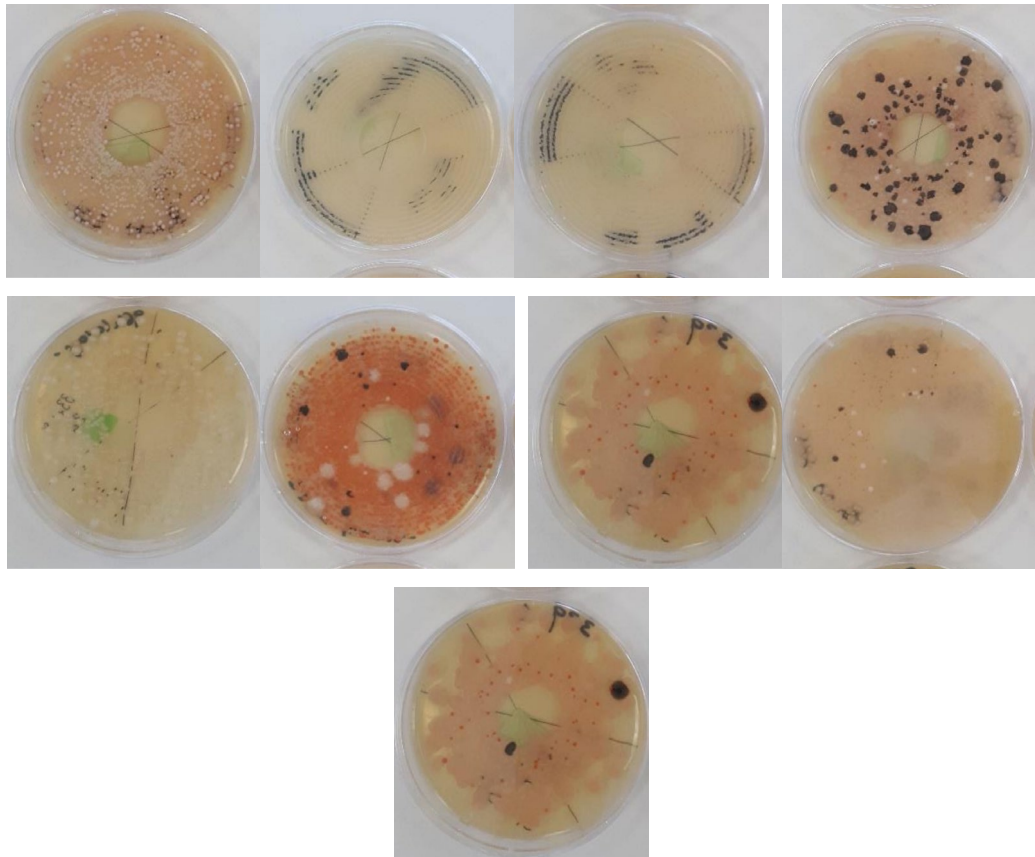


Figura 1. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate de pe suprafața strugurilor FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV (recolta 2018).

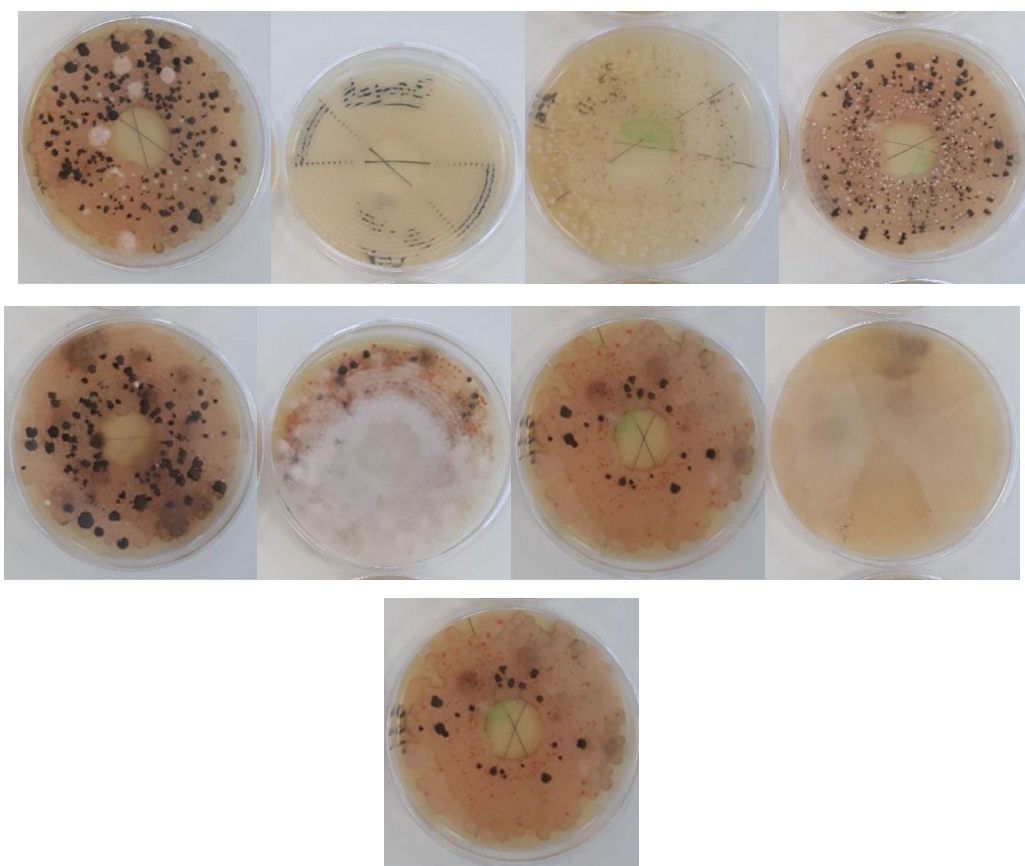


Figura 2. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate din must:
Mostrele – FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV
(recolta 2018).

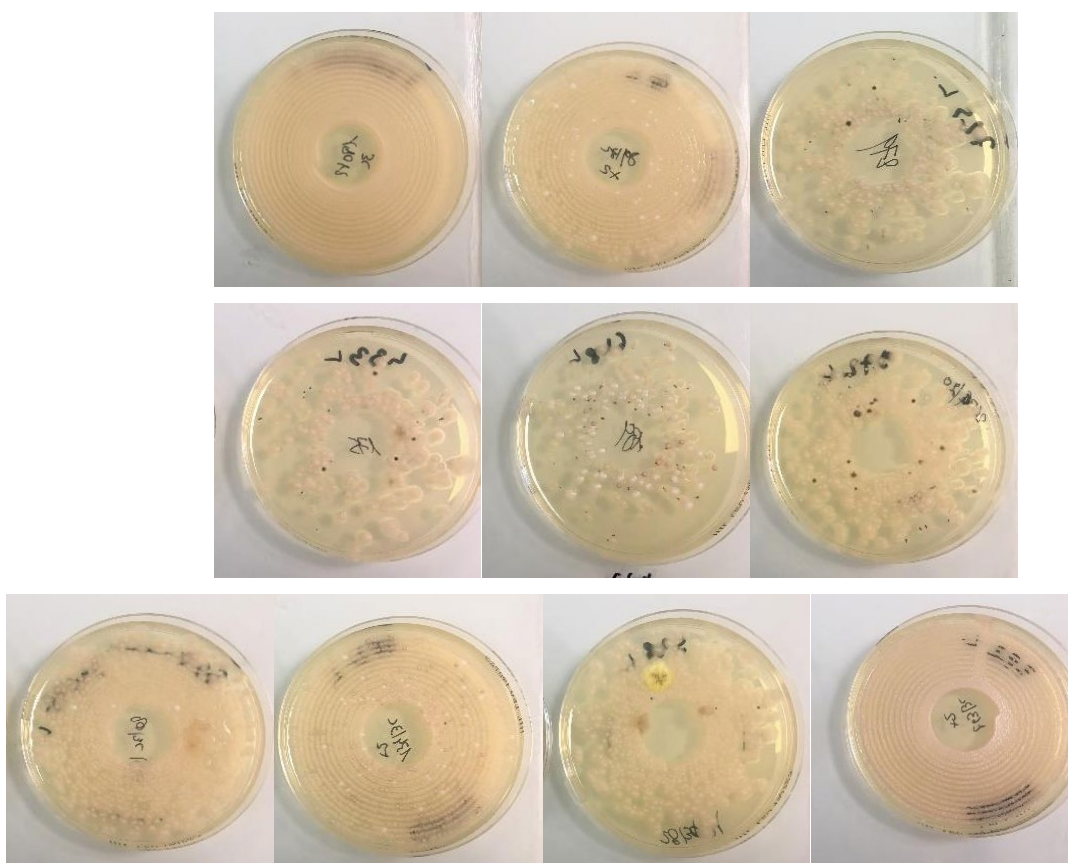


Figura 3. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate de pe suprafața strugurilor:

Mostrele – FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV (recolta 2019).

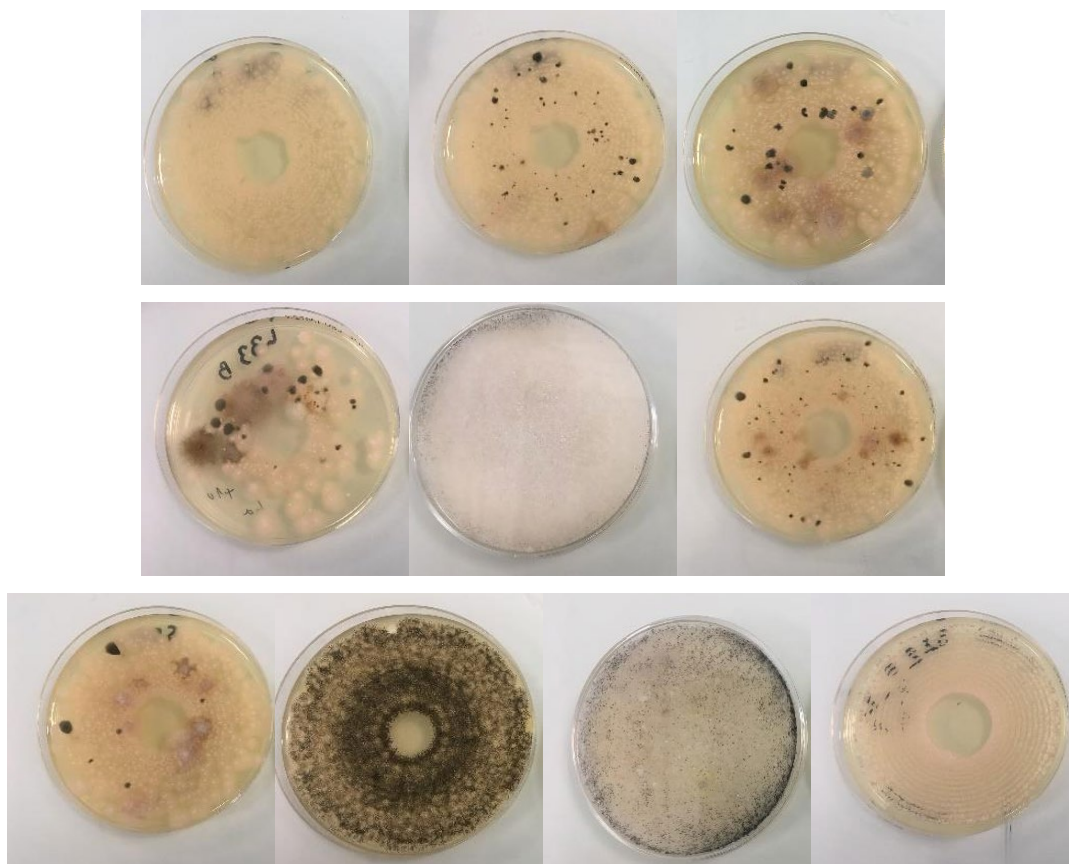


Figura 4. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate din must:
Mostrele –FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV
(recolta 2019).

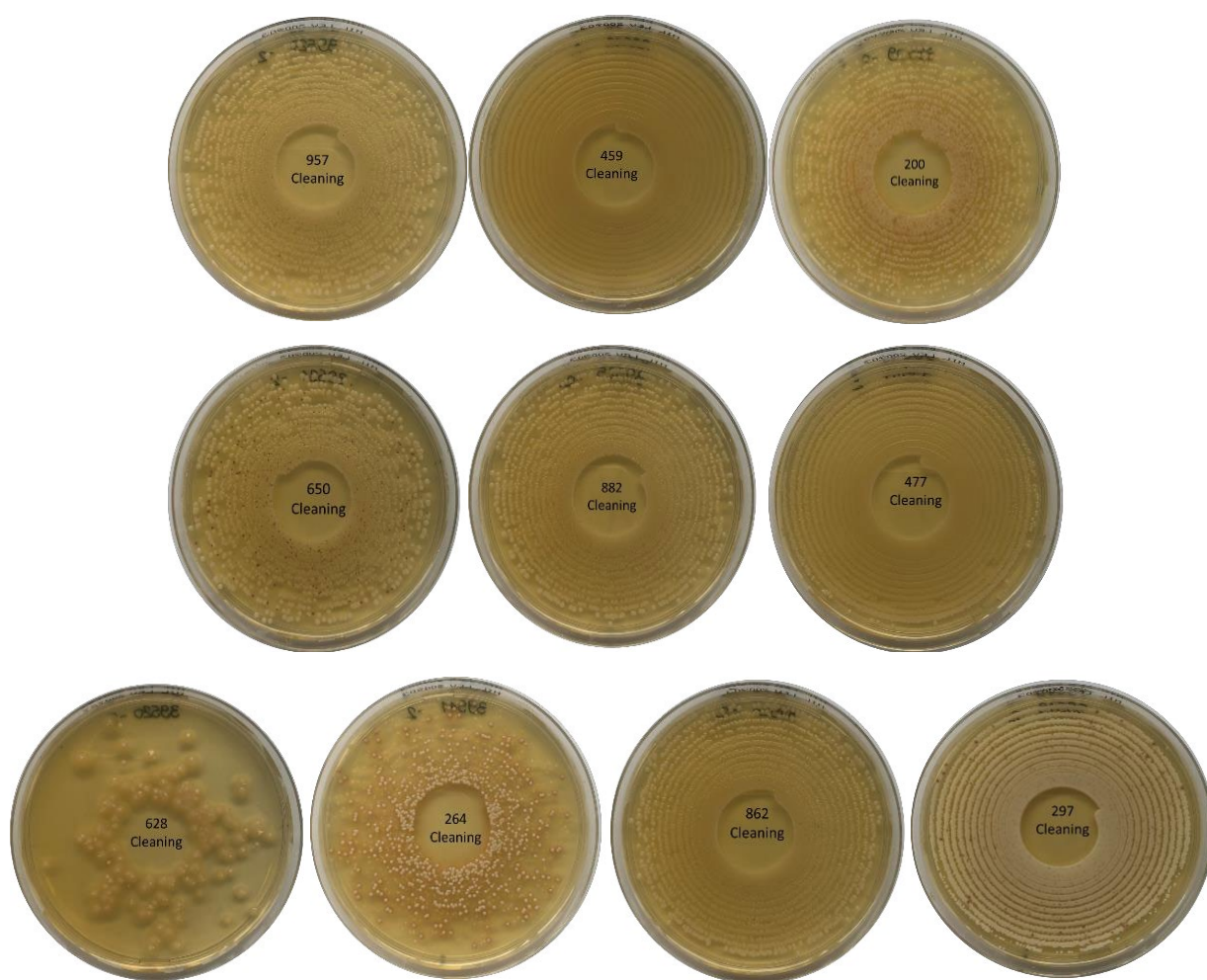


Figura 5. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate de pe suprafața strugurilor:
Mostrele – FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV (recolta 2020).

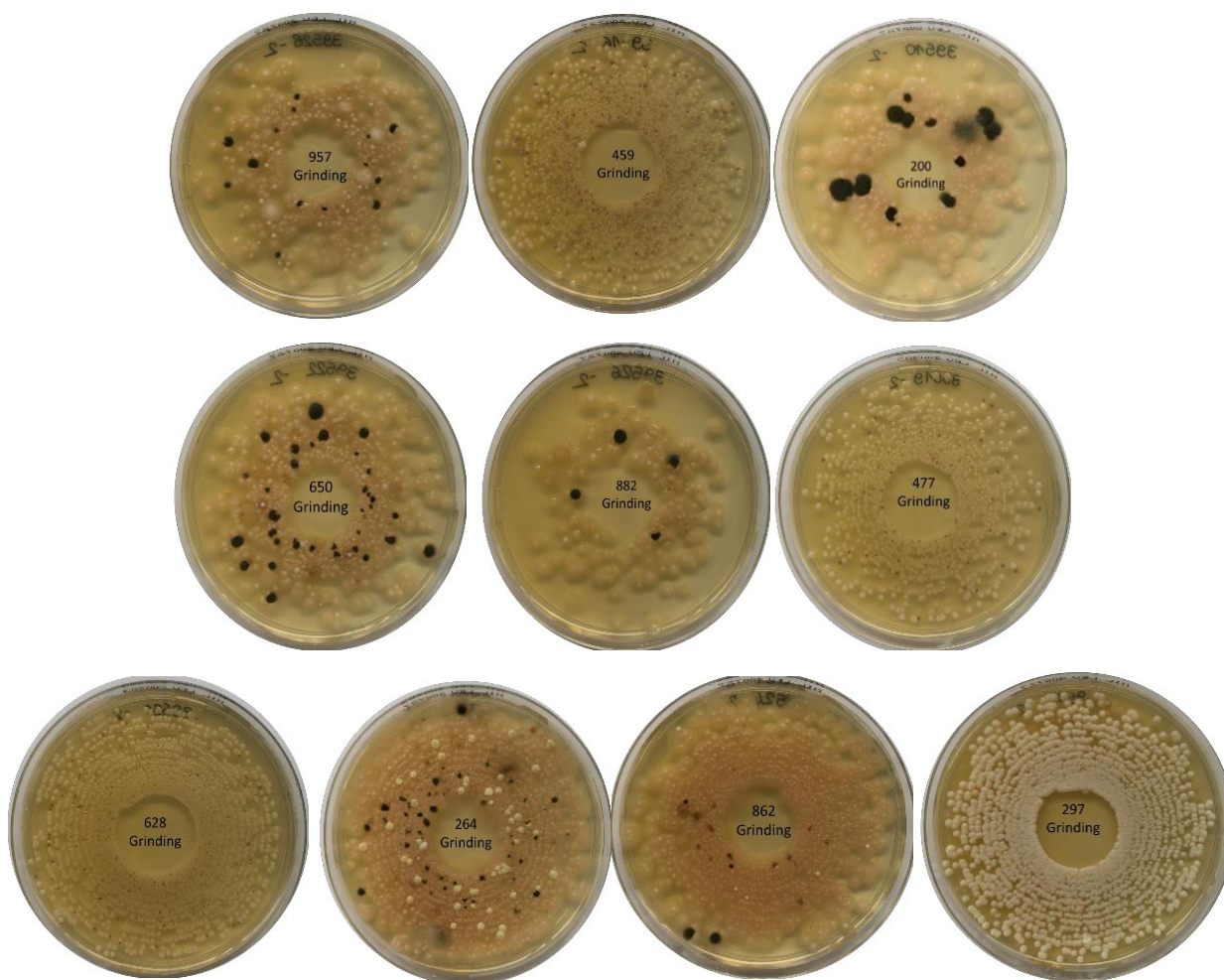
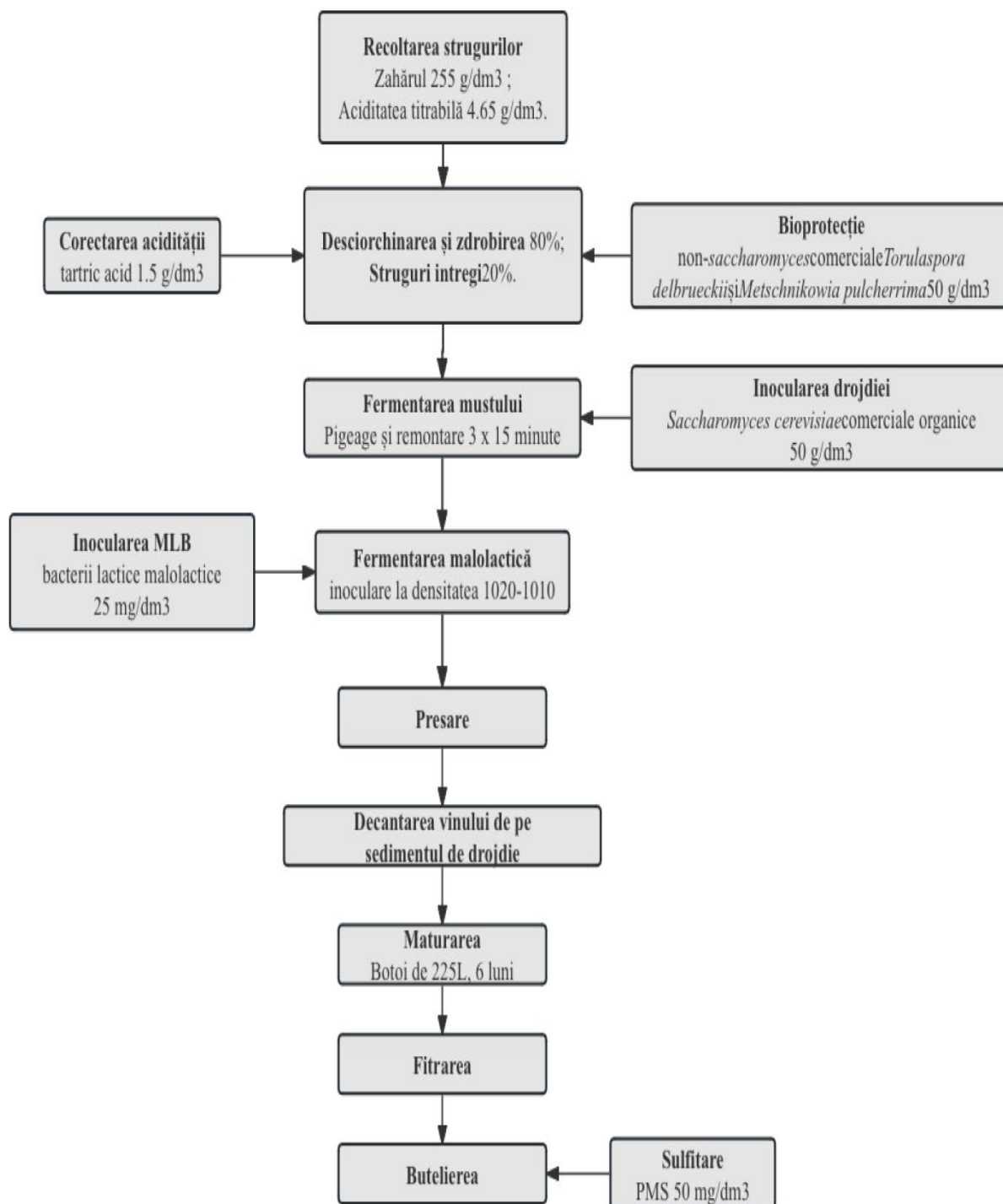
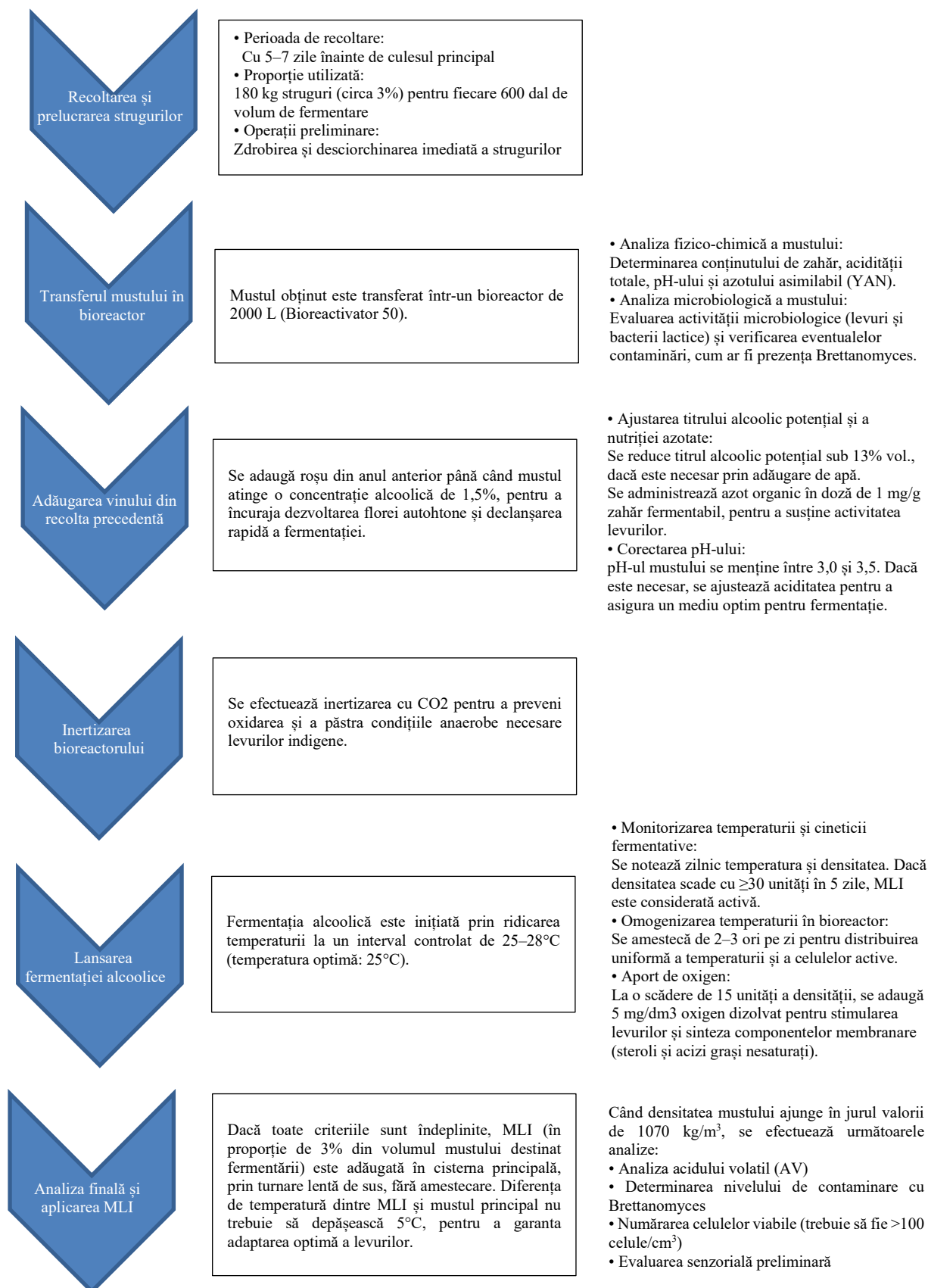


Figura 6. Morfologia microorganismelor cultivate *in vitro* izolate din must:
Mostrele – FN_C, FA_C, SA_C, FN_VLT, FA_VLT, ME_VLT, FN_SV, CF_SV, RN_SV
(recolta 2020).

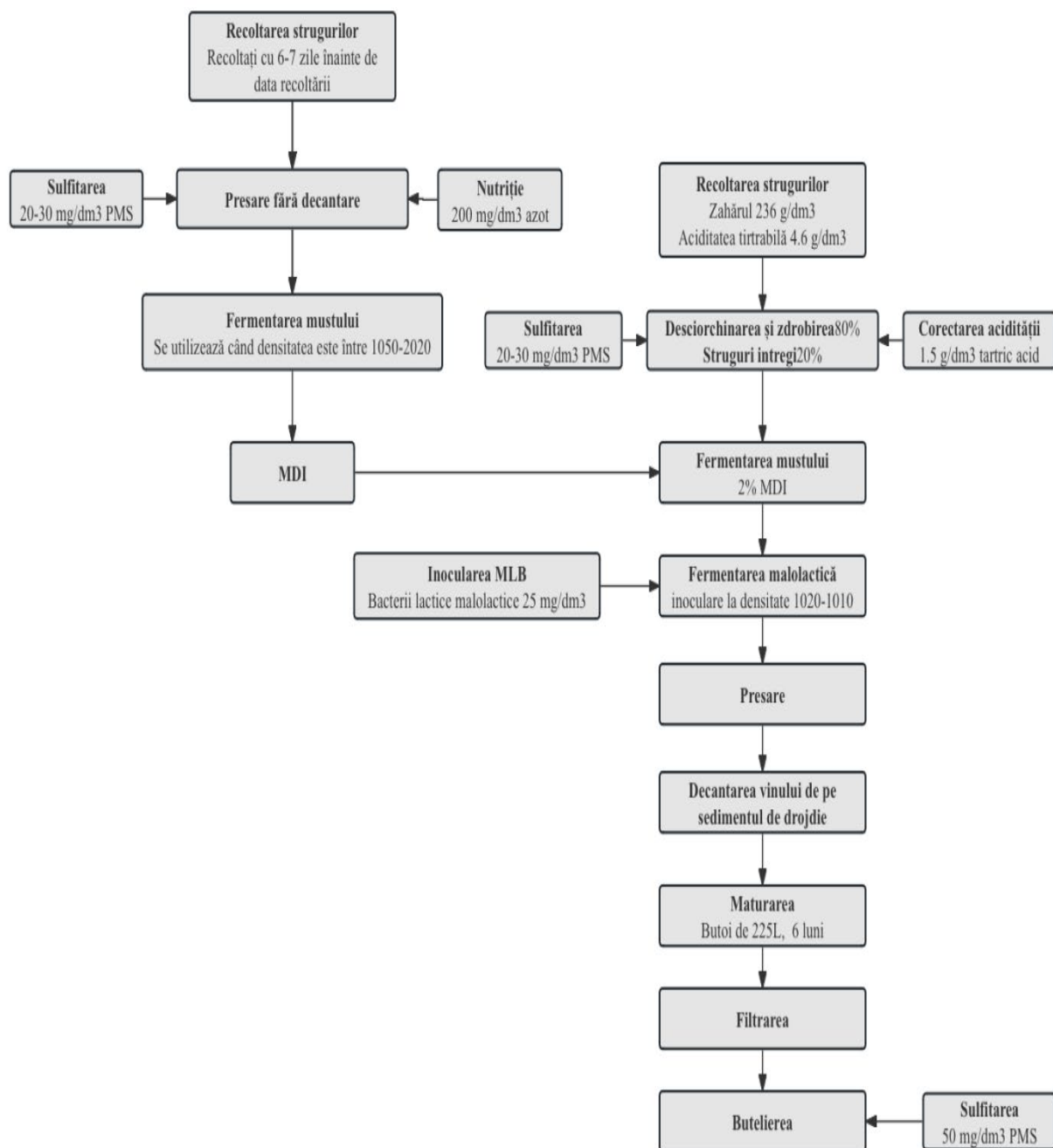
Anexa 2. Schema de implementare a tehnologiei de bioprotecție în elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică



Anexa 3. Schema de pregătire a masei de drojii indigene optimizate și folosită la elaborarea vinurilor roșii și roze sub certificarea ecologică



Anexa 4. Schema de implementare a procesului de pregătire a maielei de drojdii indigene optimizate în elaborarea vinurilor roșii sub certificarea ecologică



Anexa 5. Act de implimentare a producției la bioprotecție și PdC

PURCARI
WINERIES GROUP



APROBAT

Director General
Purcari Wineries Group
V.BOSTAN

ACT DE TRANSFER TEHNOLOGIC ȘI DE IMPLEMENTARE

a procesului de pregătire a maiei de levuri indigene optimizate și a tehnologiei de bioprotecție la elaborarea vinurilor roșii și roze sub certiificarea ecologică

Comisia în componența:

- CHIOSA N. – Director producere Group Purcari Wineries Group
- MIHAILOV S. – Manager Departament Certificare și Standardizare,
- ARPENTIN G. – Director Cercetare, Dezvoltare și Inovare al Purcari Wineries Group
- YAO M. – doctorand Universitate Tehnica din Moldova,
- WANG F. – doctorand Universitatea Tehnica din Moldova

au întocmit acest act pentru confirmarea implementării în condițiile de producere a IM „Vinaria Purcari” a procesului de pregătire a maiei de levuri indigene optimizate și a tehnologiei de bioprotecție la elaborarea vinurilor sub certiificarea ecologică. Transferul tehnologic a fost realizat în perioada campaniilor de recoltare 2021-2023, folosind drept materie primă struguri roșii aflați în conversie la viticultura ecologică.

Scopul implementării - validarea experimentală a cercetărilor efectuate asupra diversității microbiologice a podgoriilor din diferite regiuni cu indicații geografice protejate și în particular podgoriile Vinăriei Purcari. În rezultatul implementării tehnologiei a fost obținut un lot de vin roșu sec în volum de 1500 dal din soiul Pinot Noir și un lot de vin roze în volum de 1800 dal din soiurile Merlot, Cabernet Sauvignon și Malbec.

Analiza senzorială a vinurilor elaborate conform protocolului experimental s-au caracterizat prin arome mai complexe, cu nuanțe de fructe mai pronunțate, cu gust suplu și echilibrat, comparativ cu vinurile de control obținute prin fermentarea cu levuri active din comerț.

Vinurile obținute cu aplicarea tehnologiei propuse sunt comercializate sub următoarele mărci: Native Pinot Noir și Native roze de Purcari.

În rezultatul lucrărilor de transfer, comisia recomandă procesul de pregătire a maiei de levuri indigene optimizate, precum și tehnologia de bioprotecție la elaborarea vinurilor roșii și roze sub certiificarea ecologică pentru a fi implementate la întreprinderile vitivinicole din cadrul Grupului Purcari, precum și la întreprinderile din sectorul vitivinicol al Republicii Moldova.

Semnăturile comisiei:

Director producere
Manager Departament Certificare și Standardizare
Director Cercetare, Dezvoltare și Inovare
Doctorand Universitate Tehnica din Moldova
Doctorand Universitatea Tehnica din Moldova

CHIOSA N.
MIHAILOV S.
ARPENTIN G.
YAO M.
WANG F.

Anexa 6. Diplome ale producției la bioprotecție și PdC





43º CONGRESO MUNDIAL
DE LA VÍÑA
Y DEL VINO
MÉXICO
ENSENADA
BAJA CALIFORNIA
2022

CERTIFICATE

The Organising and Scientific Committees hereby certify that

MEILING YAO

Moldova, Republic Of

has successfully attended 43rd World Congress of Vine and Wine held in Ensenada, Mexico from October 31st to November 4th 2022.

Pau Roca
Director General de la OIV

Dr. José Enrique Herbert Pucheta
Jefe de la Delegación Científica de México ante la
Organización Internacional de la Vitis y el Vino y
Coordinador Científico del 43º Congreso Mundial de la OIV

Hans Backhoff Guerrero
Presidente del Consejo
Mexicano Vitivinícola

Ensenada, November 2022.



AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



BAJA CALIFORNIA
GOBIERNO DEL ESTADO



CONSEJO MEXICANO VITIVINICOLA



World Congress of
**VINE
AND WINE**

5 - 9 June 2023
Spain
Cádiz / Jerez

CERTIFICATE

The Organizing and Scientific Committees hereby certify that

MEILING YAO

Has successfully attended 44th World Congress of Vine and Wine
held in Jerez, Spain from June 5th to June 9th, 2023.

D. Fernando Zamora
Presidente del
Comité Científico

D. Pau Roca
Director General de la OIV

Jerez, June 2023

X Series Certificate

This is to certify that

Meiling Yao

has successfully completed all
courses and received passing
grades for an XSeries Program
certificate in

**Data Analysis for
Life Science**

a program offered by HarvardX,
in collaboration with edX.

HarvardX



Rafael Irizarry

Professor of Biostatistics

Harvard T.H. Chan School of Public
Health



XSERIES PROGRAM CERTIFICATE

Issued March 2022

VALID CERTIFICATE ID

5d55d9d62b0e4eb88d9ce9cd0bd2b79a

Declarația privind asumarea răspunderii

Meiling YAO, declar pe răspundere personală că materialele prezentate în teza de doctorat sunt rezultatul propriilor cercetări și realizări științifice. Conștientizez că, în caz contrar, urmează să suport consecințele în conformitate cu legislația în vigoare.

Meiling YAO


11 . 04 . 2025

Curriculum Vitae

PERSONAL INFORMATION

Meiling YAO



 str. Moara Roșie 2/4, MD-2005, Chișinău, republica Moldova
 +373 079739891
 meilingyao2019@gmail.com

Sex Female | Date of birth 09/08/1994 | Nationality Chinese

FIELDS OF SCIENTIFIC INTEREST

Microbial diversity, biology technology in wine field.

EDUCATION AND TRAINING

Ph.D (2019 - 2024) Food engineering (alcoholic and non-alcoholic beverage)
Technical University of Moldova

Master of Science (2017-2019) Physical (Semiconductor Physics and Engineering)
Moldova State University
GPA (9.25/10)

Bachelor of Science (2012-2016) Physical (Applied Physics)
Northeast Petroleum University
GPA (3.54/5)

Internship

Winemaker (2021) [Developing organic wine](#)
Purcari winery, Moldova

LANGUAGE AND SCIENTIFIC ACTIVITY

Mother tongue(s) Chinese

Other language(s)

	UNDERSTANDING		SPEAKING		WRITING
	Listening	Reading	Spoken interaction	Spoken production	
English	B2	C1	B2	B2	C1
Romanian	B2	B2	B2	B2	B2

Participation in scientific events	44th world conference of vine and wine, Spain, 2023 Poster: The microbial diversity research of Feteasca Neagra grown in three geographical indications from the Republic of Moldova 43th world conference of vine and wine, Mexico, 2022 Presentation: Bioprotection as a tool to produce natural wine: Impact on physicochemical and sensory analysis
Scientific publication	8 science articles: 1. Wang, F., Yao, M., Arpentin, G. Sensory evaluation of Fetească Neagră wine in Republic Moldova. In: Magarach Vinogradstvo i Vinodelie, 2022, vol. 24(1), pp. 90-94. ISSN 0236-1264. DOI:10.35547/IM.2022.38.66.014 2. Wang, F., Yao, M., Arpentin, G. Exploring the Micro and Macro terroir of Feteasca Neagra wine from Moldova. In: Journal of Engineering Sciences, 2024, vol. 31, nr.1, pp. 97-111. ISSN 2587-3474/ISSNe 2587-3482. DOI: https://doi.org/10.52326/jes.utm.2024.31(1).08 3. Yao, M. Microbial diversity on grape surface and its research status. In: Journal of Engineering Sciences, 2024, vol. 30, nr. 2, pp. 158-172. ISSN 2587-3474/ISSNe 2587-3482. DOI: https://doi.org/10.52326/jes.utm.2023.30(2).14 4. Yao, M., Wang, F., Arpentin, G. Studiul microorganismelor strugurilor din podgoriile Republicii Moldova: influența factorilor uman și natural. In: Revista de Știință, Inovare, Cultură și Artă „Akademos”, 2023, vol.70, nr.3, pp. 99-106. ISSN 1857-0461/ISSNe 2587-3687. DOI: https://doi.org/10.52673/18570461.23.3-70.08 5. Wang, F., Yao, M., Arpentin, G. Terroir of Fetească Neagră wines from Moldova. In: International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking. Yalta, Rusia, 2023, vol. 78, pp. 1-7. ISSNe 2117-4458. DOI: https://doi.org/10.1051/bioconf/20237805003 6. Yao, M., Wang, F., Arpentin, G. The Effect of pesticide usage on grape yeast. In: International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking. Yalta, Rusia, 2022, vol. 53, pp. 1-6. ISSNe 2117-4458. DOI: https://doi.org/10.1051/bioconf/20225305001 7. Yao, M. et al. The yeast on the grape berry surface influenced by climatic factors. In: International Scientific-Practical Conference on Modern Trends of Science, Innovative Technologies in Viticulture and Winemaking. Yalta, Rusia, 2021, vol. 39, pp. 1-8. ISSNe 2117-4458. DOI: https://doi.org/10.1051/bioconf/20213905002. 8. Yao, M., Wang, F., Arpentin, G. Bioprotection as a tool to produce natural wine: Impact on physicochemical and sensory analysis. In: 43rd World Congress of Vine and Wine, Ensenada, Mexico, 2022, vol. 56, pp.1-4. ISSN 2273-1709. DOI: https://doi.org/10.1051/bioconf/20235602019