

Universitatea Tehnică a Moldovei

**Monitorizarea microbiologică a levurilor non-
Saccharomyces la diferite etape de producere a vinului**

Student: CHITOROG Tudor

Coordonator: ZGARDAN Dan, conf. univ., dr.

Chișinău – 2026

Rezumat

Istoric vorbind drojdiile de tip non-Saccharomyces erau considerate vietăți microscopice dăunătoare având potențialul de a altera băutura băhică și de a afecta etapele de fabricație. Recent s-au raportat multiple cazuri unde licoarea a înregistrat niveluri de oțetire exagerate apărând o peliculă superioară care a generat aspect tulbure și transformări moleculare. Totodată, anumite sortimente au căpătat arome dezgustătoare, amintind de materii prime precum pielea tăbăcită, zaharul carbonizat sau polimeri arși. Aceste consecințe dăunătoare provin de la fermenții diferiți de Saccharomyces, rezultați din impurificarea ingredientelor de bază, ignorarea curățeniei ori a procedurilor tehnice, oferirea unui mediu propice înmulțirii acestora și absența acțiunilor de stopare a impactului nociv. Odată cu evoluția manufacturieră și extinderea analizelor științifice, s-a observat că respectivele ciuperci microscopice pot aduce avantaje, cum ar fi sinteza glicerinei, fixarea rezidă în determinarea echilibrului perfect de gestionarea a populațiilor bacteriene alternative, întrucât acest aspect separă o băutură de calitate de un eșec total. Drept urmare, rare unități viticole riscă să folosească astfel de fermenți, optând mai degrabă pentru tulpinile Saccharomyces cerevisiae, privite drept variantă tradițională în industria vinului. O procedură foarte răspândită de analiză biologică este tehnica polimerizării în lanț, care implică multiplicarea artificială, în laborator a unui segment de material genetic. Inventarea acestui procedeu spre finele veacului trecut a facilitat ușurarea și grăbirea operațiunilor de detectare a formelor de viață microscopice prin intermediul indicilor ereditari. Pe baza verificării efectuate, am utilizat sistemul RT-PCR în scopul depistării drojdiilor alternative în variate eșantioane de fructe culese din bazinele geografice de mijloc și de jos ale satului.

Cuvinte-cheie: levuri non-Saccharomyces, sistemul RT-PCR.

Summary

Historically, **non-Saccharomyces** yeasts were considered harmful microscopic organisms, with the potential to alter alcoholic beverages and negatively affect the stages of production. Recently, multiple cases have been reported in which the drink recorded exaggerated levels of acetification, with the appearance of a surface film that generated a cloudy aspect and molecular transformations. At the same time, certain varieties acquired repulsive flavors, reminiscent of raw materials such as tanned leather, carbonized sugar, or burnt polymers. These detrimental consequences originate from fermenters other than *Saccharomyces*, resulting from the contamination of basic ingredients, neglect of cleanliness or technical procedures, the provision of a favorable environment for their multiplication, and the absence of actions to stop their harmful impact. With the evolution of manufacturing and the expansion of scientific analyses, it has been observed that these microscopic fungi can also bring advantages, such as glycerol synthesis. The key lies in determining the perfect balance in managing alternative microbial populations, since this aspect separates a quality beverage from a total failure. Consequently, only rare winemaking units risk using such fermenters, opting instead for *Saccharomyces cerevisiae* strains, regarded as the traditional variant in the wine industry.

A very widespread biological analysis procedure is the polymerase chain reaction technique, which involves the artificial multiplication in the laboratory of a segment of genetic material. The invention of this method toward the end of the last century facilitated the simplification and acceleration of operations for detecting microscopic life forms through hereditary markers. Based on the verification carried out, I employed the RT-PCR system for the detection of alternative yeasts in various fruit samples collected from the middle and lower geographical basins of the village.

Keywords: non-Saccharomyces yeasts, RT-PCR system.

CUPRINS

INTRODUCERE	8
I. STUDIUL BIBLIOGRAFIC	9
1.1. Caracteristica levurilor Non-Sacharomyces	9
1.2. Alterări ale vinului produse de levuri Non-Saccharomyces	19
II. MATERIALE ȘI METODE	23
2.1. Primeri folosiți pentru detectarea levurii sălbatice <i>Hanseniasporum uvarum</i>	23
2.2. Izolarea ADN-ului.	23
2.3. Metoda de detectare a levurii sălbatice <i>Hanseniasporum uvarum</i> .	23
2.4. Pregătirea probelor de ADN pentru amplificare.	34
2.5. Analiza și interpretarea datelor experimentale qPCR.	45
III. REZULTATE ȘI DISCUȚII	46
3.1. Materialul oenologic cercetat	46
3.2. Detecția ADN-ului levurii sălbatice <i>Hanseniasporum uvarum</i> prin metoda qPCR.	47
3.3. Analiza mustului și vinului produs în campania de vinificare 2021.	49
3.4. Analiza mustului și vinului produs în campania de vinificare 2022.	61
3.5. Analiza mustului și vinului produs în campania de vinificare 2023.	61
CONCLUZII	65
BIBLIOGRAFIA	66

Introducere

Republica Moldova se remarcă printr-o moștenire culturală îndelungată, o istorie complexă, vinuri apreciate și peisaje deosebite de atractive. Practica viticolă a ocupat dintotdeauna un rol esențial în viața comunităților locale, fiind transmisă de-a lungul generațiilor până în prezent. În ultimul deceniu s-a observat o creștere considerabilă a exporturilor către spațiul Uniunii Europene, fapt ce a contribuit la recunoașterea și valorizarea vinurilor moldovenești pe piețele externe. Totodată, numărul distincțiilor obținute medalii de aur, argint și bronz a urmat un trend ascendent, confirmând capacitatea vinurilor autohtone de a concura cu cele produse în alte țări europene. Un moment de referință l-a constituit desemnarea celui mai bun vin la nivel mondial ca provenind din Republica Moldova. Pentru obținerea unor produse vitivinicole de calitate superioară, supravegherea microbiologică încă din fazele incipiente ale procesului de vinificație este de o importanță majoră. Obținerea vinurilor premium necesită monitorizare microbiologică atentă încă din fazele timpurii ale procesului de vinificație. În acest cadru se pot menționa:

1. Utilizarea unor tehnici moderne și eficiente de identificare a microorganismelor, inclusiv a levurilor non-Saccharomyces, care pot influența în mod pozitiv sau negativ calitatea produsului final.
2. Pentru obținerea unor vinuri de calitate superioară este esențială supravegherea microbiologică încă din etapele inițiale ale procesului de producție.

Scopul lucrării este monitorizarea microbiologică a levurilor *Hanseniasporum uvarum* la diferite etape de producere a vinului.

Pentru a realiza acest scop, ne-am propus următoarele obiective:

1. Detecția levurilor sălbatice *H. uvarum* în musturile și vinurile produse în secția de microvinificație prin metoda qPCR.
2. Determinarea dinamicii de contaminare a vinurilor cu *H. uvarum* timp de 3 campanii de vinificare.
3. Evaluarea eficienței primerilor proiectați p99-100 pentru detecția levurilor *H. uvarum*.

Levurile sunt organisme unicelulare încadrate în regnul Fungi. Levurile Non-Saccharomyces, denumite și levuri sălbatice, reprezintă o categorie distinctă de microorganisme care se remarcă prin capacitatea de a realiza o fermentație parțială a mustului, generând esteri. Acestea sunt bine cunoscute în domeniul vinificației și studiate de microbiologii din industria vitivinicolă datorită influențelor lor, atât favorabile cât și nefavorabile, asupra calității vinului. Până în prezent au fost identificate peste 25 de specii de levuri non-Saccharomyces, însă cele mai frecvent întâlnite sunt: *Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia* și *Saccharomyces*.

BIBLIOGRAFIA

1. Grangeteau C., Gerhards D., Rousseaux S., von Wallbrunn C., Alexandre H., Guilloux-Benatier M., Dequin S., Schmitt-Kopplin P., Alexandre G. From vineyard to wine: Impact of non-Saccharomyces yeasts on volatile profiles and sensory properties of single-cultivar wines. *Front. Microbiol.* 2021;12:729576.
2. Morata A., Benito S., Loira I., Palomero F., González M.C., Suárez-Lepe J.A. Formation of pyranoanthocyanins by *Schizosaccharomyces pombe* during the fermentation of red must. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;159:47–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.007.
3. Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P. Controlled mixed fermentation using non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *Microorganisms.* 2019;7:8. doi: 10.3390/microorganisms7010008.
4. Medina K., Boido E., Fariña L., Gioia O., Gomez M., Barquet M., Gaggero C., Dellacassa E., Carrau F. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 2013;141:2513–2521.
5. Petruzzi L., Capozzi V., Berbegal C., Corbo M.R., Bevilacqua A., Spano G., Sinigaglia M. Microbial Resources and Enological Significance: Opportunities and Benefits. *Front. Microbiol.* 2017;8:995. doi: 10.3389/fmicb.2017.00995.
6. Ciani C., Ferraro F. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *J. Appl. Microbiol.* 1998;85:247–254. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00485.
7. Wang R., Sun J., Lassabliere B., Yu B., Liu S.Q. Fermentation characteristics of four non-Saccharomyces yeasts in green tea slurry. *Food Microbiol.* 2020;92:103609. doi: 10.1016/j.fm.2020.103609.
8. Benito S., Hofmann T., Laier M., Lochbühler B., Schüttler A., Ebert K., Fritsch S., Röcker J., Rauhut D. Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-Saccharomyces and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. Food Res. Technol.* 2015;241:707–717. doi: 10.1007/s00217-015-2497-8.
9. Padilla B., Gil J.V., Manzanares P. The impact of non-Saccharomyces yeast species in the production of sparkling wines. *Foods.* 2020;9:1252.
10. Fleet G.H. Non-Saccharomyces yeasts: The underestimated and indispensable contribution of early co-fermentations in wine. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2019;46:1201–1219.
11. Liu J., Zhu B., Zhang Z. Impact of Non-Saccharomyces Yeasts on Volatile Compound Profiles in Wine Fermentation: A Review. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:629219.

12. Covaci E. Sclifos A. Local yeasts isolated from Cimișlia wine center as winemaking perspective of the Republic Moldova. The 18th International Conference of Constructive Desing and technological Optimization in Machine Building Field OPROTEH 2023. ISSN 2457-3388 „Alma Mater” Publishing House , Bacau, 11-13 mai, 2023 pag 68.
13. Jolly N.P., Varela C., Pretorius I.S. Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* 2014;14:215–237.
14. Tofalo R., Schirone M., Fasoli G., Perpetuini G., Perpetuini F., Corsetti A., Suzzi G. The contribution of non-Saccharomyces yeasts to wine aroma. *Ann. Microbiol.* 2019;69:1027–1041
15. Tofalo R., Perpetuini G., Rossetti A.P., Gaggiotti S., Piva A., Olivastri L., Cichelli A., Compagnone D., Arfelli G. Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and non-Saccharomyces yeasts to improve traditional sparkling wines production. *Food Microbiol.* 2022;108:104097. doi: 10.1016/j.fm.2022.104097.
16. Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P. Controlled mixed fermentation using non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *Microorganisms.* 2019;7:8. doi: 10.3390/microorganisms7010008.
17. COVACI, E., SCLIFOS, A., VLADEI N. Enhancing the Acidity and Sensory Profile of Two Wines from the Stefan Voda PGI Wine Region Using Native Grape Microflora. 2026/1, Food and Nutrition Sciences, 17 (1), 50-67. https://www.scirp.org/pdf/fns_2704280.pdf
18. Portillo M.d.C., Mas A., Cantos-Villar E. Use of non-Saccharomyces yeasts and oak chips for white wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2016;232:63–70. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.011.
19. Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubourdieu D., Masneuf-Pomarede I The grape must non-Saccharomyces microbial community: Impact on volatile thiol release. *Int. J. Food Microbiol.* 2011;151:210–215. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026.
20. Fernández M., Úbeda J., Briones A. Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int. J. Food Microbiol.* 2000;59:29–36. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00283-X.
21. Cappello M.S., Bleve G., Grieco F., Dellaglio F. Use of non-Saccharomyces yeasts and oenological tannins in red wine vinifications: Influence on colour, astringency and sensory properties. *Food Microbiol.* 2017;62:271–282. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.012.

22. Fernandes T., Mateus P., Couto J.A. Impact of non-Saccharomyces yeasts on wine chemistry and flavour: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2021;111:145–162. doi: 10.1016/j.tifs.2021.08.016.
23. Maturano Y.P., Rodr'iguez Assaf L.A., Toro M.E., Nally M.C., Vallejo M., Castellanos de Figueroa L.I., Combina M., Vazquez F. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 2012;155:43–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015.
24. Strauss M., Jolly N., Lambrechts M., Van Rensburg P. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 2001;91:182–190. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01379.
25. 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. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 2020;11:27–39. doi: 10.2174/2212798410666190131103713.
26. Postigo V., Sanz P., Garc'ia M., Arroyo T. Impact of Non-Saccharomyces Wine Yeast Strains on Improving Healthy Characteristics and the Sensory Profile of Beer in Sequential Fermentation. *Foods.* 2022;11:2029. doi: 10.3390/foods11142029.
27. Sturza, Rodica, Balanuța, Anatol, Sclifos, Aliona, Covaci Ecaterina. Indicații metodice pentru realizarea proiectelor de an și de licență la proiectarea întreprinderilor vitivinicole. Univ. Tehn. a Moldovei. Fac. Tehnologia Alimentelor, Dep. Oenologie și Chimie. Chișinău: Tehnica UTM, 2023. 60 p. ISBN 978-9975-45-945-7.