

**UNIVERSITATEA TEHNICĂ A MOLDOVEI**

**Cu titlu de manuscris C. Z. U.: 663.242(478)**

**BOIȘTEAN ALINA**

**OPTIMIZAREA TEHNOLOGIEI ȘI CARACTERIZAREA CALITĂȚII  
OȚETULUI DE VIN AUTOHTON**

**253. 01. - Tehnologia produselor alimentare de origine  
vegetală**

**Rezumatul tezei de doctor în științe inginerești**

**CHIȘINĂU, 2022**

Teza a fost elaborată în cadrul școlii doctorale Știința Alimentelor, Inginerie Economică și Management, Departamentul Alimentație și Nutriție, Universitatea Tehnică a Moldovei.

**Conducător științific:**

CHIRSANOVA Aurica, doctor în biologie, conferențiar universitar, UTM

**Consultant științific:**

GĂINĂ Boris, doctor habilitat în științe tehnice, profesor universitar, academician, AȘM

**Consiliul Științific Specializat D 253.01-22-11**, abilitat cu dreptul de a organiza susținerea tezei de doctor a fost aprobat de către Consiliul de Conducere al ANACEC prin decizia nr.2 din 30 septembrie 2022 în următoarea componență:

**Președinte:** GENDOV-MOȘANU Aliona, doctor habilitat în științe ingineresti, conferențiar universitar, UTM, Republica Moldova.

**Secretar:** NETREBA Natalia, doctor în științe tehnice, conferențiar universitar, UTM, RM.

**Membru:** STURZA Rodica, doctor habilitat în științe tehnice, profesor universitar, UTM, RM.

**Membru:** ȚISLINSKAIA Natalia, doctor în științe tehnice, conferențiar universitar, UTM, RM.

**Membru:** SCUTARU Iurie, doctor în chimie, conferențiar universitar, UTM, RM.

**Membru:** CHISELIȚA Oleg, doctor în biologie, conferențiar cercetător, IMB, RM.

**Referenți oficiali:**

**1** ALEXANDROV Eugeniu, doctor habilitat în științe biologice, Institutul de Genetică, Fiziologie și Protecție a Plantelor, Republica Moldova.

**2** MACARI Artur, doctor în științe tehnice, conferențiar universitar, șef a departamentului Tehnologia Produselor Alimentare, UTM, Republica Moldova.

Susținerea va avea loc la 04.11.2022, ora 14<sup>00</sup>, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctor, la Universitatea Tehnică a Moldovei pe adresa: str. Studenților 9/9, blocul de studii nr.5, aud. 120, MD-2045, Chișinău, Republica Moldova.

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca Universității Tehnice a Moldovei și pe pagina web a ANACEC ([www.anacec.md](http://www.anacec.md)).

Rezumatul a fost expediat la 05.10.2022.

Secretar științific

NETREBA Natalia, dr., conf. univ

al Comisiei de Doctorat:

Conducător științific:

CHIRSANOVA Aurica, dr., conf. univ.

Consultant științific:

GĂINĂ Boris, dr. hab., prof. univ., acad.

Autor:

BOIȘTEAN Alina

## CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETARII	4
CONȚINUTUL TEZEI	8
1. ASPECTE FIZICO-CHIMICE ȘI MICROBIOLOGICE ALE OBȚINERII OȚETULUI DIN VIN	8
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	9
3. SELECTAREA TULPINILOR DE BACTERII ACETICE DIN MATERII PRIME AUTOHTONE	10
3.1. Izolarea culturilor pure de bacterii acetice	10
3.2. Caracteristicile morfologice și fiziologice ale tulpinilor izolate	11
3.3. Detectarea și identificarea tulpinilor izolate	11
4. OPTIMIZAREA TEHNOLOGIEI DE OBȚINERE A OȚETULUI DIN VIN	12
4.1. Obținerea oțetului din suc concentrat	12
4.2. Impactul dioxidului de sulf	14
4.3. Stabilirea dozei optime de cultură starter	15
4.4. Influența diferitor tipuri de substrat	15
4.5. Finisarea oțetului cu diferiți agenți de limpezire	20
4.6. Optimizarea tehnologiei de fabricație a oțetului din vin	23
5. Tehnologia fabricării băuturilor nealcoolice cu oțet din vin alb	23
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	26
BIBLIOGRAFIE	27
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI	28
ADNOTARE	32
АННОТАЦИЯ	33
ABSTRACT	34

## REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

**Actualitatea și importanța temei abordate.** Viticultura constituie unul dintre sectoarele-cheie ale economiei Republicii Moldova (RM). În conformitate cu datele oferite de Organizația Internațională a Viei și Vinului, suprafața podgoriilor constituie 140 mii ha din teritoriul RM, reprezentând 1,9% din suprafață totală a plantațiilor viticole din întreaga lume. Ponderea cea mai mare a plantațiilor o dețin soiurile tehnice destinate producerii vinului și sucului. RM a contribuit la producerea vinului în lume în anul 2018 cu 2 milioane de hectolitri [1]. Soiurile cultivate în țară au un potențial genetic determinat de o productivitate înaltă. Realizarea acestui potențial este influențată negativ de următorii factori: monocultura și stresurile periodice climaterice [2]. O altă problemă ține de relațiile politice dintre țări, care stopează comercializarea vinurilor.

Pandemia COVID-19 a afectat industria mondială inclusiv cea vitivinicolă - ramură prioritară și strategică pentru RM. Conform statisticilor, exporturile de produse vinicole din Moldova au scăzut cu 9% în martie 2020 față de aceeași perioadă a anului 2019. Principalele motive ale declinului includ constrângerile logistice datorită măsurilor de carantină, reducerea cererii pe piețele tradiționale și amânarea sau anularea acțiunilor de promovare a vinului [3].

Una dintre sarcinile principale ale politicii RM în domeniul alimentației sănătoase este extinderea gamei și îmbunătățirea calității produselor prin utilizarea mai deplină a materiilor prime locale și îmbunătățirea tehnologiilor de procesare [4]. Prelucrarea rațională a materiilor prime locale, inclusiv producția de oțet natural solicitat de consumatori la întreprinderile HORECA și de industria alimentară, este de o importanță majoră pentru asigurarea cu produse de înaltă calitate.

În prezent, produsele naturale sunt din ce în ce mai solicitate în rândul populației. Oțetul natural, datorită proceselor metabolice cauzate de bacteriile acetice, este bogat în minerale, oligoelemente, acizi organici, o serie de enzime și aminoacizi, o cantitate mică de esteri, aldehide și alți compuși organici, care îi conferă un gust deosebit și o aromă plăcută. Oțetul sintetic pentru uz alimentar este produs, de regulă, cu adăugarea unei varietăți de arome (identice cu cele naturale și sintetice). În unele țări (SUA, Franța, Bulgaria) producția de oțet în scop alimentar din acid acetic sintetic este interzisă [5].

E de menționat că o bună parte din oțeturile oferite pe piața RM provin din import. Volumul redus al producției autohtone de oțet este determinat de unele impedimente, cum ar fi instrucțiunile tehnice, unele acte normative învechite și lipsa de cultură starter bazată pe bacterii acetice autohtone. Problemele legate de optimizarea unor etape tehnologice, lărgirea sortimentului și îmbunătățirea calității oțetului sunt elucidate în lucrările savanților naționali și internaționali, inclusiv: B.Gaina [6], D. Beceanu [7], M. Begea [8], J. Horiuchi [9], C. Vegas [10] și al.

S-a realizat o cercetare științifică în ceea ce privește optimizarea unor parametri tehnologici de obținere a oțetului pe cale fermentativă naturală, utilizând suc concentrat din struguri albi și vin alb, materii prime accesibile în țara noastră.

Una dintre problemele cu care se confruntă mulți producători autohtoni este procurarea culturilor de bacterii acetice de import și adaptarea acestora la materiile prime locale. Din punct de vedere economic, utilizarea acestor culturi nu este eficientă, deoarece acestea afectează direct costul produselor finite [11]. Prezența tulpinilor de bacterii acetice izolate din materii prime locale cu productivitate sporită izolate din produsele folosite la fabricarea oțetului permite producătorilor să obțină un produs mai calitativ într-un timp mai scurt.

O altă problemă este sulfitarea vinurilor, tehnică necesară pentru producerea vinului. Dioxidul de sulf se introduce în suc, must sau vin, chiar și în vinurile organice, dar în doze mai mici. Mulți producători refuză utilizarea vinului industrial la producerea oțetului, deoarece anhidrida sulfuroasă inhibă activitatea bacteriilor acetice, iar cantitatea maximă admisibilă pentru realizarea fermentării prin diferite metode nu este cunoscută [12].

Se cunoaște că pentru obținerea oțetului se utilizează diferite substraturi cum ar fi: așchii sau rumeguș de lemn, știuleți de porumb, tulpina trestiei de zahăr și altele [13]. În premieră, la fermentarea acetică s-au utilizat în calitate de substrat materii prime autohtone: coaja de nucă (*Juglans regia L.*) și de alune (*Corylus L.*). Aproximativ 49-50% din masa nucului reprezintă coajă, care nu este valorificată la justa valoare, doar uneori fiind folosită la fabricarea brichetelor sau ca îngrășămintă.

În baza celor menționate, este evidentă actualitatea elaborării și aplicării tehnologiei noi, optimizate și ameliorarea calității oțetului din vin prin valorificarea materiei prime autohtone cu implicarea bacteriilor acetice locale.

**Scopul cercetării** expuse în prezenta lucrare constă în optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin cu utilizarea tulpinii de bacterii acetice izolate din produsele vitivinicole autohtone, inoculate pe substrat din materii prime locale și valorificarea acestuia pentru obținerea băuturilor nealcoolice.

Pentru atingerea scopului propus au fost stabilite următoarele **obiective ale cercetării**:

1. Izolarea culturilor pure de bacterii acetice din produsele vitivinicole autohtone și identificarea lor după caracteristicile morfologice, culturale, fiziologice, biochimice și moleculare;
2. Studiul privind producătorii existenți și sortimentul de oțeturi în RM;
3. Evaluarea influenței diferitor factori asupra fermentării acetice;
4. Optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin;
5. Valorificarea oțetului din vin pentru obținerea unor băuturi nealcoolice.

**Ipotezele de cercetare** rezultă din analiza situației în domeniu și constau în următoarele:

1. Eficiența tehnologiilor de fabricare a oțetului din vin poate fi sporită prin utilizarea tulpinilor de bacterii acetice autohtone cu proprietăți tehnologice avansate, adaptate la calitatea materiei prime și condițiile specifice de producere.
2. Valorificarea vinului de calitate inferioară, a culturilor acetice izolate și a substraturilor ecologice de proveniență autohtonă în procesul de fabricare a oțetului din vin prin asigurarea unui efect pozitiv dublu - tehnologic și igienic.

**Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese.** Pentru realizarea lucrării au fost utilizate metode clasice și de înaltă performanță. Pentru izolarea și identificarea tulpinii bacteriilor acetice din materii prime autohtone au fost utilizate: analiza morfologică, fiziologică și biochimică a culturii; confirmarea apartenenței bacteriilor izolate la genul *Acetobacter* prin compararea ADN al bacteriilor, folosind metoda RT-PCR. Pentru controlul și confirmarea calității procesului de fermentare au fost aplicate metode microbiologice și fizico-chimice. Efectul substratului asupra indicilor cromatici a fost evaluat prin spectroscopia UV/Vis și prin sistemul CIELab. Au fost utilizate metode de determinare a calității alimentelor elaborate (senzoriale, fizico-chimice și microbiologice), precum și indicele glicemic al acestora.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Pentru prima dată a fost efectuată izolarea și identificarea unei tulpini autohtone de bacterii acetice *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 provenite din oțet artizanal din vin alb obținut din soiul de viță-de-vie Noah. Au fost stabilite dozele-limită de dioxid de sulf și de cultură starter pentru asigurarea derulării eficiente a fermentării acetice. În premieră a fost utilizată coaja de nuci grecești și alune în calitate de substrat pentru bacteriile acetice, astfel micșorând perioada de fermentare și sporind calitățile organoleptice ale oțetului obținut. A fost examinată evoluția glicemiei după consumarea băuturilor nealcoolice elaborate în bază fructelor, pomuşoarelor, plantelor aromatice, oțetului din vin alb etc., constatându-se că băuturile se clasifică în grupa produselor cu indice glicemic scăzut și pot fi recomandate ca alternativă sănătoasă băuturilor din comerț.

**Semnificația teoretică.** Aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru izolarea și identificarea tulpinii studiate prin utilizarea metodei real-time PCR. A fost demonstrată posibilitatea ameliorării parametrilor cromatici ai oțetului din vin alb prin utilizarea cojii de nuci ca substrat pentru dezvoltarea bacteriilor acetice, măbind suprafața de contact cu produsul, astfel eficientizând procesul de fabricare a oțetului.

**Sumarul compartimentelor tezei.** Teza constă din introducere, 5 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie (205 titluri) înserate în 110 pagini conținut de bază, inclusiv 43 figuri, 39

tabele (cu excepția celor indicate în anexe), 13 anexe. Rezultatele au fost reflectate în 14 lucrări științifice și 2 brevete.

**Valoarea aplicativă:** constă în stabilirea condițiilor optime de fermentare acetică a vinului autohton și elaborarea instrucțiunilor tehnice pentru obținerea oțetului din vin. Procedeele tehnologice recomandate în baza studiului pot fi aplicate la întreprinderile de profil, iar utilizarea cojii de nuci soluționează problema deșeurilor agroalimentare. Au fost obținute 2 brevete de invenție.

**Aprobarea rezultatelor.** Rezultatele principale ale tezei au fost comunicate și discutate la un șir de conferințe și simpozioane științifice naționale și internaționale: Simpozionul Internațional „Euro-Aliment”, Galați, 2019; Conferința Internațională „Zilele Academiei de Științe Tehnice din România”, 2019, ediția a XIV-a cu tematica „Creativitatea în dezvoltarea Societății Cunoașterii” organizată de Academia de Științe Tehnice din România și din Chișinău împreună cu Universitatea Tehnică a Moldovei la 17-18 octombrie 2019; Conferința Tehnico-Științifică a Colaboratorilor, Doctoranzilor și Studenților, UTM, Chișinău, 2020; Conferința internațională pentru studenți, masteranzi și doctoranzi „Student în Bucovina”, 18 decembrie 2020; Conferința științifico-practică națională „Inovația: factor al dezvoltării social-economice”, ediția a V-a, Cahul, 17 decembrie 2020; Simpozionul științific național cu participare internațională: Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane, Chișinău, 2021, 20-21 mai; a 16-a Conferința internațională de proiectare constructivă și optimizare tehnologică în domeniul construcției de mașini, Bacău, 25-27 mai 2021; Conferința Internațională de Cercetare Inovatoare EUROINVENT, 20-21 mai 2021, Iași, România; Conferința științifică a școlii de doctorat, SCDS-UDJG a 9-a ediție, Galați, 10-11 iunie 2021; EURO-ALIMENT 2021, the 10th International Symposium, 7-8 October, Galați, România; Salonul Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii PROINVENT, ediția a XIX-a, 20-22 octombrie 2021, Cluj-Napoca, România; Expoziția Internațională Specializată INFOINVENT, ediția a XVII-a din 17-20 noiembrie 2021; Simpozionul Științific Internațional „Sectorul Agroalimentar - Realizări și Perspective” 19-20 noiembrie 2021, Chișinău, Moldova.

**Publicații la tema tezei.** Conținutul de bază al tezei de doctor este expus într-un capitol dintr-o monografie internațională; în 4 articole publicate în reviste științifice indexate în BDI; 1 lucrare fără coautori; două brevete de invenție în RM; 9 teze în culegeri și rezumate la manifestări științifice naționale și internaționale.

**Cuvinte cheie:** oțet, bacterii acetice, fermentare alcoolică, fermentare acetică, substrat, vin.

## CONȚINUTUL TEZEI

### 1. ASPECTE FIZICO-CHIMICE ȘI MICROBIOLOGICE ALE OȚETULUI DIN VIN

Primul capitol reprezintă analiză comparativă succintă a situației existente în domeniu, a materialelor științifice referitoare la procesul de fermentare acetică și la procedeele biotehnologice lente și rapide de obținere a acidului acetic.

Studiul bibliografic realizat cu privire la aspectele fizico-chimice și microbiologice ale obținerii oțetului din vin a permis formularea următoarelor concluzii:

- În RM, oțetul se obține prin diluarea alcoolului etilic și fermentarea acestuia. Produsul obținut este lipsit de macro-, micronutrimente și nu posedă o valoare nutritivă importantă. Astfel, acest produs poate fi recomandat doar pentru utilizare industrială.

- Oțetul natural datorită proceselor metabolice cauzate de bacteriile acetice, este bogat în minerale, oligoelemente, acizi organici ș.a. Valoarea nutritivă importantă contribuie ca oțetul natural să fie solicitat în creștere de către consumatori în scopul utilizării în alimentația sănătoasă cât și de agenți economici pentru utilizare industrială în fabricarea produselor organice.

- Fabricarea oțetului din vin în mod natural cu utilizarea substratului caracteristic RM prezintă una din problemele de bază a întreprinderilor și cercetătorilor din domeniului.

- Conform studiilor realizate, un rol important în fabricarea oțetului natural îl au bacteriile acetice, care prin activitatea lor vitală asigură proprietăți specifice produsului finit. În scopul dirijării proceselor biochimice și obținere oțetului natural cu proprietăți organoleptice superioare se folosesc culturi pure ce asigură un efect dublu- tehnologic și igienic. Valorificarea tulpinilor de bacterii acetice izolate din habitatul lor natural permit selectarea microorganismelor adaptate la calitatea materiilor prime și au proprietăți biotehnologice sporite, sigure și stabile. Acest fapt permite obținerea oțetului natural de o calitate înaltă.

- Optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin prin fermentarea naturală cu utilizarea tulpinilor izolate din materii prime accesibile, dezvoltate pe substrat natural reprezintă o posibilitate eficientă de valorificare a vinurilor de o calitate medie sau slab competitive pe piața.

Cercetările științifice realizate în prezent au permis formularea **problemei de cercetare** ce constă în dezvoltarea și fundamentarea științifică a regimurilor biotehnologice de obținere a oțetului din vin prin fermentarea naturală cu utilizarea tulpinii izolate din materii prime autohtone, dezvoltată pe substrat natural.



## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Studiul realizat s-a efectuat în cadrul laboratoarelor științifice ale facultății Tehnologia Alimentelor (Universitatea Tehnică a Moldovei), precum și în condiții industriale la întreprinderea de profil SRL „V.DEVELOP”.

Pentru izolarea bacteriilor acetice a fost utilizată materia vitivinicolă autohtonă: struguri albi și vin alb din soi Noah anul recoltei 2019; oțet din struguri albi Noah obținut în laborator și oțet din vin alb, netratat din comerț. Pentru examenele microbiologice și izolarea bacteriilor acetice au fost folosite medii uzuale și speciale ca: RAE, GYC și Hoyer, preparate de Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al Republicii Moldova.

Pentru identificarea și detectarea bacteriilor izolate, au fost folosite diverse teste biochimice, cum ar fi: colorarea Gram, testul catalazei, testul KOH. Amplificarea genică s-a efectuat cu ajutorul Real-Time PCR CFX96 Deep Well (Bio-Rad, USA). Experimentul a fost efectuat pe fiecare tulpină izolată în parte, pe mediu de cultura RAE. Pentru identificarea bacteriilor acetice s-a folosit kitul ”For everyone Detection Kit B Acetics Screening”( PIKA Weihenstephan GmbH, Germany). Reacția extragerii și detectării ADN bacteriilor acetice a fost efectuată conform protocolului producătorului [14]. La configurarea amplificatorului a fost ales ca detectorii undele FAM - ce au o emisie de 520 nm și HEX -550 nm.

Materie primă principală utilizată la optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului a fost concentrat de struguri KINETA cu concentrație de zahar 65% de la producător autohton. Pentru a realiza fermentația alcoolică a fost utilizate levuri ENARTIS FERM SC, în calitate de nutrimente pentru activarea procesului au fost utilizate NUTRIFERM SPECIAL și NUTRIFERM ADVANCED, țara producător Italia.

Linia biotehnologică pentru fabricarea oțetului a fost realizată pentru întreprinderea SRL ”V. DEVELOP” de către compania autohtonă SRL ”URI ENGINEERING”, echipamentul este montat conform proiectelor și standardelor companiei austriece VOGELBUSCH. Pentru limpezirea oțetului s-au utilizat agenții: Maxibent P (bentonită sodică activată); Maxibent G (bentonită sodică); Gelatina Vinigel ORO; PVVIN (polivinilpirolidona) și bentonită POLVERE Oro.

Pentru elaborarea băuturilor nealcoolice cu oțet din vin alb s-a utilizat materia primă de bază și auxiliară: prune (*Prúnus doméstica*); piersici (*Prúnus pérsica*); mere (*Malus domestica Jonathan*); căpșună (*Fragária ananássa*); zmeură (*Rúbus idéus rubin*); levănțică (*Lavandula L.*); mentă verdeață (*Mentha L.*); busuioc verdeață (*Ocimum L.*); scorțișoară; vanilie; zahar-tos; oțet din vin alb produs în cadrul cercetării.

Cercetările realizate au necesitat și o serie de reactivi chimici și materiale de laborator care au fost de calitate și corespundeau unui grad de puritate analitică, procurate de la furnizorul local "Ecochimie" SRL.

A fost efectuată analiza multifactorială ANOVA (Two-way ANOVA) cu tehnici de comparație multiplă, care a permis evidențierea probelor ce diferă de valorile medii. Pentru stabilirea gradului de corelare dintre datele obținute pentru pH, aciditatea totală titrabilă și densitatea față de timpul de fermentare, s-a folosit testul exact Fisher. Acesta a fost efectuat automat, folosind pachetul software XLSTAT (Addinsoft, Paris, Franța). Toate experimentele au fost realizate în duplicate sau triplicate. Pragul semnificației statistice ales:  $p \leq 0,05$ .

### 3. SELECTAREA TULPINILOR DE BACTERII ACETICE DIN MATERII PRIME AUTOHTONE

Izolarea unei culturi de bacterii acetice pure a parcurs în 3 etape:

**Etapa 1** - studiul microflorei inițiale a materialelor selectate, folosind medii nutritive selective; detectarea și izolarea bacteriilor acetice din acestea.

**Etapa 2** - tulpina selectată de bacterii acetice a fost expusă analizei morfologice, fiziologice și biochimice.

**Etapa 3** - confirmarea apartenenței bacteriilor izolate la genul *Acetobacter* prin compararea ADN al bacteriilor acetice obținute, folosind metoda RT-PCR.

#### 3.1. Izolarea culturilor pure de bacterii acetice

S-a constatat că ciorchinele de struguri au o microfloră bogată și diversă ceea ce complică procesul de izolare a bacteriilor acetice. Vinul, de asemenea, nu este o sursă perfectă de bacterii acetice, deoarece prezența acestora a fost în cantități foarte mici pe un unul (GYC) din cele trei medii. În baza caracteristicilor morfologice ale celulelor, bacteriile izolate pot fi atribuite genului *Acetobacter*. Se presupune că prezența unui număr mare de alte microorganisme în vin împiedică dezvoltarea lor normală. Vinul cu aciditatea sporită este o sursă mai potrivită de bacterii acetice, deoarece numărul lor domină. Pe toate cele trei medii nutritive au crescut specii diferite de colonii, dintre care două tulpini, conform morfologiei celulare, pot fi atribuite la bacteriile acetice.



**Fig. 1. Identificarea coloniilor pe mediu GYC prin zone limpede**

Din oțetul nefiltrat și nepasteurizat din comerț, a fost izolat un număr mic de microorganisme. Se presupune că la sfârșitul fermentării, bacteriile acetice își pierd activitatea sub influența lipsei de alcool. Cu toate acestea, oțetul a fost supus și procesului de filtrare. Din coloniile de microorganisme din oțetul din vin obținut în condiții de laborator au fost izolate bacterii acetice pe două medii nutritive (RAE, GYC).

### 3.2. Caracteristicile morfologice și fiziologice ale tulpinilor izolate

La studierea coloniilor cultivate pe mediul GYC, se pot observa în jurul coloniilor hălosuri caracteristice și transparente. Aceasta este caracteristic bacteriilor acetice, deoarece unele dintre ele consumă calciu în timpul ciclului de viață, iar acest element este unul dintre ingredientele mediului nutritiv GYC (fig.1). În urma microscopiei bacteriilor acetice izolate s-a confirmat apartenența lor la genul *Acetobacter*. Acest fapt este confirmat de caracteristicile lor morfologice (bastoane mici și mijlocii).

### 3.3. Detectarea și identificarea tulpinilor izolate

Pentru a studia capacitatea bacteriilor acetice izolate de a fermenta alcoolul etilic până în acid acetic, s-a decis introducerea acestora în câteva substraturi de vin. În timpul fermentării, la a 3-a zi pe suprafața lichidului a apărut un film turbure, dislocându-se pe perete (fig. 2). Aceasta denotă că bacteriile acetice sunt suficient de active.



**Fig. 2. Pelicula bacteriană**

Următoarea etapă a fost identificarea bacteriilor acetice, folosind diverse teste biochimice. Primul test identifică enzima catalaza, care este o componentă a bacteriilor producătoarelor de acid acetic. Rezultatul pozitiv confirmă natura microorganismelor și apartenența lor la bacteriile din genul *Acetobacter*. Testul KOH și colorația Gram oferă informații despre fiziologia celulelor, și anume, structura peretelui celular. Rezultatele testelor sunt inserate în tabelul 1.

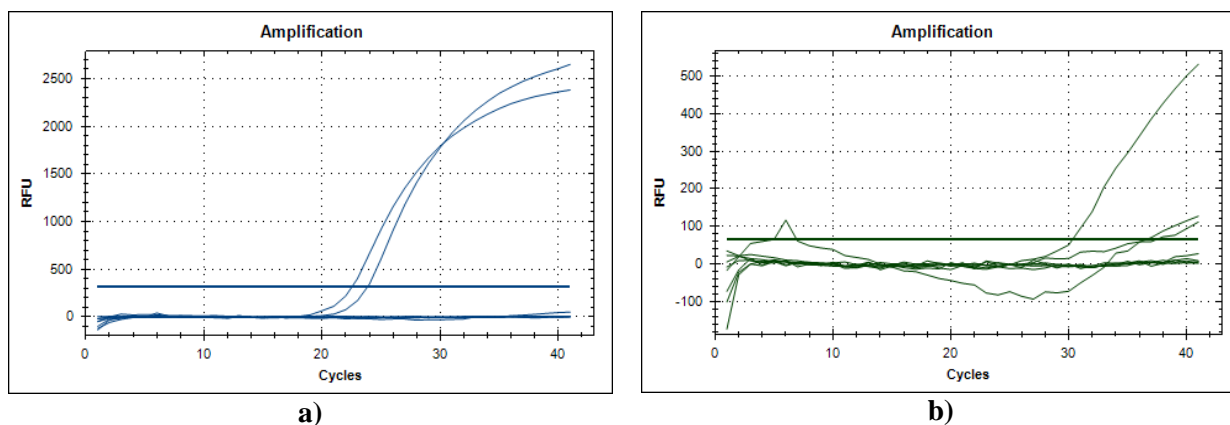
**Tabelul 1. Reacții calitative de identificare a bacteriilor izolate**

Nr	Sursa de bacterii	Colorarea Gram	Test KOH	Testul la catalază
1	<i>Vin alb cu aciditatea sporită</i>	-	-	-
2	<i>Oțet obținut în laborator</i>	-	++	+

**Notă.** “++” – reacția intensiv pozitivă, “+” - reacția pozitivă, “-” - reacția negativă

S-a constatat că bacteriile izolate din vin alb cu aciditate sporită pe mediul RAE îndeplinesc o singură cerință cu referire la colorarea Gram. Astfel s-a constatat că bacteriile aflate în studiu sunt Gram<sup>-</sup>. Determinarea calitativă a activității catalazei a dat rezultat negativ. La fel și testul interacțiunii cu KOH a fost negativ. Aceste răspunsuri pot avea două motive: culturile și-au pierdut activitatea pe parcursul realizării etapelor cercetării sau nu fac parte din familia *Acetobacter*.

Două probe cu bacterii au fost supuse amplificării, pentru a putea confirma cu siguranță apartenența bacteriilor izolate la genul *Acetobacter*. S-au analizat următoarele probe: ADN purificat direct din oțet fiind în procesul de fermentare și ADN purificat din coloniile inoculate din acest oțet pe mediu RAE, folosind amestecul enzimatic inclus în kit. Rezultatele acestei analize sunt prezentate în figura 3a. și 3b.



**Fig. 3. Amplificarea ADN al bacteriilor acetice pe canalul FAM (a) și HEX (b)**

ADN purificat din coloniile bacteriene cultivate pe mediul RAE au prezentat amplificarea pozitivă. Cele trei curbe care traversează linia de bază reprezintă diagramele de amplificare ale eșantionului de control negativ (din kitul de referință) și ADN izolat din coloniile bacteriene care au dat semnalul pozitiv pe HEX.

S-a constatat, că din toate probele care au fost simultan amplificate, numai bacteriile izolate din oțetul netratat, cultivate pe mediul RAE au manifestat o reacție pozitivă, ceea ce confirmă apartenența la genul *Acetobacter*. În pofida faptului că o probă a fost prelevată din oțet în perioada de fermentare, selectată în faza exponențială de creștere nu a dat un rezultat pozitiv. În final, putem concluziona, în primul rând - că bacteriile izolate din oțetul netratat aparțin cu siguranța genului *Acetobacter*; în al doilea rând - utilizarea oțetului în faza acumulării maxime de microorganisme active, nu asigură detectarea prin RT-PCR a bacteriilor acetice [15].

#### 4. OPTIMIZAREA TEHNOLOGIEI DE OBTINERE A OȚETULUI DIN VIN

##### 4.1. Obținerea oțetului din suc concentrat

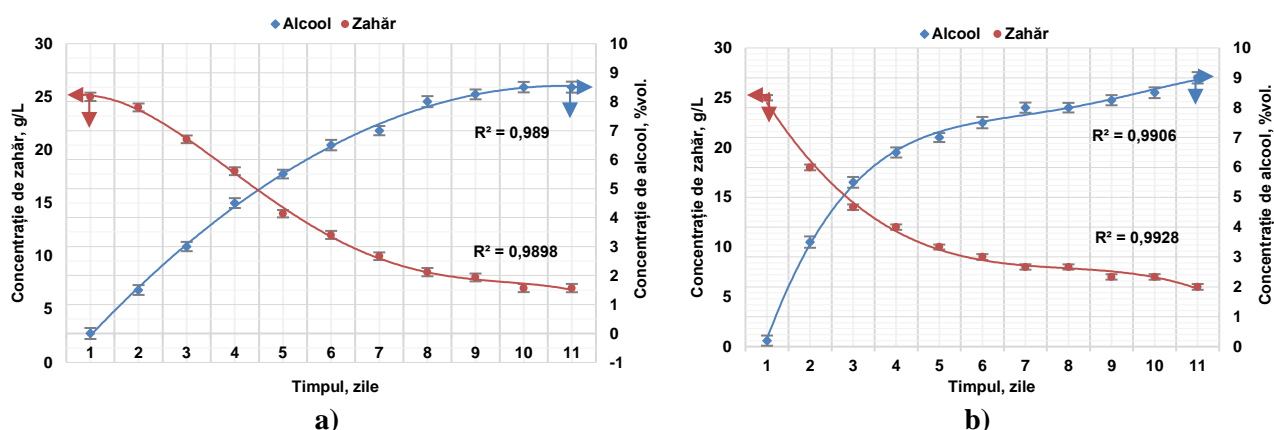
Partea experimentală a fost axată pe studiul proceselor de fermentare alcoolică a sucurilor de struguri până în vin, respectiv, și fermentarea acetică ulterioară a vinului până la obținerea oțetului. A fost utilizat suc concentrat din struguri albi, caracteristicile cărui sunt inserate în tabelul 2. Calitatea sucului concentrat a fost în corespundere cu norme prevăzute în reglementările tehnice HG nr. 1111 [16].

**Tabelul 2. Caracteristica concentratului din struguri albi\***

Indici de calitate	Concentrat de struguri KINETA
Compoziția: ingredientele de bază	100% suc de struguri albi
Descrierea fizică	Vâscoasă, culoarea galben-închisă
Caracteristicile fizico-chimice	Brix <sup>0</sup> -65; pH - 2,57; Densitatea-1260 kg/m <sup>3</sup> la T=20°C
Caracteristica organoleptică	Gustul, aroma specifice sucului de struguri
Termenul de valabilitate	12 luni la temperatura 10-15°C

\*Elaborat de autor pe baza datelor producătorului S.A. "ALFA-NISTRU".

Fermentarea alcoolică a sucurilor a fost realizată după diluarea lor cu apă potabilă până la concentrația de zahăr 25g/L cu utilizarea levurilor ENARATIS FERM SC (0,3 g levuri/L de suc) cu/și fără adaos de nutrimente (activatori compleți ai fermentării alcoolice) în mediul de fermentare: NUTRIFERM SPECIAL 35 g/hL la începutul fermentării și NUTRIFERM ADVANCE 30 g/hL la mijlocul procesului de fermentare. Evoluția conținutului de zahăr și alcool etilic pe parcursul fermentării alcoolice a sucului de struguri cu/și fără adaos de nutrimente este prezentată în figura 4a. și 4b.



**Fig. 4. Evoluția conținutului de zahăr și alcool pe parcursul fermentării alcoolice a sucului de struguri fără adaos (a) și cu adaos de nutrimente (b). Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard;  $p \leq 0,05$**

Parametrii fizico-chimici ai produselor rezultate din fermentarea alcoolică a sucurilor de struguri sunt incluși în tabelul 3.

**Tabelul 3. Parametrii fizico-chimici ai produselor rezultate din fermentarea alcoolică\***

Nr. d/o	Indici	Valori după fermentarea alcoolică	
		fără nutrimente	cu nutrimente
1	pH	3,20 $\pm$ 0,05	3,13 $\pm$ 0,05
2	Concentrație zahăr, g/L	7,0 $\pm$ 0,1	6,0 $\pm$ 0,1
3	Alcool, %vol.	8,5 $\pm$ 0,4	9,0 $\pm$ 0,5
4	Densitatea, kg/m <sup>3</sup>	1025 $\pm$ 10	1005 $\pm$ 10

\*Elaborat de autor, iar rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard;  $p < 0,05$ .

Procesul de fermentare acetică a produselor rezultate din fermentarea alcoolică include următoarele etape principale:

- prepararea vinului pentru obținerea oțetului cu aciditate dorită;
- oxidarea acetică propriu-zisă a alcoolului și obținerea oțetului.

Desfășurarea procesului de oxidare acetică a fost urmărită prin determinarea conținutului de acid acetic format și a alcoolului etilic rezidual din maia. Parametrii controlați, care au determinat desfășurarea în condiții optime a procesului de oxidare acetică sub acțiunea bacteriilor acetice, au fost următorii:

- cantitatea de aer care asigură viabilitatea și multiplicarea bacteriilor și implicit oxidarea alcoolului în acid acetic (valoarea optimă fiind de cca 5 litri aer/litru);
- aerarea constantă și neîntreruptă;

- temperatura de  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  - această valoare a fost constantă, deoarece variațiile ei împiedică activitatea bacteriilor;

- pentru a accelera procesul, au fost utilizate următoarele substanțe nutritive: sulfatul de amoniu  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,135 g/L, zaharoza  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ -2,7 g/L, carbonatul de potasiu  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -0,005 g/L.

Evoluția procesului de fermentare acetică a fost urmărită după aciditate totală și pH al mediului de fermentare. Evoluția acestor parametre pe parcursul fermentării acetice a probelor cu și fără adaos de nutrimente este reprezentată în figura 5a. și 5b.

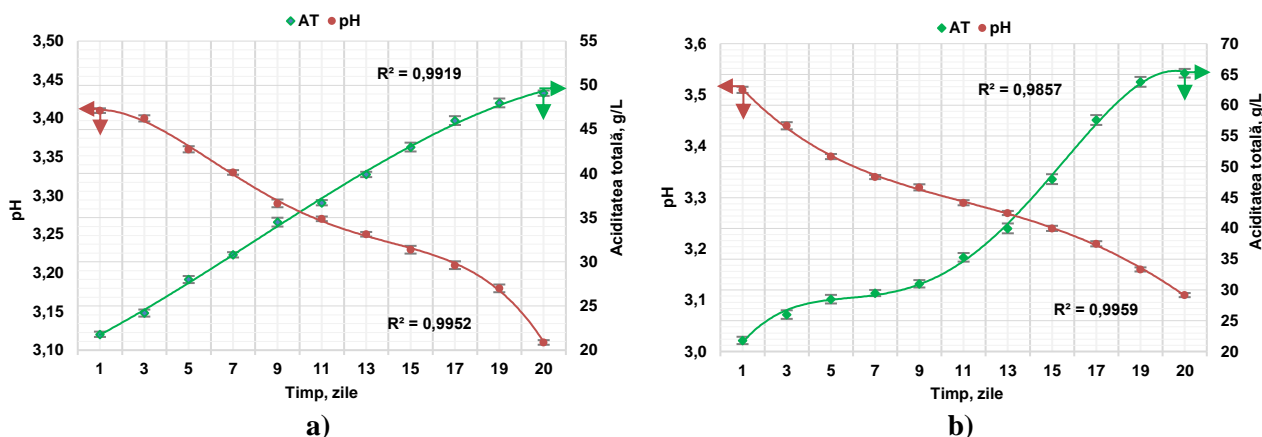


Fig. 5. Evoluția AT și pH pe parcursul fermentării acetice a probelor fără adaos (a) și cu adaos de nutrimente (b). Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard;  $p \leq 0,05$

Parametrii fizico-chimici ai produselor rezultate din fermentarea acetică sunt inserați în tabelul 4.

Tabelul 4. Parametrii fizico-chimici ai produselor rezultate din fermentarea acetică\*

Nr. d/o	Indici	Valori după fermentarea acetică	
		fără nutrimente	cu nutrimente
1	Aciditate totală, g acid acetic/L	$49,1\pm 0,6$	$65,0\pm 0,3$
2	pH	$3,11\pm 0,05$	$3,10\pm 0,04$
3	Densitate, $\text{kg}/\text{m}^3$	$1040\pm 15$	$1042\pm 20$

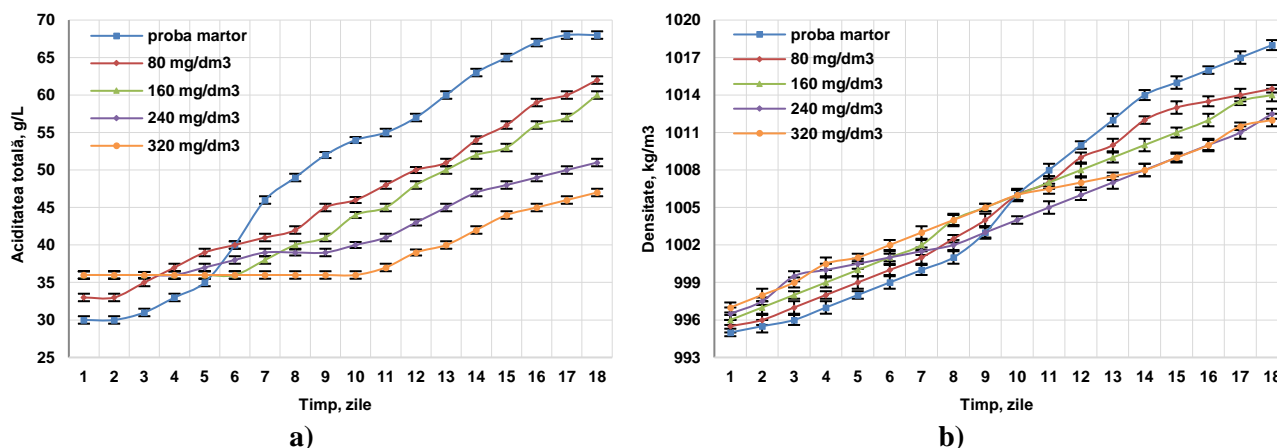
\*Elaborat de autor, iar rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard.

În urma obținerii oțetului din suc concentrat de struguri albi s-a constatat că nutrimentele nu joacă un rol important în procesul de fermentare alcoolică, deoarece diferența între probe a conținutului alcoolului este doar de 0,5%. Totodată, la fermentarea acetică s-a înregistrat cu 33% mai mult de acid acetic în proba cu nutrimente comparativ cu martorul. Pentru sporirea fermentării acetice în condiții industriale, la obținerea oțetului din concentrat de struguri albi recomandăm utilizarea nutrimenților în cantități de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,135g,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -0,005g și zaharozei  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  - 2,7g.

## 4.2. Impactul dioxidului de sulf

Actualmente dioxid de sulf este unul din mijloacele cele mai sigure și imediate cu care se poate acționa în vederea conservării vinului. Prin urmare adăugarea  $\text{SO}_2$  inhibă dezvoltarea bacteriilor acetice și respectiv blochează producția oțetului [17].

S-a cercetat influența dozei de dioxid de sulf, care a variat de la 80 până la 320 mg/dm<sup>3</sup> SO<sub>2</sub>, asupra procesului de fermentare acetică a vinului alb și modificările valorilor pH, densității și acidității totale. În figura 6 a și b, sunt prezentate modificările AT și densității pe parcursul fermentării acetice.

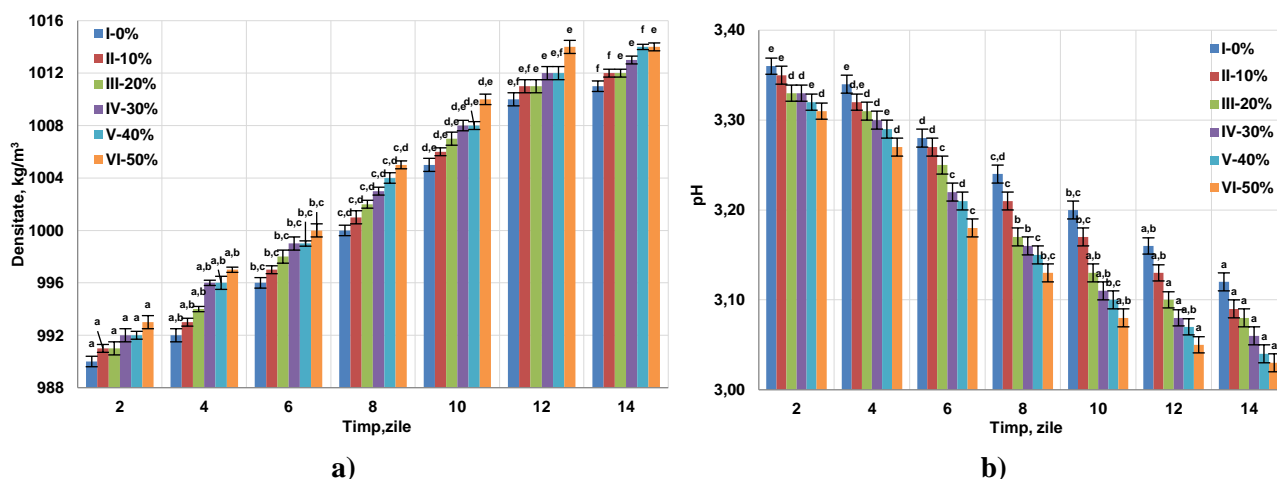


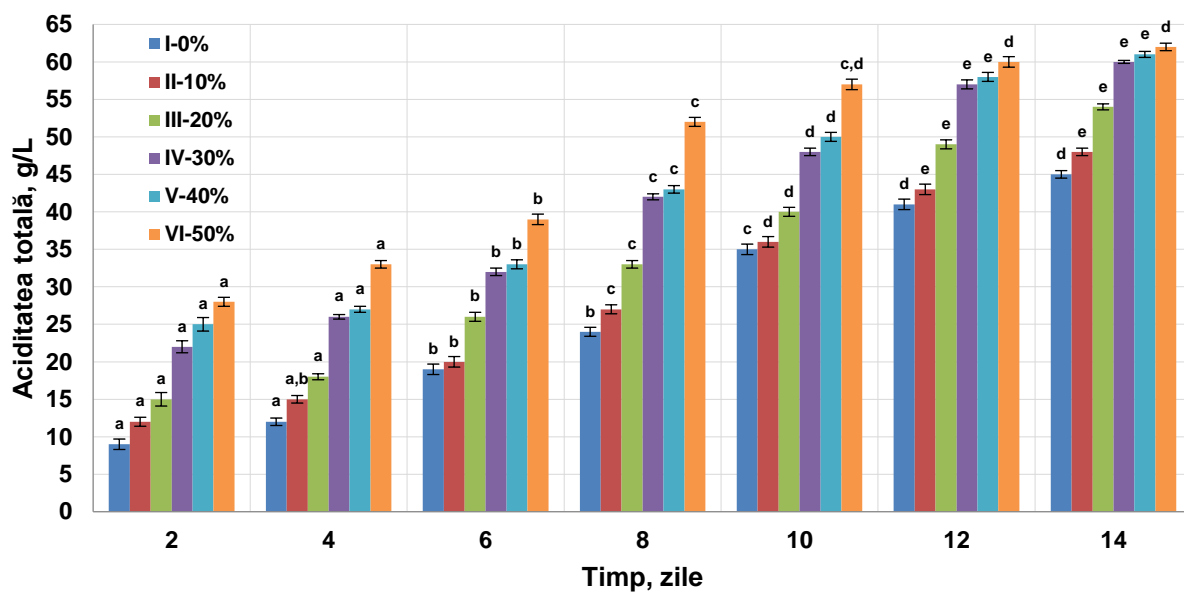
**Fig. 6. Evoluția AT (a) și densității (b) vinului cu diferite concentrații SO<sub>2</sub> pe parcursul fermentării acetice. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard;  $p \leq 0,05$**

Odată cu mărirea dozei de SO<sub>2</sub> se observă o stopare a procesului de fermentare acetică. De exemplu, la proba cu doza de SO<sub>2</sub> 320 mg/dm<sup>3</sup>, valoarea inițială a acidității se menține până în a 10-a zi, apoi crește neesențial. Creșterea valorii acidității totale este doar de 11 g/L, care este de două ori mai mică comparativ cu proba II (doza de SO<sub>2</sub> 80 mg/dm<sup>3</sup>). Totuși, pe parcursul celor 18 zile, pentru proba martor procesul a decurs foarte activ, valoarea acidității totale crescând de la 30 g/L până la 68 g/L, ceea ce este de 2 ori mai mult. Valorile admisibile a conținutului de acid cetic (minimul de 60g/L) se atestă la a 13-a zi [18].

### 4.3. Stabilirea dozei optime de cultura starter

A fost analizate modificările parametrilor fizico-chimici (AT, pH, densitate) în timpul procesului de fermentare acetică a vinului alb cu diferite cantități de cultură starter (figura 7), care a variat de la 10% până la 50% maia din oțet din vin alb obținut din soiul Noah.





c)

**Fig. 7. Evoluția densității (a), pH (b) și AT (c) a probelor cu diferite cantități de maia (oțet din vin alb nefiltrat) pe parcursul fermentării acetică. Litere diferite a-f indică diferențe semnificative între eșantioane ( $p < 0,05$ ).**

Din figura 7c. se observă că proba martor (fără adăugarea de maia) AT minimală nu a fost atinsă pe parcursul fermentării a 14 zile. AT de 60g/L (minimă necesară pentru oțet) a fost atinsă în proba cu 50% maia în 12-a zi, iar în probele cu 30 și 40% maia a fost atinsă în a 14-a zi. Aceasta confirmă că oțetul studiat are o valoare medie de acid acetic și poate fi utilizat în industria alimentară, conform documentelor normative [18, 19, 20].

Astfel, putem concluziona că atât în proba cu un conținut ridicat de acid acetic, cât și în cea cu un conținut scăzut a avut loc procesul de fermentare acetică calitativă cu atingerea valorii minime de acid acetic de 60 g/L a avut loc la probele la adăugarea maiei cu 30, 40 și 50%.

#### 4.4. Influența diferitor tipuri de substrat

În cadrul cercetărilor au fost alese următoarele substraturi din materii prime autohtone considerate deșeuri din industria agroalimentară:

1. Așchii de lemn de măr - AM (*Malus domestica*) mărimea 6x12x3 mm. Producător Smart Energy Solutions SRL.
2. Coajă de nuci grecești - CN (*Juglans regia L.*) recoltate în anul 2019, cu mărimea ce nu trec prin sita metalică cu diametrul găurilor 4 mm.
3. Coajă de alune – CA (*Corylus avellana*) recoltate în anul 2019, cu mărimea ce nu trec prin sita metalică cu diametrul găurilor 4 mm.
4. Tescovină din soiul de struguri -TM (*Vitis vinifera Muscat*) în forma uscată, roada anului 2020, raionul Cimișlia, vinăria Javgur.



Utilizarea diverselor materiale de substrat, cu excepția tescovinei, a fost supusă prelucrării primare care a constat în următoarele:

1. Spălarea sub jet de apă la temperatura  $80\pm 1^{\circ}\text{C}$ , timp de 10 minute.
2. Uscarea în etuvă la temperatura  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 48 de ore.
3. Maturarea cu maia (oțet din vin alb nefiltrat) timp de 72 de ore, în raport de 1:4.

Tescovina a fost supusă procedurii de uscare în etuvă la  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ , timp de 5-6 zile până când nivelul umidității a atins cota de  $9\pm 1\%$ . Apoi a fost supusă procesului de maturare prezentat mai sus în punctul 3.

Înainte de a utiliza substratul, ca sursă de suprafață pentru dezvoltare a bacteriilor acetice, fiecare tip de substrat a fost introdus în maia, care a constat din oțet netratat în raportul 1:4 (50 g de substrat și 200 mL de maia). Probele au fost menținute timp de 72 ore, la temperatura de  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  (tabelul 5).

**Tabelul 5. Evoluția volumului probelor cu diferite substraturi\***

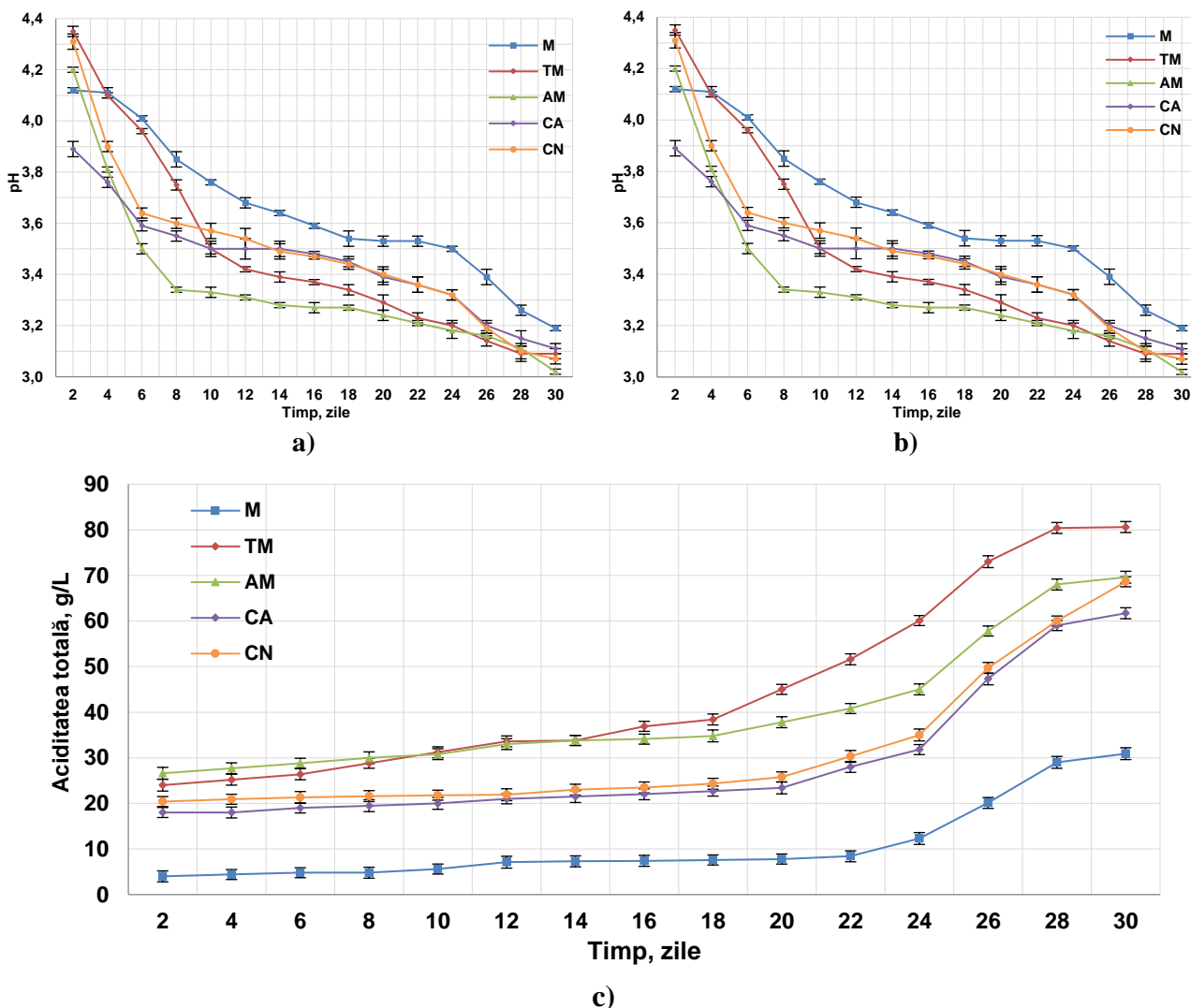
Tipul de substrat	Raport maia:substrat, mL/g	V <sub>inițial</sub> , mL	Volu m după 72 h, mL	Diferența volumului, mL
Coajă de nucă	200:50	250	234,30 $\pm$ 1,33	-15,60 $\pm$ 0,86
Coajă de alune	200:50	250	234,33 $\pm$ 0,67	-15,66 $\pm$ 0,34
Așchii de mar	200:50	250	240,16 $\pm$ 0,83	-9,83 $\pm$ 0,53
Tescovina Muscat	200:50	250	255,13 $\pm$ 0,24	+5,13 $\pm$ 0,24

*\*Elaborat de autor, iar rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard.*

Din tabelul 5 se observă că volumul oțetului cu coaja de nucă și de alune a scăzut cu 16 mL, iar la așchiile de măr doar cu 10 mL. Această diferență se datorează proprietăților de absorbție ale cojii. În cazul substratului din tescovină, rezultatul a fost opus, după 72 ore acest volum s-a mărit cu 5 mL. Faptul se datorează conținutului în compoziția acestuia a celulozei și fibrelor solubile.

A fost investiga numărul de bacterii acetice din maiaua utilizată, înainte și după macerare, pentru a confirma necesitatea plantării și dezvoltarea acesteea pe substrat. Au fost încercată posibilitatea utilizării așchiilor de lemn de măr, care sunt cunoscute ca un substrat eficient pentru dezvoltarea bacteriilor acetice. Ele au fost macerate în maia timp de 72 de ore, în raport de 1:4. Conform datelor obținute, se confirmă faptul că după plasarea pe suprafața substratului, bacteriile acetice să dezvoltă intens și peste 3 zile numărul lor este mai mare comparativ cu cantitatea inițială.

Deoarece procesul de fermentare acetică prin metoda clasică are loc lent, scopul utilizării substratului este de a mări viteza fermentării acetice. Evoluția parametrilor fizico-chimici a oțetului este prezentată în figura 8.



**Fig. 8. Evoluția densității (a), pH (b) și AT (c) a probelor cu substrat: M - fără substrat, martor; TM - tescovină de muscat; AM - așchii din lemn de măr; CN - coajă de nucă; CA - coajă de alune. Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard;  $p \leq 0,05$**

Se constată că substratul joacă un rol semnificativ în procesul de fermentare acetică. Astfel, în proba cu așchii de lemn de măr acest proces evoluează mai rapid, deoarece comparativ cu celelalte probe, structura așchiilor permite o mai bună aderare a bacteriilor acetice pe suprafața lor, măbind probabilitatea de obținere a oțetului într-un timp mai scurt. Utilizarea substarelor au sporit mărirea acidității totale a oțetului obținut de circa 2 ori timp de 30 zile. Este de menționat faptul că coaja de nucă în egală măsură cu așchiile de măr au influențat pozitiv acumularea acidului acetic în produsul finit.

Au fost apreciate modificările cromatice a oțetului în dependența de substrat, după diferența de culoare dintre proba de control (M) și cele cu diferit substrat. Conform parametrilor cromatici inserați în tabelul 6 se indică modificarea intensității ( $I_c$ ) și a nuanței culorii ( $N_c$ ) la toate probele, dar cea mai mare modificare  $I_c$  are loc la proba CN, care a crescut de 30 ori în comparație cu martorul. La finele perioadei de fermentare  $N_c$  o avut valoarea maximală de 2,59 la proba cu așchii de măr.

**Tabelul 6. Parametrii cromatici ai probelor cu diferite tipuri de substrat\***

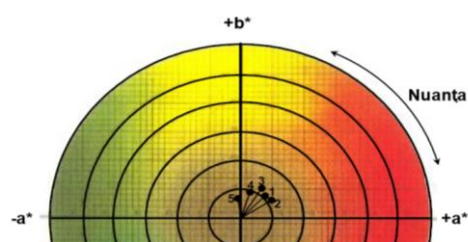
Sample	L*	a*	b*	$\Delta E^*$	C*	H°	Ic	Nc
<i>M</i>	17,07±0,10	6,55±0,12	10,57±0,15	-	12,43±0,05	58,21±0,11	0,69±0,07	1,96±0,10
<i>TM</i>	18,83±0,05	7,29±0,01	11,61±0,04	2,17±0,04	13,71±0,01	57,88±0,13	1,48±0,20	1,94±0,18
<i>AM</i>	30,51±0,04	6,54±0,02	29,79±0,04	23,45±0,03	29,60±0,01	77,24±0,08	1,67±0,53	2,59±0,46
<i>CA</i>	40,45±0,03	-0,56±0,05	16,55±0,04	25,15±0,02	16,56±0,02	91,94±0,05	1,55±0,36	1,65±0,67
<i>CN</i>	37,51±0,31	2,69±0,02	27,64±0,10	26,90±0,23	27,77±0,01	84,44±0,14	20,70±0,29	1,68±0,32

\*Rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard;  $p \leq 0,05$ .

Datele din tabelul 6 au demonstrat că în probele AM, CA și CN valorile luminozității sunt cele mai ridicate, 30,51, 40,45 și 37,51 în care predomină culoarea albă, iar în cazul probelor M și TM valorile L\* sunt mai mici, constituind 17,07 și 18,83 respectiv. Reprezentarea culorilor probelor de oțet obținut conform sistemului CIELab atestă că predomină tonalitatea culorii galbene (figura 9). Datele pentru parametrul a\* la majoritatea probelor sunt pozitive, ceea ce denotă prezența pigmentelor de culoare roșie. În cazul probei CA, componenta a\* a fost deplasată spre culoarea verde. Valoarea a\* negativă -0,56 indică prezența nesemnificativă a pigmentilor de culoare verde (clorofilă).

Rezultatele indică cea mai mare modificare în proba cu coajă de nucă în raport cu martorul, unde valoarea L\* crește de circa 2 ori, componenta a\* își modifică valorile de la 6,55 la 2,69, iar valoarea b\* se dublează. Valoarea  $\Delta E^*$  demonstrează modificarea pentru proba TM a culorii este neînsemnată în raport cu martorul (2,17). În proba CN valoarea  $\Delta E^*$  denotă modificări importante a culorii (26,90).

De asemenea, probele AM și CN au culoarea mai intensă, deoarece valorile cromaticității C\* se află mai departe de originea sistemului de coordonate, constituind 29,60 și 27,77. În cazul probelor M, TM și CA, valorile C\* sunt 12,43, 13,71 și 16,56 respectiv, demonstrând că intensitatea culorii este redusă din cauza prezenței nuanțelor de culoare gri. Valorile unghiului de nuanțe H\* denotă că probele M și TM se află în cadranul I trigonometric (58,21° și 57,88°), în care predomină culoarea portocalie, iar probele AM, CA și CN sunt în cadranul II trigonometric, valorile fiind 77,24°, 91,94° și 84,44° respectiv, în care culoarea galbenă este dominantă (figura 9).



**Fig. 9. Reprezentarea culorilor probelor conform sistemului CIELab: 1- M; 2- TM; 3-AM; 4-CA; 5-CN**

#### 4.5. Finisarea oțetului cu diferiți agenți de limpezire

Oțetul limpezit evoluează normal și își menține calitatea constantă timp îndelungat, având un buchet și aromă mai fină în comparație cu cel tulbure [21]. Din aceste considerente, a fost studiat procesul de limpezire a oțetului din vin cu cinci tipuri de agenți, care se găsesc pe piața RM.

Recomandările industriale susțin că dozele de bentonită întrebuintate trebuie să se afle în limitele 30-80g/hL. Ținând cont de recomandările producătorului de utilizare ale agenților de limpezire

selectați au fost utilizate concentrațiile de 1,5g/L, 2,5 g/L, 3,5g/L, 5g/L și 7,5 g/L. Capacitatea de limpezire a diferitor agenți a fost determinată prin citirea absorbției la spectrofotometrul la lungimea de undă de 420 nm (fig. 10).

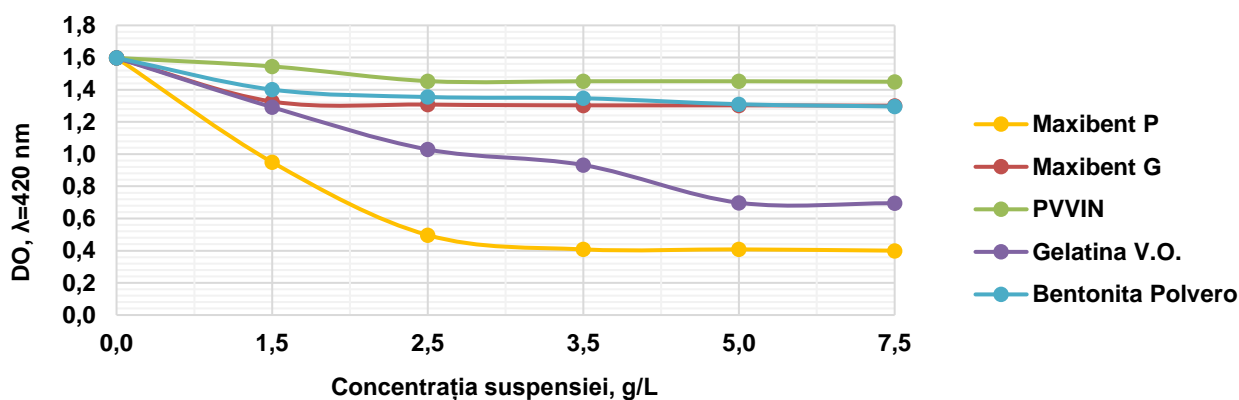


Fig. 10. Influența concentrației agenților de limpezire asupra densității optice a oțetului

Din analiza datelor prezentate în figura 14, se observă că pentru majoritatea agenților efectul asupra densității optice a oțetului se manifestă începând cu concentrația suspensiei de 1,5 g/L, după care absorbția continuă, dar decurge mai lent. Cele mai pronunțate efecte de limpezire asupra oțetului din vin are agentul Maxibent P, urmat de Gelatina V.O.

Pentru cercetările ulterioare, care țin de stabilirea parametrilor tehnologici ai procesului de limpezire (temperatură, durată, regim de centrifugare etc.), au fost selectate concentrațiile agenților de limpezire: Maxibent P - 3,5g/L; Maxibent G - 2,5 g/L; PVVIN -3,5 g/L; Gelatina Vinigel Oro - 5 g/L; Bentonita Polvero - 2,5 g/L.

În continuare, a fost cercetată influența temperaturii asupra gradului de limpezire a oțetului. Astfel, probele de oțet cu necesarul agentului de limpezire (concentrațiile optime au fost menționate mai sus) au fost plasate în spații ce au asigurat regimul de temperatură  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

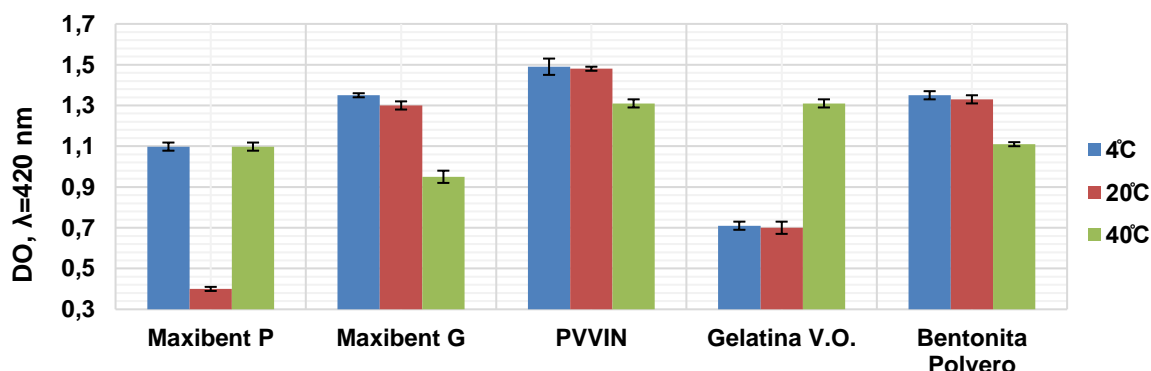


Fig. 11. Influența temperaturii asupra procesului de limpezire

Rezultatele obținute (fig. 11) arată, că cel mai bun comportament l-a manifestat suspensia agentului Maxibent P, urmată de Gelatina V. O. Suspensiile acestor agenți de limpezire au avut cele mai bune rezultate la temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Astfel, în ceea ce privește aspectul economic (crearea

unui anumit regim de temperatură necesită cheltuieli de energie), acești agenți de limpezire vor fi cei mai eficienți. Maxibent P și Gelatina V.O. au capacitatea de a reduce densitatea optică sub valorile lui 1, respectiv atribuind oțetului un grad mai sporit de limpiditate.

Ca parametru tehnologic al procesului de limpezire a oțetului a fost selectată durata contactului oțetului cu suspensia agentului de limpezire. Mostrele de amestec al oțetului cu suspensiile au fost analizate după prima oră de contact, 2 ore, 3 ore și 24 ore. Valorile densității optice pentru perioadele date sunt reprezentate în figura 12.

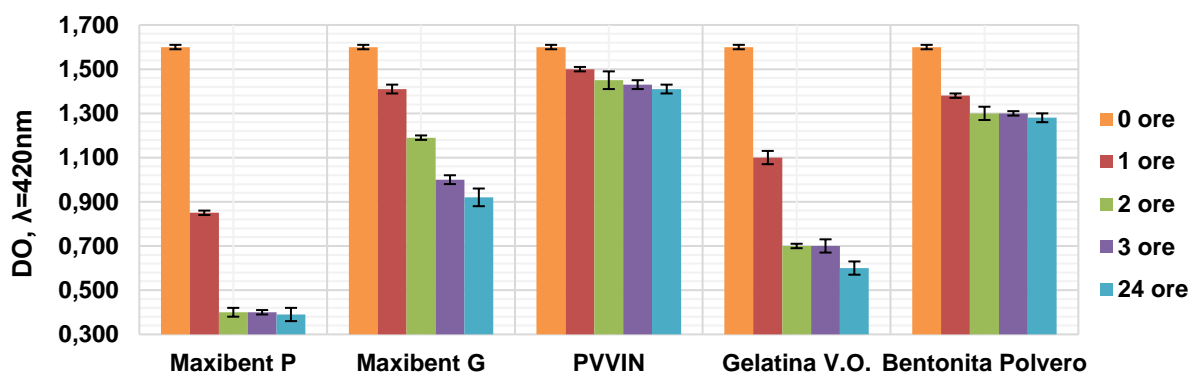


Fig. 12. Influența duratei de contact asupra procesului de limpezire. Rezultatele sunt prezentate ca medie  $\pm$  abatere standard;  $p \leq 0,05$

Datele demonstrează, că contactul dintre oțet și agentul de limpezire se manifestă în primele ore, astfel, pentru Maxibent P și Gelatina V. O., perioada optimă de contact este de 2 ore. După 2 ore densitatea optică are tendință de scădere care decurge lent. În același timp, densitatea optică a oțetului tratat cu Bentonita Polvero, Maxibent G și PVVIN s-a stabilizat după 3 ore. În toate mostrele, perioada de contact de 24 ore nu cauzează modificări esențiale în comparație cu 3 ore de contact.

Rezultatele obținute au demonstrat că cea mai bună proprietate de clarificator a manifestat-o agentul Maxibent P, la care după 2 ore absorbanta a atins valoarea de 0,400, în timp ce cu alți agenți această valoare nu a fost atinsă nici după 24 ore.

Un oțet mai limpede presupune și un grad de puritate mai mare, respectiv, o aciditate mai înaltă și densitate mai mare. Reieșind din aceste considerente, a fost determinată evoluția acestor parametri în dependență de durata tratării oțetului.

Tabelul 7. Modificările pH, AT și densității a oțetului după limpezire în dependență de durata procesului de limpezire\*

Timp	Maxibent P	Maxibent G	PVVIN	Gelatina V Oro	Bentonită Polvero
1	2	3	4	5	6
<b>Valorile pH</b>					
pH <sub>inițial</sub>	2,89 $\pm$ 0,03	2,89 $\pm$ 0,02	2,89 $\pm$ 0,05	2,89 $\pm$ 0,02	2,89 $\pm$ 0,02
1 oră	2,84 $\pm$ 0,02	2,86 $\pm$ 0,07	2,87 $\pm$ 0,02	2,88 $\pm$ 0,01	2,86 $\pm$ 0,04
2 ore	2,80 $\pm$ 0,06	2,84 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,07	2,86 $\pm$ 0,03	2,85 $\pm$ 0,01
3 ore	2,80 $\pm$ 0,07	2,83 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,02	2,84 $\pm$ 0,05	2,84 $\pm$ 0,02

Continuarea tabelului 7.

1	2	3	4	5	6
24 ore	2,79±0,04	2,83±0,01	2,81±0,01	2,84±0,07	2,83±0,03
<b>AT, g acid acetic /L</b>					
A inițială	56,2±0,8	56,2±0,2	56,2±0,9	56,2±0,8	56,2±0,5
1 oră	58,1±0,3	57,4±0,6	57,9±0,4	57,8±0,1	57,5±0,1
2 ore	58,5±0,1	58,2±0,5	58,2±0,7	58,3±0,3	58,2±0,8
3 ore	58,8±0,2	58,4±0,3	58,2±0,6	58,5±0,1	58,4±0,3
24 ore	58,8±0,4	58,5±0,1	58,3±0,3	58,6±0,8	58,5±0,9
<b>Densitate, kg/m<sup>3</sup></b>					
ρ inițială	1020±10	1020±18	1020±12	1020±13	1020±14
1 oră	1024±16	1023±13	1021±11	1022±11	1023±19
2 ore	1027±12	1024±17	1023±11	1023±18	1024±12
3 ore	1027±13	1026±15	1025±13	1023±17	1026±11
24 ore	1027±12	1026±11	1026±15	1024±14	1026±15

\*Elaborat de autor, iar rezultatele sunt prezentate ca medie ± abatere standard.

Din datele inserate în tabelul 7 se observă că relația dintre durata tratamentului oțetului cu agenți de limpezire și parametrii fizico-chimici ai oțetului după limpezire este direct proporțională. Totuși, unii agenți au capacitate mai mare de reducere a pH sau a creșterii densității și acidității oțetului decât alții. În urma tratării oțetului cu Maxibent P s-a obținut cea mai mică valoare a pH (2,79) și, respectiv, aciditatea cea mai înaltă (5,88 g/L). Cele mai mici valori ale acestor parametri s-au înregistrat în cazul tratării oțetului cu PVVIN și Gelatina Vinigel Oro.

Parametrii oțetului obținut au fost comparați cu parametrii din Hotărârea Guvernului Republicii Moldova, nr. 1403 din 09-12-2008, cu privire la aprobarea Reglementării tehnice „Oțeturi și acid acetic de uz alimentar” [18]. Toți parametrii obținuți corespund normelor și abateri nu s-au înregistrat.

#### 4.6. Optimizarea tehnologiei de fabricație a oțetului din vin

În cadrul cercetării a fost:

✓ elaborată instrucțiunea tehnologică IT MD 67-41184408-01:2021 privind fabricarea oțetului din vin, din fructe și din fructe de pădure, conform cerințelor reglementărilor tehnice ”Oțeturi și acid acetic de uz alimentar” aprobate prin HG nr.1403 din 09.12.2008 de către grupul de autori: Gaina B. dr.hab., prof.univ., acad., AȘM; Boiștean A. lec.univ., FTA, UTM și Baci V. conducător SRL”V.DEVELOP”;

✓ efectuate încercări de testare a culturii de bacterii acetice *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01, izolate din strugurii soiului autohton Noah în procesul industrial de fabricare de oțetului din vin în conformitate cu instrucțiunile tehnologice IT MD 67-41184408-01:2021.

✓ aplicată în calitate de prototip schema tehnologica descrisă de Budak și colab. și ulterior optimizată prin înlocuirea substratului, și respectiv, procesele necesare pentru pregătirea acestuia [22]. Schema-bloc optimizată de obținere a oțetului din vin alb este reprezentată în figura 13.

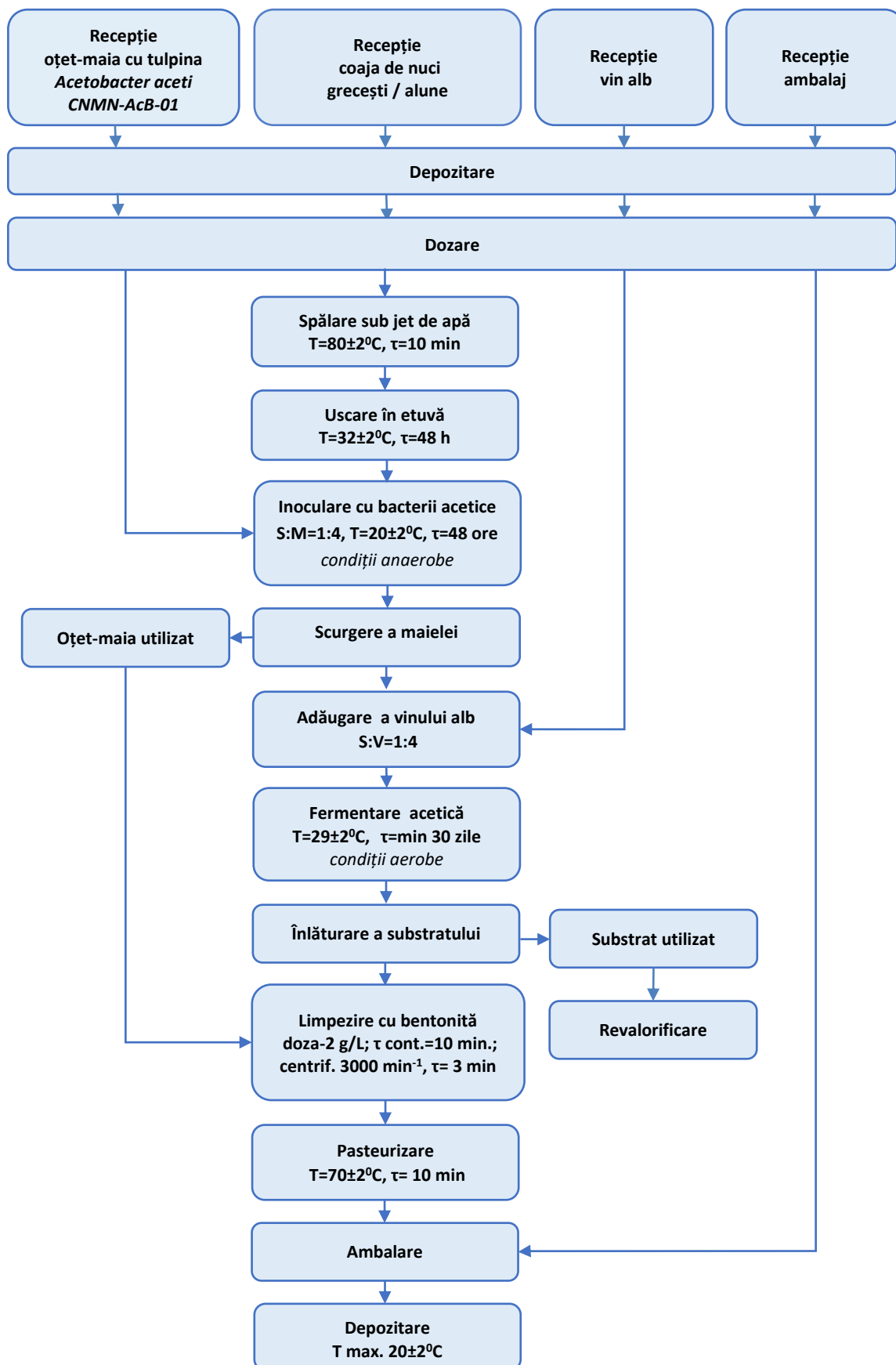


Fig. 13. Schema-bloc optimizată de obținere a oțetului din vin alb

Utilizarea substratului din materia autohtonă (coji de nuci grecești și alune) a condus la dezvoltarea sporită a tulpinei de bacterii *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01, izolate din produse vitivinicole locale, și a contribuit la acumularea acidului acetic într-un timp de 2 ori mai scurt în comparație cu tehnologia de fermentare clasică, ceea ce a condus la optimizarea schemei tehnologice de obținere a oțetului din vin alb.

Tehnologia de obținere a oțetului din vin alb a fost descrisă în brevetul de invenție *Procedeu de obținere a oțetului din vin alb* [22]. Brevetul de invenție de scurtă durată cu nr. MD 1517 Y a fost solicitat de către SRL Fermented fruits care a încheiat cu UTM un contract de licență neexclusivă de folosire a acestuia, în scopul comercializării produsului obținut în urma aplicării procedurii.

## 5. TEHNOLOGIA FABRICĂRII BĂUTURILOR NEALCOOLOCE CU OȚET DIN VIN ALB

În capitolul 5 a fost analizată posibilitatea utilizării oțetului din vin alb la obținerea băuturilor nealcoolice. În cadrul cercetării au fost elaborate rețete a băuturilor nealcoolice care includ adăugarea oțetului obținut prin fermentarea naturală și îndulcirea acestuia cu zahăr. Acidul acetic din oțet acționează în calitate de conservant, astfel încât băutura rămâne delicioasă pe tot parcursul anului, rețetele căror sunt prezentate în tabelul 8.

**Tabelul 8. Rețetele băuturilor nealcoolice elaborate\***

Nr. d/o	Denumirea și codificarea a băuturilor	Raport de ingrediente (pentru 1 litru de băutură finită)					
		fructe/pomușoare, g**	zahar, g	plante aromatice, g	condimente, g	oțet, mL	apă, mL
1	Prune cu levănțica-PrL	200	200	2	-	100	se aduce până la cotă
2	Piersici cu scortșoara-PiS	200	200	-	2	100	
3	Măr cu vanilie-MV	200	200	-	2	100	
4	Zmeură cu mentă-ZM	200	200	10	-	100	
5	Căpșună cu busuioc-CB	200	200	10	-	100	

*Notă.* \*elaborat de autor, \*\*norma fructelor/pomușoarelor este indicată pentru masa netă.

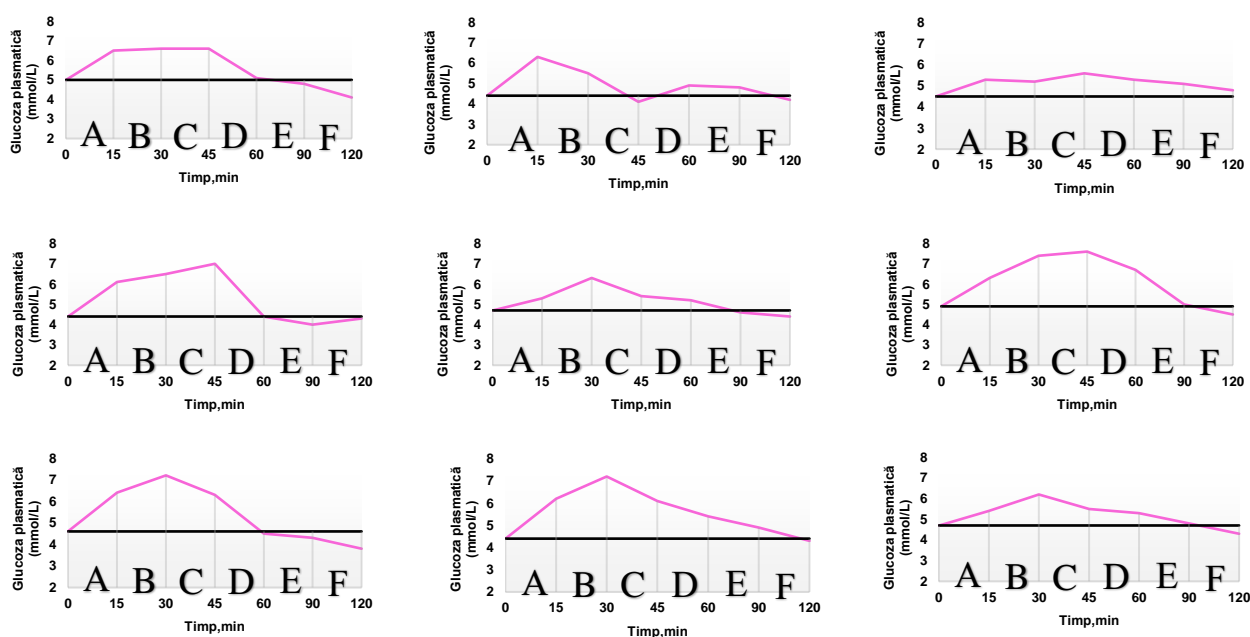
În perioada verii, când aportul hidric este mare, aciditatea gastrică se diminuează, ceea ce favorizează apariția infecțiilor bacteriene și virale în tubul digestiv. În această perioadă crește volumul consumului băuturilor răcoritoare. Este evident că crește cererea lor în unitățile comerciale, dar ele nu sunt recomandate datorită conținutului mare de zahăr, acidității înalte, utilizării coloranților sintetici, conservanților etc.

S-a demonstrat că băuturile elaborate conțin o cantitate semnificativă de glucide datorită zahărului, fructelor sau pomușoarelor, care au valori de la 10,38 până la 11,50 g/100 mL. În scopul corespunderii conținutului de carbohidrați (conform normelor) în băuturile nealcoolice elaborate, s-a recurs la compararea valorii energetice cu cele selectate din comerț. S-a constatat că valoarea energetică a băuturilor elaborate este aproape de valoarea energetică a aceleiași cantități de băuturi



dulci din comerț. Diferență este nesemnificativă, dar avantajul constă în faptul că băuturile nealcoolice elaborate sunt obținute din materii prime naturale, pe când cele din comerț conțin un șir de aditivi artificiali. Prin urmare, băuturile obținute pot fi oferite ca alternativă sănătoasă și naturală a băuturilor nealcoolice din comerț, cât și pentru servire în UAP.

Băuturile elaborate conțin cantități importante de glucide de circa 10,2-11,5%, la fel ca și cele din comerț. De exemplu, băuturile răcoritoare Coca-Cola și Fanta conțin respectiv 10,6% și 11,7% de zahăr. Băuturile menționate, fiind consumate frecvent și în cantități mari, ar putea duce la dependența de insulină și diabet, precum și la boli coronariene, metabolice și obezitate [23]. În acest sens a fost determinat IG al băuturilor elaborate. Metoda a fost efectuată conform standardului internațional ISO 26642 [24]. La studiu au participat 9 persoane cu starea de sănătate bună, care s-au oferit în calitate de voluntari. Pe parcursul a 7 zile, toți voluntarii au consumat fiecare tip de băutură elaborată în cantitate ce conținea 25 g de carbohidrați, glucoză praf ca etalon în cantitate de 25 g și o băutură fără adăugarea oțetului. Băuturile nealcoolice au fost servite înainte de micul dejun, pe stomacul gol. Probele de sânge capilar au fost colectate la intervalele de timp 0, 15, 30, 45, 60, 90 și 120 minute. Rezultatele glucozei plasmatică după consumarea unei din băuturi, sunt prezentate în figura 14.



**Fig. 14 Graficele zahărului din sânge față de timp, după consumarea băuturii din zmeură cu mentă pentru fiecare participant**

S-a constata că după consumul băuturilor nealcoolice elaborate, nivelul de glucoza plasmatică în sânge a crescut treptat de la 4,5-4,7 mmol/L până la 5,9-6,5 mmol/L în primele 30 minute, după care scade repede până la 4,8-5,1 mmol/L, iar după 2 ore s-a diminuat până la 4,0-4,4 mmol/L, ceea ce denotă că valorile atinse sunt mai mici decât înainte de consum. Indicele glicemic al băuturilor a variat de la 36 până la 49.

După consumarea probei fără oțet, nivelul de glucoza plasmatică în sânge crește treptat de la 4,6 până la 6,7 mmol/L în primele 30 de minute, apoi scade repede și după 1,5 ore are valoarea egală cu cea înainte de consum. Indicele glicemic al băuturii fără oțet este 112, practic, de 2 ori mai mare comparativ cu probele cu oțet.

Rezultatele obținute și multiplele investigații științifice realizate recent au documentat că ingestia oțetului diluat de către adulții sănătoși reduce răspunsul glucozei la o încărcătură de carbohidrați. Există, de asemenea, unele dovezi că ingestia de oțet diluat crește sațietatea pe termen scurt [25]. Brighenti și colab. au determinat că administrarea pe cale orală a acidul acetic diluat poate avea acțiune benefică asupra evoluției glicemiei. O doză mică de oțet, sub formă de sos pentru salată consumată la o masă mixtă, este suficientă pentru a influența în mod pozitiv răspunsul glicemic și aducerea lui la parametrii normali [26].

În baza rezultatelor obținute privind IG al băuturilor nealcoolice elaborate s-a constatat că acestea să referă la băuturi cu IG scăzut (PrL-41 IG, PiS-36 IG, MV-49 IG, ZM-47 IG, CB-49 IG). S-a confirmat că prezența oțetului natural în cantitate de 10%/L în compoziția băuturilor nealcoolice elaborate a fost eficient în reducerea nivelului postprandial de glucoză și insulină și este considerat un adjuvant eficient pentru îmbunătățirea controlului glicemic.

## CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI

Realizarea cercetărilor și analiza rezultatelor obținute au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Pentru prima dată a fost izolată din materii prime autohtone o tulpină nouă de bacterii acetice cu proprietăți biotehnologice valoroase. În urma realizării testelor biochimice și aplicării metodei RT-PCR s-a constatat cu siguranță apartenența tulpinii izolate la genul *Acetobacter*. Tulpina *Acetobacter aceti CNMN-AcB-01* a fost depozitată în Colecția Națională de Microorganisme Neapatogene din cadrul Institutului de Microbiologie și Biotehnologie. În urma testării tulpinii *Acetobacter aceti CNMN-AcB-01* în condiții industriale la întreprinderea „V. DEVELOP” SRL s-a constatat interesul practic al utilizării acesteia în producerea oțetului din vin autohton.

2. A fost studiată posibilitatea obținerii oțetului din suc concentrat din struguri albi și impactul adăugării nutrimenților asupra fermentării alcoolice și acetice. S-a constatat că adăugarea nutrimenților în procesul de fermentare acetică în cantități de 0,135g/L-(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,005g/L-K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> și 2,7g/L-C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> contribuie la acumularea acidului acetic cu 33%.

3. S-a demonstrat posibilitatea utilizării vinului sulfitat (cu conținutul de 80, 160, 240 și 320 mg/dm<sup>3</sup> de SO<sub>2</sub>) pentru fabricarea oțetului. S-a stabilit că doza până la 160 mg/dm<sup>3</sup> SO<sub>2</sub> permite

desfășurarea procesului de fermentare acetică în vinul sulfitat fără abateri și acumularea acidului acetic în cantitate minim admisibilă de 60 g/L.

4. S-a cercetat influența diferitor cantități (10, 20, 30, 40 și 50%) de oțet-maia obținut prin valorificarea tulpinii izolate *Acetobacter aceti CNMN-AcB-01* asupra parametrilor fizico-chimici ai oțetului. S-a demonstrat că cantitatea de 30% de oțet-maia asigură atingerea valorii minime de acid acetic de 60 g/L la a 14 zi de fermentare.

5. S-a demonstrat că utilizarea substratului micșorează durata procesului de fermentare acetică de circa 2 ori și influențiază neesențial parametrii fizico-chimici ai oțetului. Totodată coajă de nucă modifică semnificativ culoarea produsului finit. Astfel valoarea  $I_c$  a crescut de la 0,69 până la 20,70, totodată  $\Delta E^*(26,90)$  demonstrează modificări importante a culorii.

6. S-a demonstrat că intensitatea procesului de limpezire a oțetului din vin alb este maximă în primele 10 minute, urmată de o scădere esențială a ratei de clarificare. Au fost stabilite condițiile optime pentru limpezirea oțetului din vin alb după cum urmează: doza de agent de limpezire - 2 g/L; timpul de agitare - 3 min.; timpul de contact - 10 min.; separarea agentului de limpezire prin centrifugare la 3000 min<sup>-1</sup> timp de 3 min.

7. În baza cercetărilor a fost elaborată instrucțiunea tehnologică IT MD 67-41184408-01:2021 privind fabricarea oțetului din vin; efectuate încercări de testare a culturii de bacterii acetice *Acetobacter aceti CNMN-AcB-01*; optimizată schema-bloc de obținere a oțetului din vin alb. Rezultatele obținute au permis brevetarea procedurii de obținere a oțetului din vin alb.

8. Au fost elaborate rețete și schema tehnologică pentru cinci băuturi nealcoolice cu valorificarea oțetului din vin alb obținut. S-a demonstrat că valoarea energetică a băuturilor elaborate se încadrează în intervalul de la 45,93 până la 47,98 kcal/100 mL și este apropiată de cea a băuturilor din comerț (de la 42,00 până la 75,60 kcal/100 mL). Avantajul băuturilor elaborate este argumentat de utilizarea materiilor prime naturale autohtone și prezintă o alternativă sănătoasă a băuturilor din comerț.

9. S-a constatat că în urma consumului băuturilor nealcoolice elaborate acestea se referă la băuturi cu IG scăzut (PrL-41 IG, PiS-36 IG, MV-49 IG, ZM-47 IG, CB-49 IG). S-a confirmat că prezența oțetului natural în cantitate de 10%/L a fost eficientă în reducerea nivelului postprandial de glucoză și insulină, ceea ce confirmă eficiența lui în îmbunătățirea controlului glicemic.

**Problema științifică importantă soluționată.** Pentru prima dată a fost izolată, caracterizată, identificată și pașaportizată o tulpină nouă de bacterii acetice *Acetobacter aceti CNMN-AcB-01*, ceea ce a condus la optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin alb cu valorificarea cojii de nuci grecești în calitate de substrat, fapt ce a permis eficientizarea procesului de fabricare a oțetului și îmbogățirea lui cu substanțe minerale, indici cromatici și organoleptici.

În baza rezultatelor obținute au fost formulate următoarele **recomandări**:

- Fabricarea oțetului din vin alb în condiții industriale cu utilizarea cantității de min. 30% a maielei obținute prin valorificarea tulpinii *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 izolată din materie primă autohtonă.
- Utilizarea nutrimenților la fermentarea acetică în cantitatea optimală de:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,135 g/L,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  - 0,005 g/L și  $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$  - 2,7 g/L.
- Fabricarea oțetului din vin comercial cu un conținut de  $\text{SO}_2$  de maxim 160 mg/dm<sup>3</sup>.
- Utilizarea cojii de nuci grecești (*Juglans Regia L.*) în calitate de substrat pentru inocularea cu bacteriile acetice *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 în raport de 1:4 (coajă:vin).
- Valorificarea oțetului din vin alb autohton în cantitate de 10%/L, în calitate de conservant natural la fabricarea băuturilor nealcoolice.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. DAVID, T. *Impactul microelementelor și biofertilizanților asupra realizării potențialului de productivitate și rezistență a viței-de-vie*, tz. de doct. în științe agricole, Chișinău 2021. 130 p.
2. BÎLICI, C. *Argumentarea producerii și protecția spumantelor clasice cu denumire de origine „CRICOVA”*, tz. de doct. în științe tehnice, Chișinău 2021. 158p.
3. ARHIP, V., SCUTARU, I. Vine culture in the republic of moldova at the beginning of the third millennium. In: *Journal of social sciences*. 2019, II(2), pp. 87–94. ISSN 2587-3490 [citată 03.09.2022]. Disponibil: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3235248>
4. Programul de Vecinătate al Uniunii Europene, *Evaluarea situației privind agricultura și dezvoltarea rurală în țările parteneriatului estic Republica Moldova*, FAO [citată 03.09.2022]. Disponibil: <https://www.fao.org/3/aq675ro/aq675ro.pdf>
5. DAYAN, F. E., DUKE, S. O. Natural Products for Weed Management in Organic Farming in the USA. In: *Outlooks on Pest Management*. 2010, Vol. 21, № 4, pp. 156-160. ISSN 1743-1026 [citată 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1564/21aug02>
6. GAINA, B. Raport științific final privind executarea proiectului de cercetări științifice 18.80015.5007.222T, *Elaborarea biotehnologiei și implementarea liniei moderne de producere a oțetului heresat natural condimentat de calitate înaltă, competitiv pe piața internă și externă 2018-2020*. Chișinău 2019 [citată 03.09.2022]. Disponibil: <https://ancd.gov.md/sites/default/files/document/attachments/Raport%20final%20222T.PDF>
7. BECEANU, D., ANGHEL, R.M. Assortment of vinegar of supermarkets in Iași: qualitative assessment according to eu standards. In: *Cercetari agronomice in Moldova (Romania)*. 2010, Vol. XLIII , nr. 2 (142) pp. 55–64. Online: ISSN 2784 - 0360 [citată 03.09.2022]. Disponibil: [http://www.uaiasi.ro/CERCET\\_AGROMOLD/CA2-10-07.pdf](http://www.uaiasi.ro/CERCET_AGROMOLD/CA2-10-07.pdf)
8. BEGEA, M., STROIA, I., BEGEA, P. Tehnologie și sortimente de oțet competitive pe plan european, *Lucrări științifice*. In: *Seria Agronomie*, USAMV Iași. 2007, vol. 50, pp. 281–286. ISSN(print): 1454-7414 [citată 03.09.2022]. Disponibil: [http://www.uaiasi.ro/revagris/PDF/2007s\\_281.pdf](http://www.uaiasi.ro/revagris/PDF/2007s_281.pdf)
9. HORIUCHI, J., KANNO, T., KOBAYASHI, M. New vinegar production from onions. In: *Journal of bioscience and bioengineering*. 1999, nr. 88(1), pp. 107–109. ISSN 1389-1723 [citată 03.09.2022]. Disponibil: [https://doi.org/10.1016/s1389-1723\(99\)80186-8](https://doi.org/10.1016/s1389-1723(99)80186-8)

10. VEGAS, C., MATEO, E., GONZÁLEZ, A. et al. Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. In: *International journal of food microbiology*. 2010, nr. 138(1-2), p.130–136. ISSN 0168-1605 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006>
11. BOGDAN, N. *Valorificarea tulpinilor microbiene izolate din lapte de capră pentru aplicare industrială*: tz. de doct. în biologie, Chișinău, 2020. 170p.
12. NARDI, T., BORDIGA, M. Fermentation Process. In *Post-Fermentation and-Distillation Technology*. CRC Press, 1st Edition, 2017. pp. 1-40. ISBN:9781315155050.
13. HUTCHINSON, U.F., GQOZO, S., JOLLY, N.P. et al. Aeration, Agitation and Cell Immobilization on Corncoobs and Oak Wood Chips Effects on Balsamic-Styled Vinegar Production, In: *Foods*. 2020, no.8:303 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.3390/foods8080303>
14. USER GUIDE, Detection of Acetic Acid Bacteria, For research *in vitro* use only, Catalog #2401-15 [citat 03.09.2022]. Disponibil: [https://www.pika-weihenstephan.de/wp-content/uploads/2020/03/Manual\\_2401-15\\_4everyone\\_DetectionKit\\_B\\_Acetics\\_Screening2003E.pdf](https://www.pika-weihenstephan.de/wp-content/uploads/2020/03/Manual_2401-15_4everyone_DetectionKit_B_Acetics_Screening2003E.pdf)
15. BOISTEAN, A., CHIRSANOVA, A., ZGARDAN, D., MITINA, I., GAINA, B. The methodological aspects of using real-time PCR in acetobacter detection. In: *Journal of Engineering Science*. 2020, vol.V(XXVII), № 3, pp. 232-238. ISSN 2587-3474 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3949726>
16. Hotărârea Guvernului a RM nr. 1111 din 06.12.2010 cu privire la aprobarea Reglementărilor tehnice „Sucuri și anumite produse similare destinate consumului uman”, publicată: 17.12.2010 în Monitorul Oficial, nr. 247–251, art. nr. 1234.
17. MATAIX, E., DE CASTRO, M. L. Determination of total and free sulfur dioxide in wine by pervaporation–flow injection. In: *Analyst*. 1998, nr.123(7), pp.1547-1549 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1039/A802566E>
18. Hotărârea Guvernului a RM nr.1403 din 09.12.2008 cu privire la aprobarea „Reglementării tehnice Oțeturi și acid acetic de uz alimentară”. Publicat: 02.11.18 în: *Monitorul Oficial al Republicii Moldova* nr. 410-415, art. nr.1109.
19. SM SR EN 13188:2012 Oțet. Produs fabricat din lichide de origine agricolă. Definiții, prescripții, marcarea. *Catalogul standardelor naționale ale Republicii Moldova* : [în 2 vol.] / Inst. Naț. De Standardizare (INS). – Publicație oficială. – Chișinău : Institutul Național de Standardizare, 2014. – ISBN 978-9975-9526-5-1.
20. GOST 32097-2013. Vinegars of food raw material. General specifications. Date of introduction: 2014-07-01. *Federal Agency for Technical Regulation and Metrology*: Moscow, Russian, 2014.
21. LAMBRI, M., DORDONI, R., SILVA, A., DE FAVERI, D.M. Effect of Bentonite Fining on Odor-Active Comăounds in Two Different White Wine Styles. In: *Am. J. Enol. Vitic.* 2010, nr.61: 2, pp. 225-233 [citat 03.09.2022]. Disponibil: [https://www.dalcin.com/ENG/altridw/publicazioni/bentoniti\\_AJEV\\_2010.pdf](https://www.dalcin.com/ENG/altridw/publicazioni/bentoniti_AJEV_2010.pdf)
22. BUDAK, N.H, AYKIN, E., SEYDIM, A.C. et al. Functional properties of vinegar. In: *J Food Sci.* 2014, nr.79(5), pp.757-64. PMID: 24811350 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12434> .
23. REY-LÓPEZ, J. P., GONZALEZ, C. A. Research partnerships between Coca-Cola and health organizations in Spain. In: *European journal of public health*. 2019, nr.29(5), pp.810–815 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1093/eurpub/cky175>
24. ISO 26642:2010 *Food products-Determination of the glycaemic index (GI) and recommendation for food classification*. Publication date : 2010-10, Edition : 1, Number of pages : 18 [citat 03.09.2022]. Disponibil: <https://www.iso.org/standard/43633.html>

25. ÖSTMAN, E., GRANFELDT, Y., PERSSON, L. et al. Vinegar supplementation lowers glucose and insulin responses and increases satiety after a bread meal in healthy subjects. In: *Eur J Clin Nutr.* 2005, nr.59, pp.983–988 [citată 03.09.2022]. Disponibil: <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602197>
26. BRIGHENTI, F., CASTELLANI, G., BENINI, L. et al. Effect of neutralized and native vinegar on blood glucose and acetate responses to a mixed meal in healthy subjects. In: *Eur J Clin Nutr.* 1995 Apr;49(4):242-7(1995). PMID: 7796781.

## LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI

### Monografii (capitol în monografie colectivă)

1. CHIRSANOVA, A., BOIȘTEAN, A., COVALIOV, E., REȘITCA, V. Valorisation de coquilles de noix broyées dans le processus de fermentation acétique afin d'obtenir du vinaigre, Le gaspillage alimentaire : gestion et revalorisation des déchets alimentaires. *Editura AcademicPres*, Cluj-Napoca. 2021, pp.151-166. ISBN :978-973-744-886-6. Disponibil: <http://cris.utm.md/handle/5014/1046>

### Articole în reviste științifice

2. BOIȘTEAN, A., CHIRSANOVA, A., CIUMAC, J., GAINA, B. The particularities of the clarification process with bentonite of white wine vinegar. In: *Food systems.* 2020, nr.3(1), pp.25–32. UDC 663.242:666.322.4. DOI: 10.21323/2618–9771–2020–3–1–25–32. Disponibil: <https://www.fsjour.com/jour/article/view/65/101>

3. БОИШТЯН, А.В., КИРСАНОВА, А.И., РУБЦОВ, С.Л., КИСЕЛИЦА, Н. Выявление оптимального источника для изолирования уксуснокислых бактерий. In: *Журнал Все о мясе.* 2020, nr.5S, pp.59-62. ISSN 2071-2499, УДК 579.6 [citată 03.09.2022]. Disponibil: <https://www.vniimp.ru/journal/all-about-meat/2071-2499-2020/5s/59.html>

4. BOIȘTEAN, A. Aspects of vinegars production and marketing in Moldova. In: *Journal of social sciences.* 2021, nr.IV(2). ISSN 2587-3490 Disponibil: [https://doi.org/10.52326/jss.utm.2021.4\(2\).13](https://doi.org/10.52326/jss.utm.2021.4(2).13)

5. BOIȘTEAN, A., CHIRSANOVA, A., ZGARDAN, D., MITINA, I., GAINA, B. The methodological aspects of using real-time PCR in acetobacter detection. In: *Journal of Engineering Science.* 2020, vol.V(XXVII), № 3, pp. 232-238. ISSN 2587-3474. Disponibil: <http://doi.org/10.5281/zenodo.3949726>

### Articole și teze în culegeri științifice

6. BOIȘTEANA, A., POPOVICI, V. Development and optimization of new beverages based on different fruits or berries and white wine vinegar. *SCDS-UDJG 2021 The Ninth Edition, GALAȚI, 10th-11th of June 2021.* 243p. Disponibil: <http://www.cssd-udjg.ugal.ro/index.php/2020-2/abstracts-2023>

7. BOIȘTEAN, A. Investigation of obtaining vinegar using concentrated juice. *The 16th International Conference of Constructive Design and Technological Optimization in Machine Building Field, OPROTEH, Bacău, may 25-27, 2021.* 70p. ISSN 2457 – 3388. Disponibil: <http://oproteh.ub.ro/assets/abstracts.pdf?v=8439f13s>

8. MARCU, O., BOIȘTEAN, A. Technology of obtaining wine vinegar from grape concentrate. *The 9th International Conference for Students STUDENT IN BUCOVINA, December, 18th, 2020. Suceava, Romania.* 44p. ISSN 2068-7648. Disponibil: [http://fia-old.usv.ro/fiajournal/Student\\_in\\_Bucovina\\_2020/doc/Abstracte%20SIB%2018%20decembrie%202020.pdf](http://fia-old.usv.ro/fiajournal/Student_in_Bucovina_2020/doc/Abstracte%20SIB%2018%20decembrie%202020.pdf)

9. **BOIȘTEAN, A.,** CHIRSANOVA, A., CIUMAC, J. The particularities of the clarification process with bentonite of the wine vinegar. *The 9th international symposium "Euro-Aliment"*. 5-6 September 2019, Galați, România. 60p. ISSN 1843-5114. Disponibil: <https://www.gup.ugal.ro/guppress/index.php/test/catalog/book/859>

10. **BOIȘTEAN, A.,** STURZA, R., CHIRSANOVA A., MITINA I. Comparative analysis of two methods for detection the DNA of acetic acid bacteria by real-time PCR. *Simpozion Științific Internațional „Sectorul Agroalimentar-Realizări și Perspective”* 19-20 noiembrie 2021. Chișinău, Republica Moldova. pp.43-48. C.Z.U.: 663.15. ISBN 978-9975-64-329-0. Disponibil: <http://dspace.uasm.md/handle/123456789/7308>

11. **BOIȘTEAN, A.** Grape pomace as a filler in wine vinegar fermentation. *Simpozion științific național cu participare internațională "Biotehnologii moderne - soluții pentru provocările lumii contemporane"*. Chișinău, 20-21 mai 2021. 42p. CZU: 663.252.6:663.242. DOI: <https://doi.org/10.52757/imb21.008>

12. **BOIȘTEAN, A.,** CHIRSANOVA, A., CIUMAC, J., GAINA B. Impactul condițiilor de fermentare asupra calității oțetului de vin. *Conferința Internațională Zilele Academiei de Științe Tehnice din România cu tema „Creativitatea în dezvoltarea Societății Cunoașterii”*, 17-18 octombrie 2019, Chișinău, Republica Moldova. Disponibil: <https://old.asm.md/galerie/Program%20ZASTR%202019.pdf>

13. **БОИШТЯН, А.** Выделение уксусных бактерий из местной винодельческой продукции. *Conferința științifico-practică națională „Inovația: factor al dezvoltării social-economice”* Ediția a V-a Cahul, Republica Moldova, 17 decembrie 2020. <https://www.usch.md/wp-content/uploads/2020/12/Program-Conferinta-IFDSE-17.12.2020.pdf>

14. **BOIȘTEAN, A.** Impactul adăugării unor nutrienți asupra procesului de obținere a oțetului de mere. *Conferința tehnico-științifică a studenților, masteranzilor și doctoranzilor*, 1-3 aprilie 2020, Chișinău, Republica Moldova. 2020, vol. I. pp. 441-442. ISBN 978-9975-45-632-6. Disponibil: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/106516](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/106516)

#### **Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții**

15. **BOIȘTEAN, A.,** CHIRSANOVA, A., GAINA, B., SIMINIUC, R. Procedeu de obținere a oțetului din vin alb. *Brevet de invenție MD 1517(13)Y*. Publicat în : *BOPI nr. 4/2021*. Disponibil: [http://www.agepi.md/sites/default/files/bopi/BOPI\\_04\\_2021.pdf](http://www.agepi.md/sites/default/files/bopi/BOPI_04_2021.pdf)

- Medalie de argint, EUROINVENT 2021, 13th European Exhibition of Creativity and Innovation Iasi, Romania, 20-21 May 2021.

- Medalie de argint și Diploma de excelență, PRO INVENT 2021, Salonul internațional al cercetării științifice, inovării și inventicii-edțiia XIX, Cluj-Napoca, Romania, 20-22 octombrie 2021.

- Medalie de argint, INFOINVENT 2021, Expoziția Internațională Specializată, Chișinău, Moldova, 17-20 NOIEMBRIE 2021.

16. **BOIȘTEAN, A.,** CHIRSANOVA, A., REȘITCA, V., STURZA, R., DESEATNICOVA, O., CAPCANARI, T. Procedeu de obținere a băuturii nealcoolice. *Brevet de invenție MD 1630 (13) Y*. Publicat în : *BOPI nr. 7/2022*, p.45. Disponibil: [https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI\\_07\\_2022.pdf](https://agepi.gov.md/sites/default/files/bopi/BOPI_07_2022.pdf)

## ADNOTARE

### **Boiștean Alina: "Optimizarea tehnologiei și caracterizarea calității oțetului de vin autohton", teza de doctor în științe inginerești, Chișinău, 2022.**

Teza constă din introducere, 5 capitole, concluzii și recomandări, bibliografie (204 titluri) înserate în 110 pagini conținut de bază, inclusiv 43 figuri, 39 tabele (cu excepția celor indicate în anexe), 13 anexe. Rezultatele au fost reflectate în 14 lucrări științifice și 2 brevete.

**Cuvinte-cheie:** oțet, bacterii acetice, fermentare alcoolică, fermentare acetică, substrat, vin.

**Scopul lucrării:** constă în optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin cu utilizarea tulpinii de bacterii acetice izolate din produsele vitivinicole autohtone, inoculate pe substrat din materii prime locale și valorificarea acestuia pentru obținerea băuturilor nealcoolice.

**Obiectivele cercetării:** izolarea culturilor pure de bacterii acetice din produsele vitivinicole autohtone și identificarea lor după caracteristicile morfologice, culturale, fiziologice, biochimice și moleculare; studiul privind producătorii existenți și sortimentul de oțeturi în RM; evaluarea influenței diferitor factori asupra fermentării acetice; optimizarea tehnologiei de obținere a oțetului din vin; valorificarea oțetului din vin pentru obținerea unor băuturi nealcoolice.

**Noutatea și originalitatea științifică.** Pentru prima dată a fost efectuată izolarea și identificarea unei tulpini autohtone de bacterii acetice *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 provenite din oțet artizanal din vin alb obținut din soiul de viță-de-vie Noah. Au fost stabilite dozele-limită de dioxid sulf și de cultură starter pentru asigurarea derulării eficiente a fermentării acetice. În premieră a fost utilizată coaja de nuci grecești și alune în calitate de substrat pentru bacteriile acetice, astfel micșorând perioada de fermentare și sporind calitățile organoleptice a oțetului obținut. A fost examinată evoluția glicemiei după consumarea băuturilor nealcoolice elaborate și s-a constatat că băuturile se clasifică în grupa produselor cu indice glicemic scăzut și pot fi recomandate ca alternativă sănătoasă băuturilor din comerț.

**Problema științifică soluționată:** dezvoltarea și fundamentarea științifică a regimurilor biotehnologice de obținere a oțetului din vin prin fermentarea naturală cu utilizarea tulpinii de bacterii acetice izolate din materii prime autotone, dezvoltată pe substrat natural.

**Semnificația teoretică.** Aplicarea tehnicilor de biologie moleculară pentru izolarea și identificarea tulpinii studiate prin utilizarea metodei real-time PCR. A fost demonstrată posibilitatea ameliorării parametrilor cromatici ai oțetului din vin alb prin utilizarea cojii de nuci ca substrat pentru dezvoltarea bacteriilor acetice, mărinde suprafața de contact cu produsul, astfel eficientizând procesul de fabricare a oțetului.

**Valoarea aplicativă:** constă în stabilirea condițiilor optime de fermentare acetică a vinului autohton și elaborarea instrucțiunilor tehnice pentru obținerea oțetului din vin. Procedeele tehnologice recomandate în baza studiului pot fi aplicate la întreprinderile de profil, iar utilizarea cojii de nuci soluționează problema deșeurilor agroalimentare. Au fost obținute 2 brevete de invenție.

**Implementarea rezultatelor științifice.** A fost elaborată instrucțiunea tehnologică IT MD 67-41184408-01:2021 privind fabricarea oțetului din vin și efectuate testări a tulpinii de bacterii acetice *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 în cadrul întreprinderii SRL V.DEVELOP. Rezultatele obținute au fost reflectate în rapoartele proiectului nr. 18.80015.5007.222T și în 2 brevete de invenție. Brevetul de invenție de scurtă durată cu nr. MD 1517 Y a fost solicitat de către SRL FERMENTED FRUTS care a încheiat contract de licență neexclusivă de folosire a acestuia, în scopul comercializării produsului obținut în urma aplicării procedeeului descris.



## АННОТАЦИЯ

**Боиштян Алина: „Оптимизация технологии и характеристики качества местного винного уксуса”, диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук, Кишинев, 2022.**

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключений и рекомендаций, списка литературы (204 источников), основной текст содержит 110 страницы, в том числе 43 рисунков и 39 таблиц (без учета приведенных в приложениях), 13 приложений. Полученные результаты отражены в 14 научных работах и в 2 патентах.

**Ключевые слова:** уксус, уксуснокислые бактерии, алкогольная ферментация, уксуснокислая ферментация, субстрат, вино.

**Цель работы:** заключается в оптимизации технологии получения уксуса из вина с использованием штамма уксуснокислых бактерий, выделенного из местной винодельческой продукции, инокулированного на субстрат из местного сырья и его использование для получения безалкогольных напитков.

**Задачи работы:** выделение чистых культур уксуснокислых бактерий из местных винодельческих продуктов и их идентификация по морфологическим, культуральным, физиологическим, биохимическим и молекулярным признакам; изучение существующих производителей и ассортимента уксусов в РМ; оценка влияния различных факторов на уксуснокислое брожение; оптимизация технологии получения винного уксуса; использование винного уксуса для получения безалкогольных напитков.

**Научная новизна и оригинальность.** Впервые проведено выделение и идентификация местного штамма уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 из сырого белого винного уксуса, полученного из винограда сорта Noah. Установлены предельные дозы диоксида серы и заквасочной культуры, обеспечивающие эффективное протекание уксуснокислого брожения. Впервые в качестве субстрата для уксуснокислых бактерий была использована скорлупа грецкого ореха и фундука, что позволило сократить период брожения и повысить органолептические качества полученного уксуса. Было изучено изменение уровня глюкозы в крови после употребления разработанных безалкогольных напитков, и было установлено, что напитки относятся к группе продуктов с низким гликемическим индексом и могут быть рекомендованы в качестве здоровой альтернативы коммерческим напиткам.

**Научная проблема:** заключается в разработке и научном обосновании биотехнологических режимов получения уксуса из вина путем естественного брожения с использованием штамма уксуснокислых бактерий, выделенных из местного сырья, закрепленного на натуральном субстрате.

**Теоретическая значимость.** Применение методов молекулярной биологии для выделения и идентификации исследуемого штамма с помощью метода ПЦР в реальном времени. Продемонстрирована возможность улучшения хроматических параметров белого винного уксуса за счет использования скорлупы грецкого ореха в качестве субстрата для развития уксуснокислых бактерий, увеличение поверхности контакта с продуктом, что делает процесс производства уксуса более эффективным.

**Практическая ценность работы:** заключается в установлении оптимальных условий уксуснокислого брожения местного вина и разработке технических инструкций по получению винного уксуса. Технологические процессы, рекомендованные на основе исследования, могут быть применены на специализированных предприятиях, а использование скорлупы грецкого ореха решит проблему агропродовольственных отходов. Получено 2 патента на изобретения.

**Внедрение научных результатов.** Разработана технологическая инструкция IT MD 67-41184408-01:2021 по производству винного уксуса и проведены испытания штамма уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 на предприятии SRL V.DEVELOP. Полученные результаты были отражены в отчетах проекта №. 18.80015.5007.222T и в 2 патентах. Краткосрочный патент на изобретение №. MD 1517 Y был запрошен SRL FERMENTED FRUTS, которая заключила неисключительный лицензионный договор на его использование с целью маркетинга продукта, полученного в результате применения описанного процесса.

## ABSTRACT

**Boistean Alina: "Optimizing the technology and quality characteristics of local wine vinegar", doctoral thesis in engineering sciences. Chisinau, 2022.**

The thesis consists of introduction, 5 chapters, general conclusion and recommendations, references (204 bibliographic sources), the basic text contains 110 pages, including 43 figures and 39 tables (except those indicated in the annexes), 13 annexes. The results are reflected in 14 scientific papers and 2 patents.

**Keywords:** vinegar, acetic bacteria, alcoholic fermentation, acetic fermentation, substratum, wine.

**Purpose:** consists in optimizing the technology for obtaining vinegar from wine using a strain of acetic acid bacteria isolated from local wine products, inoculated on a substrate from local raw materials and using it to produce soft drinks.

**Objectives:** isolation of pure cultures of acetic acid bacteria from local wine products and their identification by morphological, cultural, physiological, biochemical and molecular features; study of existing producers and range of vinegars in the Republic of Moldova; assessment of the influence of various factors on acetic acid fermentation; optimization of wine vinegar production technology; using wine vinegar to produce soft drinks.

**Scientific novelty and originality.** For the first time, a local strain of acetic acid bacteria *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 was isolated and identified from raw white wine vinegar obtained from Noah grapes. The limiting doses of sulfur dioxide and starter culture have been established, which ensure the effective flow of acetic acid fermentation. For the first time, walnut and hazelnut shells were used as a substrate for acetic acid bacteria, which made it possible to shorten the fermentation period and increase the organoleptic qualities of the resulting vinegar. The change in blood glucose levels after consumption of developed soft drinks was studied, and it was found that the drinks belong to the group of products with a low glycemic index and can be recommended as a healthy alternative to commercial drinks.

**Solved scientific problem:** consists in the development and scientific substantiation of biotechnological regimes for obtaining vinegar from wine by natural fermentation using a strain of acetic acid bacteria isolated from local raw materials, fixed on a natural substrate.

**Theoretical significance.** Application of molecular biology methods for the isolation and identification of the studied strain using the real-time PCR method. The possibility of improving the chromatic parameters of white wine vinegar by using walnut shell as a substrate for the development of acetic acid bacteria, increasing the contact surface with the product, which makes the vinegar production process more efficient, has been demonstrated.

**Applicative value:** consists in establishing the optimal conditions for the acetic fermentation of local wine and developing technical instructions for obtaining vinegar from wine. The technological procedures recommended on the basis of the study can be applied in specialized enterprises, and the use of walnut shells will solve the problem of agri-food waste. Received 2 patents for inventions.

**Implementation of scientific results.** The IT MD 67-41184408-01:2021 technological instruction on the manufacture of wine vinegar was developed and testing of the acetic bacteria strain *Acetobacter aceti* CNMN-AcB-01 was carried out within the company SRL V.DEVELOP. The results obtained were reflected in the project reports no. 18.80015.5007.222T and in 2 patents. Short-term invention patent with no. MD 1517 Y was requested by SRL FERMENTED FRUTS, which concluded a non-exclusive license contract for its use, for the purpose of marketing the product obtained following the application of the described process.

**BOIȘTEAN ALINA**

**OPTIMIZAREA TEHNOLOGIEI ȘI CARACTERIZAREA CALITĂȚII  
OȚETULUI DE VIN AUTOHTON**

**253. 01. - TEHNOLOGIA PRODUSELOR ALIMENTARE  
DE ORIGINE VEGETALĂ**

**Rezumatul tezei de doctor în științe inginerești**

---

Aprobat spre tipar: 30.09.2022

Hârtie ofset. Tipar RISO

Coli de tipar 2,0

Formatul hârtiei: 60x84 1/16

Tiraj 50 ex.

Comanda nr. ...

---

UTM, 2004, Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfint, 168.

Secția Redactare și Editare a UTM

2068, Chișinău, str. Studenților 9/9