



Universitatea
Transilvania
din Brașov

TEZĂ DE ABILITARE

**Titlu: Abordări inovative în optimizarea tehnologiilor fermentative și
în evaluarea calității produselor alimentare**

Domeniul: *Ingineria Produselor Alimentare*

Autor: Prof. Dr. Ing. PĂDUREANU Vasile
Universitatea Transilvania din Brașov

BRAȘOV, 2026

CUPRINS

A. REZUMAT.....	2
ABSTRACT	4
B. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ȘI PROFESIONALE ȘI PLANURI DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI.....	6
B.I REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE, PROFESIONALE ȘI ACADEMICE	6
I.1 Realizările profesionale	6
I.1.1. Parcursul profesional și principalele realizări.....	6
I.1.2 Activitatea de coordonare de echipe de proiect	Eroare! Marcaj în document nedefinit.
I.2. Direcții de cercetare și rezultate obținute	9
I.2.1 Optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată	9
I.2.1.1 Optimizarea parametrilor de calitate ai musturilor și vinurilor prin utilizarea de tehnologii convenționale și neconvenționale	9
I.2.1.2 Optimizarea parametrilor de calitate ai oțetului afine prin utilizarea de tehnologii neconvenționale	56
I.2.2 Evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică	67
I.2.2.1 Metode standardizate versus metode alternative de analiză microbiologică a produselor alimentare.....	68
I.2.2.2 Utilizarea tehnicilor moderne de analiza a expunerii produselor din carne la prezența hidrocarburilor policiclice aromate.....	76
I.2.2.3 Utilizarea diferitelor metode de analiză cantitativă și calitativă la produsele din pește gătit prin diferite tehnici	82
I.3 Recunoașterea și impactul activității.....	96
B.II PLANUL DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI PROFESIONALE, ȘTIINȚIFICE ȘI ACADEMICE ...	98
II. 1. Dezvoltare pe plan didactic	98
II. 2 Dezvoltare pe planul cercetării-dezvoltării	98
Referințe bibliografice.....	99

A. REZUMAT

Teza de abilitare este structurată conform metodologiei în vigoare și cuprinde două secțiuni principale, respectiv o secțiune alocată realizărilor la nivel profesional, științific și academic, și o secțiune alocată planurilor de evoluție în carieră.

Realizările profesionale sunt descrise din punctul de vedere al parcursului educațional și al carierei care include 34 de ani de activitate în domeniul învățământului universitar, începând cu poziția de preparator universitar din 1992 și până la momentul actual, când ocup poziția Profesor universitar titular. Titlul de doctor a fost obținut în anul 2000. Cariera didactică s-a derulat în cadrul Universității Transilvania din Brașov, inițial în Facultatea de Inginerie mecanică, din care s-a desprins ulterior, ca o necesitate din piața muncii, Facultatea de Alimentație și turism, respectiv în 2007. În decursul acestor ani am îndeplinit multiple funcții administrative, de la șef de catedră/director de departament, până la funcția de decan.

Referitor la activitatea de cercetare, lista de publicații însumează 27 de articole științifice ISI și alte 76 de articole indexate BDI, ceea ce au condus la obținerea unui indice Hirsch în WoS/Clarivate egal cu 5, iar în Google Scholar egal cu 9. În ceea ce privește coordonarea de proiecte, am fost responsabil de proiect în cadrul a două proiecte de cercetare la nivel național.

Activitatea de cercetare este prezentată cu principalele rezultate obținute pe două direcții mari de cercetare, respectiv: (1) Optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată și (2) Evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică.

Referitor la prima direcție de cercetare, *optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată*, cercetările au vizat aspecte referitoare la efectele pasteurizării și tratamentelor cu ultrasunete asupra mustului de struguri pentru vinuri roșii, precum și asupra vinurilor roșii ca produs final și caracteristicilor acestora, inclusiv ale compușilor biologic activi. De asemenea, studiile s-au centrat și pe extracția de polifenoli și antociani și capacitatea antioxidantă a unor variante de oțet obținute din substraturi alcoolice conținând sucuri de afine tratate cu ultrasunete.

Cea de a doua direcție de cercetare referitoare la *evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică* a abordat următoarele subiecte: metode standardizate *versus* metode alternative de analiză microbiologică a produselor alimentare; utilizarea tehnicilor moderne de analiza a expunerii produselor din carne la prezența hidrocarburilor policiclice aromate; utilizarea

diferitelor metode de analiză cantitativă și calitativă la produsele din pește gătit prin diferite tehnici.

Ultima parte a tezei descrie planurile de dezvoltare a carierei, prin prisma unei viitoare abilitari în domeniul Ingineria Produselor Alimentare. Principalele direcții de cercetare și proiecte pentru atragere de fonduri vor fi corelate cu domeniile de cercetare de interes al domeniului de doctorat Ingineria Produselor Alimentare din cadrul SDI a Universității Transilvanie din Brașov, respectiv: chimia și procesarea alimentelor; siguranța alimentară, asigurarea calității și dezvoltarea de măsuri de control; conectarea științei alimentare la sănătatea umană, dietă și prevenirea bolilor legate de dietă; dezvoltarea de sisteme rezistente, reducerea risipei alimentare și valorificarea subproduselor.

ABSTRACT

The habilitation thesis is structured according to the approved methodology and includes two main sections, one section allocated to professional, scientific and academic achievements, and another one presenting the career evolution plans.

My professional achievements are outlined through the lens of my educational and career trajectory, spanning 34 years in higher education—from my initial role as a junior teaching assistant in 1992 to my current position as a full professor. I obtained my doctoral degree in 2000. My academic career has unfolded at Transilvania University of Braşov; I began in the Faculty of Mechanical Engineering, from which the Faculty of Food and Tourism subsequently branched off in 2007 in response to labor market demands. Over the years, I have held various administrative roles, ranging from Head of Chair/Department Director to Dean.

Regarding research activity, the list of publications comprises 27 ISI-indexed scientific articles and 76 other articles indexed in international databases, resulting in a Hirsch index of 5 in WoS/Clarivate and 9 in Google Scholar. As for project coordination, I served as project leader for two national-level research projects.

The research activity is presented alongside the key results obtained across two major research directions: (1) the optimization of fermentation and non-conventional technologies for producing food products with high bioactive value, and (2) the evaluation of the quality, safety, and functionality of processed food products using modern analytical and technological valorization methods.

Regarding the first research direction—the optimization of fermentation and non-conventional technologies for producing foods with high bioactive value—research focused on the effects of pasteurization and ultrasonic treatments on red wine grape must and the resulting red wines, as well as on their characteristics, including their biologically active compounds. Additionally, studies centered on the extraction of polyphenols and anthocyanins and the antioxidant capacity of vinegar variants produced from alcoholic substrates containing ultrasound-treated blueberry juice.

The second research direction—focused on evaluating the quality, safety, and functionality of food products through modern analysis and technological valorization methods—addressed the following topics: standardized versus alternative methods for the microbiological analysis of food products; the use of modern techniques to analyze the exposure of meat products to polycyclic aromatic hydrocarbons; and the application of various

quantitative and qualitative analysis methods to fish products prepared using different cooking techniques.

The final part of the thesis outlines career development plans, specifically regarding future habilitation in the field of Food Product Engineering. Key research directions and projects aimed at securing funding will be aligned with the research areas of interest within the Food Product Engineering doctoral program at the Doctoral School of the Transilvania University of Braşov—namely: food chemistry and processing; ensuring food safety and quality and developing control measures; linking food science to human health, diet, and the prevention of diet-related diseases; and developing resilient systems, reducing food waste, and valorizing by-products.

B. REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE ȘI PROFESIONALE ȘI PLANURI DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI

B.I REALIZĂRI ȘTIINȚIFICE, PROFESIONALE ȘI ACADEMICE

I.1 Realizările profesionale

I.1.1. Parcursul profesional și principalele realizări

Absolvent în anul 1991 al facultății de Inginerie Mecanică, specializarea Mecanică Agricolă din cadrul Universității Transilvania din Brașov, imediat după finalizarea facultății am început activitatea la societatea comercială Tractorul Brașov, secția Motor. În luna ianuarie 1992 am ocupat prin concurs postul de **Preparator universitar**, la facultatea de Inginerie mecanică (Figura 1), Catedra de Mașini pentru agricultură și industria alimentară. În anul 1994 am avansat la gradul didactic de **Asistent Universitar**, având activitatea didactică orientată spre discipline precum: Tehnologii alimentare fermentative, Utilaje și instalații pentru fabricarea berii, Utilaje și instalații utilizate în vinificație la specializarea Utilaje pentru prelucrarea produselor agroalimentare; disciplina Curs general de mașini la programul de studii Silvicultură; disciplinele Tractoare și Exploatarea mașinilor agricole la specializarea Mașini și instalații pentru agricultură și industria alimentară.

În luna februarie anul 1998, am avansat la funcția de **Șef lucrări**, activitatea didactică desfășurându-se în principal în cadrul aceluiași discipline, la care s-a mai adăugat și cursul, de Tehnologii alimentare fermentative de la programul de studii Echipamente mașini și utilaje (Colegiu universitar).

În primăvara anului 2000 am finalizat studiile universitare de doctorat cu titlul **Studii și cercetări privind utilizarea tractoarelor agricole la lucrări de gospodărire comunală** și să obțin titlul de **Doctor în Științe ingineresti** – domeniul Inginerie mecanică.

În anul 2001 am participat la un concurs pentru ocuparea postului de **Conferențiar** universitar Septembrie 2001, iar din anul 2004 dețin funcția de **Profesor universitar**. Activitatea didactică a fost concentrată spre cursurile de la programul de studii Utilaj tehnologic pentru industria alimentară fiind titular al cursurilor Utilaje și instalații pentru vinificație și Utilaje și instalații din industria berii. Din anul 2000 am fost titular al cursurilor Dinamica și transmisia tractoarelor de la programul de studii Mașini și instalații pentru agricultură și industria alimentară și Curs general de mașini de la Silvicultură.

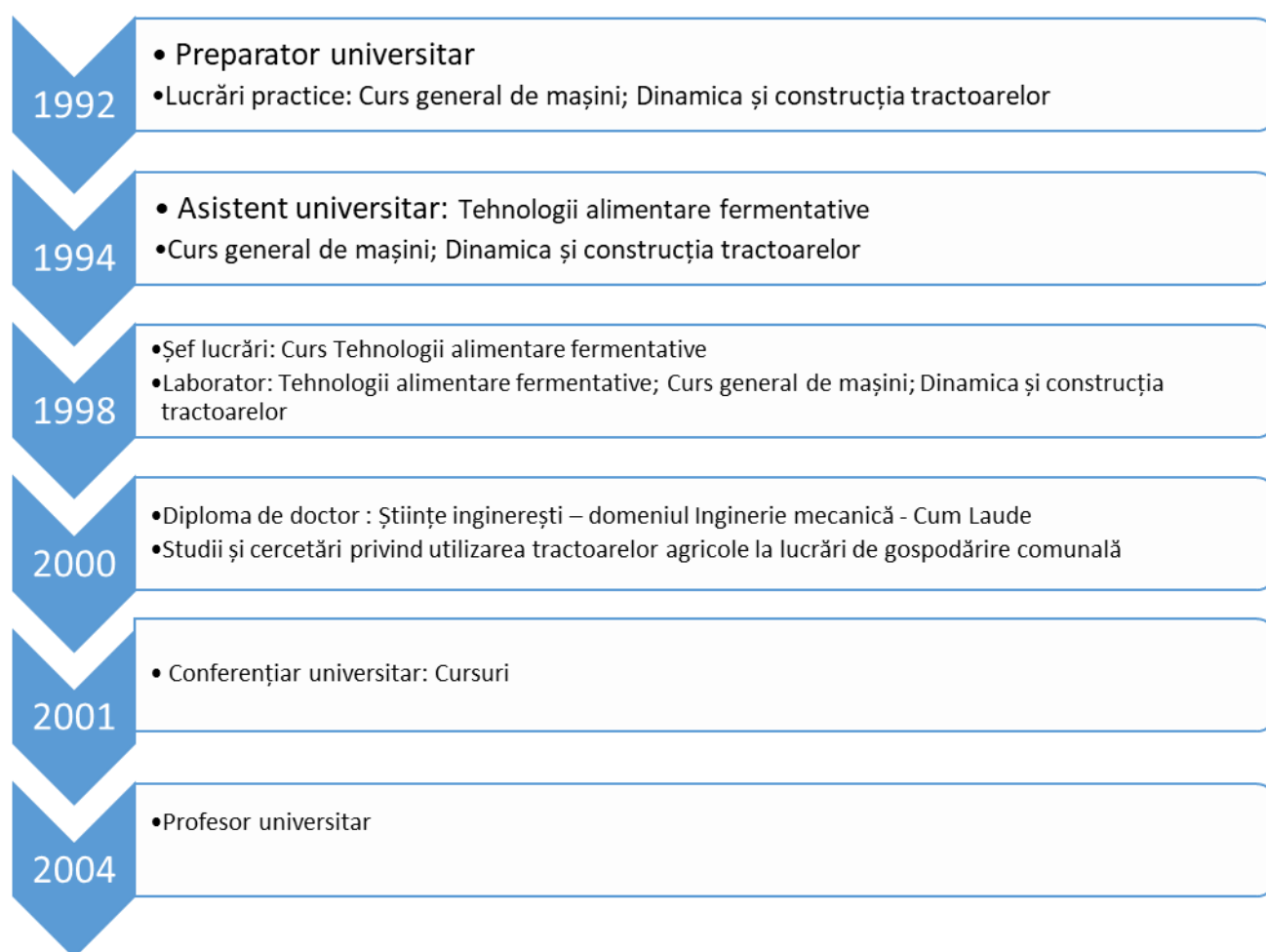


Figura 1 . Evoluția carierei didactice

În perioada 1995 -2004 numărul candidaților înscriși pentru concursul de admitere la cele două programe de studii coordonate de catedra Mașini pentru agricultură și industria alimentară era în scădere uneori nu am avut 25 de studenți la un program de studii pentru a porni în anul I cu o grupă și erau probleme cu asigurarea normelor didactice ale cadrelor didactice. Motiv pentru care nu mi-am depus dosarul pentru a deveni conducător de doctorat, era mică probabilitatea de a avea doctoranzi și pentru că programele de studiu nu aveau viitor în facultatea de Inginerie mecanică.

Începând cu anul 2005 am fost implicat în activitatea de înființare în domeniul Ingineria produselor alimentare a programelor de licență *Ingineria produselor alimentare* (IPA) și *Controlul și expertiza produselor alimentare* (CEPA), iar în domeniul Inginerie și management am înființat programului de studii de licență *Inginerie și management în alimentație publică și agroturism* (IMAPA) în paralel am coordonat programele *Mașini și instalații pentru agricultură și industria alimentară* și *Utilaj tehnologic pentru industria alimentară*.

În anul 2007 catedra de Mașini pentru agricultură și industria alimentară devine Facultatea de Alimentație și turism, am avut privilegiul să fiu Șef de catedră până în anul 2011, director de departament până în anul 2020, după care, până în prezent, reprezintă Facultatea de Alimentație și turism în calitate de decan. De la înființarea facultății până în prezent am fost membru în Consiliul facultății și am reprezentat facultatea în Senatul universității, două mandate.

În noua facultate am fost implicat direct la înființarea unor noi programe de studii de masterat, un program de conversie profesională pe care le-am și coordonat: Inginerie și management în agroturism; Dezvoltarea și optimizarea sistemelor tehnice și tehnologice din agroturism; Sisteme de procesare și controlul calității produselor agroalimentare; Management în ospitalitate și eco agroturism.

De asemenea, în facultatea nou înființată, pe lângă activitățile administrative am fost implicat și în activități didactice (cursuri, lucrări practice) și de cercetare la programele de studii Ingineria produselor alimentare, Controlul și expertiza produselor alimentare, Inginerie și management în alimentație publică și agroturism, Mașini și instalații pentru agricultură și industria alimentară, Echipamente pentru procese industriale, Sisteme de procesare și controlul calității produselor alimentare. Titular de curs la disciplinele: Ingineria vinului; Ingineria berii, Tehnologia de fabricare a malțului și a berii, Tehnologia de fabricare a vinului, oțetului și a băuturilor distilate, Aparat de măsură și control, Metode și tehnici de analiză instrumentală, etc.

Activitate didactică:

- actualizarea și predarea cursurilor și lucrărilor practice ale disciplinelor enumerate anterior;
- coordonarea lucrărilor de licență și disertație ale studenților din cadrul Facultății de Alimentație și Turism, cu o medie de 12 lucrări pe an universitar;
- activitate publicistică în domeniu: cărți ca prim autor sau unic autor: Mașini și instalații pentru tehnologii alimentare fermentative. Fabricarea berii; Utilaje pentru vinificație; Curs general de mașini; Tehnici de gospodărire comunală; VINUL, introducere, degustare și servire;
- În calitate de coautor a unor publicații de specialitate: un îndrumar de laborator intitulat „Tehnologia vinului, oțetului și a băuturilor distilate; Analiza senzorială a produselor alimentare; Mărunțirea cerealelor; „Metode și mijloace de măsurare”
- Activitate de cercetare:

- participare activă la implementarea a trei proiecte de cercetare, în calitate de director/responsabil de proiect, precum și implicare ca membru în echipele a șapte proiecte naționale, alături de alte inițiative de cercetare.
- publicarea a 27 de articole științifice ISI (din care 20 cotate) și a altor 76 de articole indexate BDI; rezultatele obținute vor fi detaliate în secțiunea următoare.
- principalele direcții de cercetare abordate de-a lungul carierei s-au concentrat pe optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată și Evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică.

Alte activități:

- coordonator sau responsabil a unor programe de studii de licență și masterat, perioada 1993-prezent
- Responsabil, la nivel de universitate, cu orarul studenților, perioada 1998 -prezent;
- Șef de catedră;
- Director de departament;
- Decan;
- Membru în Senatul universității, comisia didactică
- membru în Comisia științifică Ingineria resurselor vegetale și animale în cadrul UNITBV;

I.2. Direcții de cercetare și rezultate obținute

Activitatea de cercetare derulată a abordat, în principal următoarele direcții de cercetare:

1. *Optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată*
2. *Evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică.*

În cele ce urmează vor fi prezentate succint principalele rezultate ale cercetărilor în tematicile amintite și modul de valorificare al acestora.

I.2.1 Optimizarea tehnologiilor fermentative și neconvenționale pentru obținerea produselor alimentare cu valoare bioactivă ridicată

Această direcție de cercetare a adresat următoarele teme de cercetare:

- optimizarea parametrilor de calitate ai musturilor și vinurilor prin utilizarea de tehnologii convenționale și neconvenționale
- optimizarea parametrilor de calitate ai oțetului afine prin utilizarea de tehnologii neconvenționale

I.2.1.1 Optimizarea parametrilor de calitate ai musturilor și vinurilor prin utilizarea de tehnologii convenționale și neconvenționale

Cercetările au vizat aspecte referitoare la efectele pasteurizării și tratamentelor cu ultrasunete asupra mustului de struguri pentru vinuri roșii, precum și asupra vinurilor roșii ca

produs final și caracteristicilor acestora, inclusiv ale compușilor biologic activi. Rezultatele vor fi prezentate corelat cu articolele științifice în care au fost publicate.

I.2.1.1.1 An Overview of Effects Induced by Pasteurization and High-Power Ultrasound Treatment on the Quality of Red Grape Juice. *Molecules*, 25 (7), 2020.

<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/7/1669>

Strugurii reprezintă una dintre cele mai importante culturi recoltate la nivel global. Cu toate acestea, sucul de struguri nu este consumat pe scară largă la nivel mondial din cauza conținutului ridicat de zaharuri sau a acidității crescute, însă poate fi combinat cu suc de mere sau alte tipuri de sucuri (*Kashyap și colab., 2001; Lieu și colab., 2010; Spinelli și colab., 2016*). Ultimele decenii au fost marcate de numeroase studii privind constituenții chimici ai strugurilor, în special compușii fenolici, care sunt metaboliți secundari ai plantelor cu activitate de neutralizare a radicalilor liberi (*Martin și colab., 2017; Ignat și colab., 2011*).

Numeroase studii de cercetare au sugerat că antioxidanții pot avea efecte pozitive asupra sănătății umane datorită acțiunii lor împotriva stresului oxidativ. Astfel, s-a considerat că o dietă bazată pe un aport zilnic ridicat de antioxidanți proveniți din fructe și legume ar putea conduce la o incidență mai scăzută a aterosclerozei, bolii Alzheimer, cancerului, afecțiunilor oculare, diabetului, artritei reumatoide și bolilor neuronului motor (*Hajhashemi și colab., 2010*). Pentru a reduce dezvoltarea microorganismelor și pentru a prelungi durata de valabilitate, sucurile de fructe sunt de obicei procesate prin pasteurizare. Pe lângă faptul că acest procedeu termic influențează calitatea produselor, acesta prezintă și dezavantajul denaturării compușilor bioactivi, ca urmare a reacțiilor de ionizare, hidroliză și oxidare (*Ignat și colab., 2011; Paniwnyk., 2017*). Având în vedere nevoia consumatorilor pentru sucuri de fructe de înaltă calitate, cu aromă și gust plăcut, producătorii caută în mod continuu alternative la metodele termice convenționale. În plus, cererea consumatorilor pentru produse alimentare nutritive și sigure a dus la un interes crescut pentru tehnicile de conservare non-termice.

Recent, tehnologii emergente precum ultrasunetele, microundele și iradierea cu câmp electric pulsatoriu au fost testate în industria alimentară pentru a dezvolta diverse aplicații eficiente de procesare a alimentelor (*Clodoveo și colab., 2016*). Ultrasunetele sunt unde sonore cu frecvențe mai mari de 16 kHz (peste limita percepută de urechea umană). Atunci când sunt transmise printr-un lichid, solid sau gaz cu proprietăți elastice, undele sonore se deplasează cu o viteză dependentă de lungimea de undă și de tipul de material.

În ceea ce privește aplicațiile, sunt utilizate, în general, două abordări ale ultrasunetelor. Ultrasunetele de joasă putere (LPU), la frecvențe de peste 100 kHz, reprezintă o tehnică neinvazivă și pot fi aplicate pentru monitorizarea proceselor alimentare și evaluarea proprietăților fizico-chimice ale alimentelor, în timp ce ultrasunetele de înaltă putere (HPU), cu frecvențe între 18–100 kHz, produc efecte fizice, mecanice și chimice și pot oferi informații privind stabilitatea pe termen lung a sucurilor de fructe (*Dolatowski și colab., 2007*). Cel mai frecvent, domeniul ultrasunetelor de putere este utilizat în extracția compușilor biologic activi din matrici biologice, cum ar fi extracția polifenolilor din materiale vegetale și deșeuri alimentare. Majoritatea sondelor ultrasonice comerciale sau băilor de curățare funcționează la frecvențe joase (20–40 kHz) (*Dzah și colab., 2020*).

În plus, această cercetare evidențiază posibilitatea înlocuirii tratamentului termic convențional cu tratamentul cu ultrasunete de înaltă putere (HPU), ca instrument potențial pentru dezvoltarea unei tehnologii mai eficiente și mai sustenabile de procesare a sucurilor.

În concordanță cu considerentele menționate anterior, obiectivul acestui studiu a fost investigarea impactului pasteurizării și al tratamentului HPU asupra calității sucului de struguri roșii. În acest scop, conținutul de compuși bioactivi, precum compușii fenolici și acidul L-ascorbic, precum și caracteristicile fizico-chimice și proprietățile microbiologice ale probelor de suc de struguri pasteurizat au fost comparate cu cele ale probelor de suc supuse tratamentelor HPU la diferiți parametri, cum ar fi amplitudini de 50% (A50%) și 70% (A70%) pentru durate de 5 și 10 minute.

Efectele pasteurizării și ale tratamentelor cu ultrasunete de înaltă putere (HPU) asupra calității sucului de struguri roșii sunt discutate în funcție de compușii bioactivi, precum conținutul total de compuși fenolici (TP), acidul L-ascorbic (L-AsAc) sau conținutul de vitamina C, precum și profilul compușilor polifenolici. De asemenea, au fost investigate modificările parametrilor fizico-chimici, cum ar fi pH-ul, conținutul total de solide solubile (TSS) și aciditatea titrabilă (TA), precum și calitatea microbiologică, exprimată prin numărul total de germeni (TPC) și numărul de Enterobacteriaceae (ENT), ca răspuns la tratamentele aplicate.

Toți parametrii menționați au fost analizați atât pentru suc de struguri roșii netratat, utilizat ca probă martor (C), cât și pentru probe de suc supuse pasteurizării la 80°C timp de 2 minute (P), respectiv tratamentului cu ultrasunete la amplitudini de 50% și 70% pentru durate de 5 și 10 minute, după cum urmează: HPU (A50%, 5 min), HPU (A50%, 10 min), HPU (A70%, 5 min) și HPU (A70%, 10 min). Unii autori au constatat, de asemenea, că parametrii procesării cu ultrasunete, precum amplitudinea și durata, joacă un rol decisiv atât în extracția, cât și în menținerea compușilor bioactivi și în determinarea efectelor asupra caracteristicilor de calitate (*Khandpur și colab., 2015*).

Pentru a oferi o imagine de ansamblu asupra efectelor induse de pasteurizare și tratamentele HPU asupra parametrilor investigați, comparativ cu probele de suc de struguri netratate, rezultatele obținute în acest studiu au fost analizate prin testul ANOVA unifactorial.

a) Efectul parametrilor de operare ai tratamentelor HPU asupra temperaturii probelor de suc de struguri

Parametrii de operare utilizați în timpul tratamentelor cu ultrasunete de înaltă putere (HPU) pot influența temperatura probelor de suc de struguri. Valorile medii ale temperaturii, măsurate la fiecare 2,5 minute pentru probele de suc tratate ultrasonic, sunt prezentate în Tabelul 2.1, iar în Figurile 2.1 și 2.2 pot fi observate valorile înregistrate cu ajutorul unei camere cu infraroșu orientată frontal (FLIR), la finalul tratamentului de sonicare la amplitudini de 50% și 70%.

În timpul tratamentului cu ultrasunete, s-a acordat o atenție suplimentară măsurării căldurii generate în probe ca efect al sonicației. Pentru a controla acest aspect și creșterea corespunzătoare a temperaturii, a fost utilizată o cameră de termoviziune, pentru a se asigura că temperatura probelor nu depășește intervalul 60–66°C. Temperaturile mai mari de 70°C, în

special, s-au dovedit a conduce la degradarea rapidă a polifenolilor, de unde rezultă necesitatea selectării unor temperaturi eficiente de extracție care să asigure stabilitatea compușilor fenolici (Dzah și colab., 2020, Havlikova și colab., 1985, Mojzer și colab., 2016).

Tabelul 2.1. Modificările temperaturii probelor de suc ca urmare a parametrilor tratamentelor cu ultrasunete

Timpul de măsurare a temperaturii (min)	T (°C)	
	HPU(A50%, 5 min)	HPU(A70%, 5 min)
0	18,9 ± 0,85	19,7 ± 0,70
2,5	25,7 ± 0,90	36,9 ± 1,00
5	36,4 ± 1,20	50,1 ± 0,70

Timpul de măsurare a temperaturii (min)	T (°C)	
	HPU(A50%, 10 min)	HPU(A70%, 10 min)
0	17,2 ± 0,85	19,9 ± 0,20
2,5	25,8 ± 0,70	34,9 ± 1,00
5	33,8 ± 1,30	51,4 ± 0,90
10	50,2 ± 1,20	66,0 ± 1,10

Rezultatele sunt exprimate ca valoare medie a trei replicări ± deviația standard (SD).

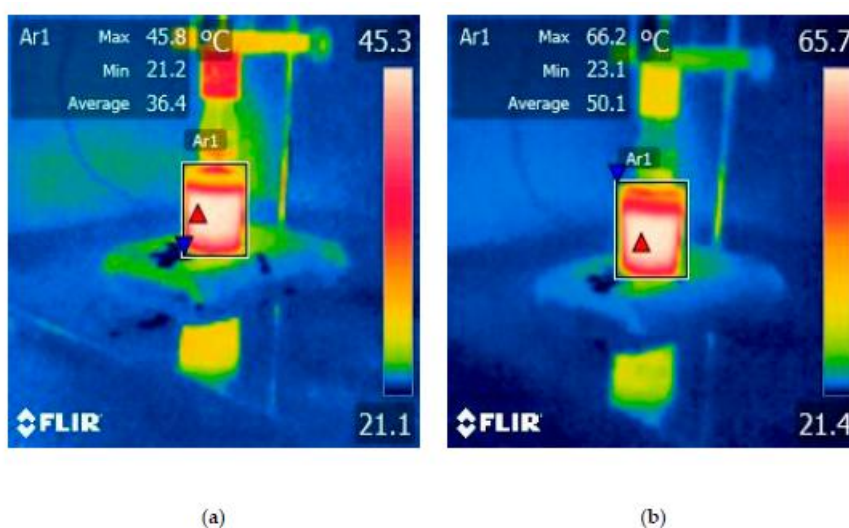


Figura 2.1 Temperatura măsurată după 5 minute de tratament HPU: (a) A50%; (b) A70%.

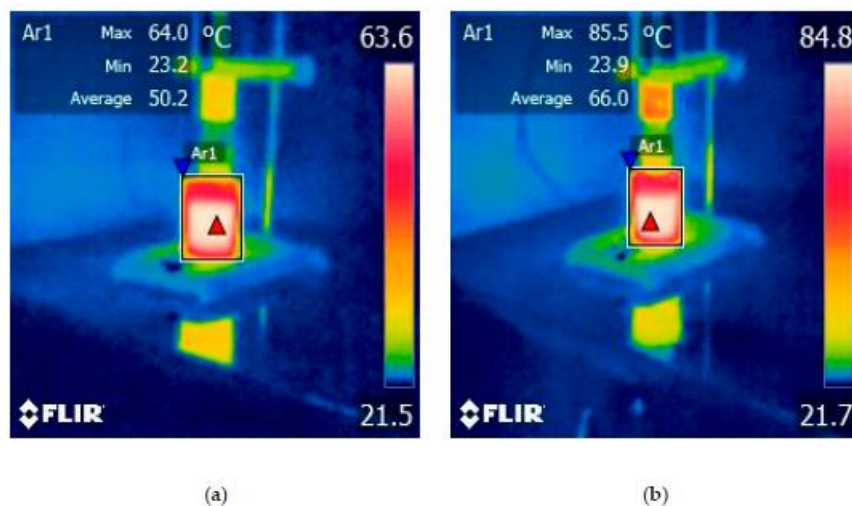


Figura 2.2 Temperatura măsurată după 10 minute de tratament HPU: (a) A50%; (b) A70%.

S-a observat că evoluția creșterii temperaturilor medii a fost liniară pentru ambele amplitudini, de 50% și 70%. Atunci când a fost aplicată amplitudinea mai mare, respectiv 70%, temperaturile medii au crescut cu 13,7°C pentru același tratament de sonicare de 5 minute și cu 15,8°C după 10 minute.

b) Efectele pasteurizării și ale tratamentelor HPU asupra conținutului total de compuși fenolici (TP), acid L-ascorbic (L-AsAc) și profilului compușilor polifenolici

În Tabelul 2.2 sunt prezentate valorile conținutului total de compuși fenolici (TP) și de acid L-ascorbic (L-AsAc) pentru probele de suc de struguri roșii după pasteurizare și tratamentele HPU. Aceste rezultate indică scăderi ale conținutului de TP, în raport cu proba martor, ca răspuns la tratamentele de pasteurizare și ultrasunete.

Tabelul 2.2 Efectul pasteurizării și al tratamentelor HPU asupra conținutului total de compuși fenolici (TP) și acid L-ascorbic (L-AsAc)

Parametrii	Probă de suc de struguri					
	C*	P**	HPU(A50%, 5 min)	HPU(A70%, 5 min)	HPU(A50%, 10 min)	HPU(A70%, 10 min)
TP (mg GAE/ 100 mL)	72,86 ± 0,02 ^a	70,64 ± 0,08 ^b	50,68 ± 0,05 ^c	54,56 ± 0,07 ^d	50,71 ± 0,09 ^c	69,88±0,02 ^e
L-AsAc (mg/L)	454,4 ± 0,11 ^a	340,8±0,09 ^b	227,2±0,04 ^c	349,8 ± 0,05 ^b	458,4 ± 0,10 ^a	568±0,08 ^d

În Figura 2.3 sunt ilustrate modificările conținutului de TP din probele de suc ca răspuns la tratamentele aplicate. Se poate observa că au existat pierderi ale conținutului de TP în probele de suc de struguri în urma pasteurizării, comparativ cu tratamentul cu ultrasunete. Astfel, Figura 2.3a evidențiază pierderile de TP induse de pasteurizare și tratamentele HPU în raport cu proba martor, în timp ce Figura 2.3b prezintă pierderile în probele supuse tratamentului HPU comparativ cu proba pasteurizată.

Un prim aspect observabil din datele din Figura 2.3a este că pasteurizarea a determinat cele mai mici scăderi ale conținutului de TP comparativ cu proba martor (3,05%), în timp ce tratamentele HPU (A50%, 5 min; A70%, 5 min și A50%, 10 min) au condus la pierderi în intervalul 25–30%. Este de remarcat faptul că tratamentul HPU (A70%, 10 min) are un efect apropiat de cel obținut prin pasteurizare în ceea ce privește pierderile de TP (4,09%).

O analiză mai detaliată a Figurii 2.3b arată că pierderile de TP induse de tratamentele HPU (A50%, 5 min; A70%, 5 min și A50%, 10 min) au fost în intervalul de aproximativ 22–28% comparativ cu proba pasteurizată. Tratamentul HPU (A70%, 10 min) a determinat cele mai mici pierderi de TP, de aproximativ 1% comparativ cu proba pasteurizată. Prin urmare, alegerea unui tratament HPU de 10 minute la o amplitudine de 70% poate îmbunătăți retenția compușilor fenolici totali în sucul de struguri.

Cu toate acestea, după tratamentul HPU (A70%, 10 min) s-a înregistrat o creștere a conținutului de L-AsAc până la 568 mg/L comparativ cu sucul de struguri netratat. O posibilă explicație ar fi eliminarea oxigenului dizolvat, esențial pentru degradarea acidului ascorbic, în timpul fenomenului de cavitație produs prin tratamentul de sonicare (*Cruz-Cansino și colab., 2015*), ceea ce previne degradarea acestuia.

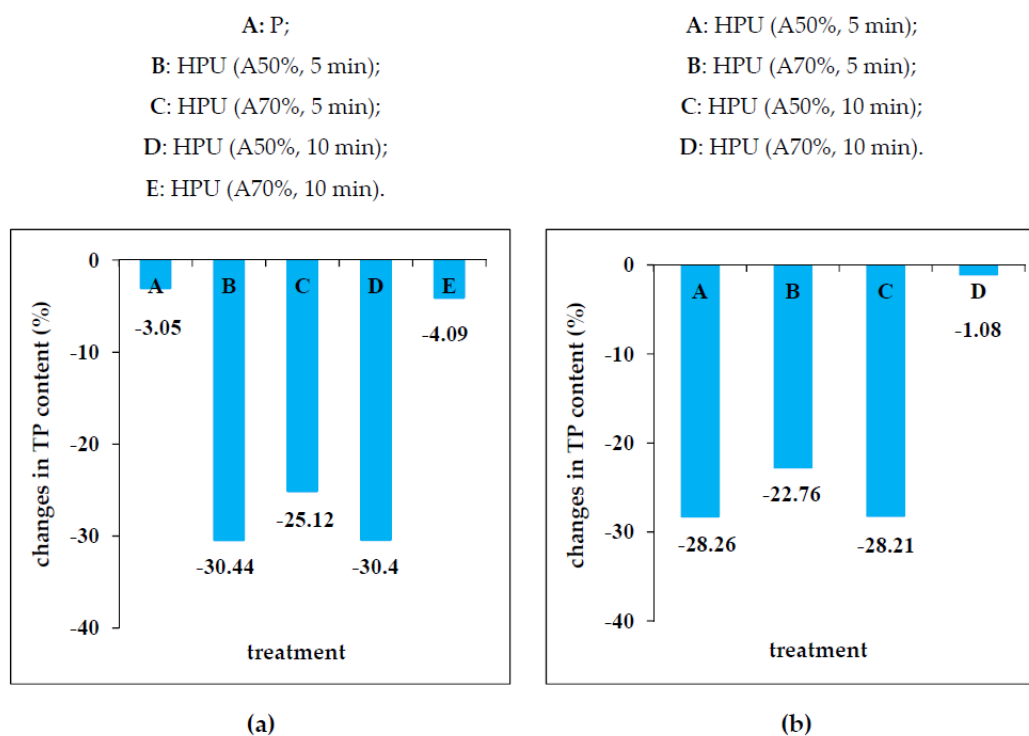


Figura 2.3 Modificările conținutului total de compuși fenolici (TP) din probele de suc ca răspuns la tratamentele aplicate: (a) raportate la proba martor (C); (b) raportate la proba pasteurizată (P).

Figura 2.4 oferă informații privind modificările conținutului de L-AsAc în probele de suc ca răspuns la tratamentele aplicate. Se poate observa că, prin expunerea sucului de struguri la pasteurizare, comparativ cu tratamentele cu ultrasunete, au fost înregistrate atât scăderi, cât și creșteri ale conținutului de L-AsAc. Efectul pasteurizării și al tratamentelor HPU asupra

conținutului de L-AsAc, raportat la proba martor, este prezentat în Figura 4a. De asemenea, modificările conținutului de L-AsAc în probele de suc supuse tratamentelor HPU, comparativ cu proba pasteurizată, sunt ilustrate în Figura 2.4b.

Datele noastre arată că pasteurizarea și tratamentele HPU (A50%, 5 min; A70%, 5 min) au determinat scăderi ale conținutului de L-AsAc de 25%, 50% și, respectiv, 23,02% față de proba martor. În contrast, aplicarea tratamentelor HPU (A50%, 10 min; A70%, 10 min) a condus la creșteri ale conținutului de L-AsAc de 0,88% și, respectiv, 25% comparativ cu proba martor (Figura 2.4a). În ceea ce privește modificările conținutului de L-AsAc induse de tratamentele HPU în raport cu proba pasteurizată, datele din Figura 2.4b arată că pierderi au fost observate doar în cazul tratamentului HPU (A50%, 5 min). Aplicarea celorlalte tratamente HPU (A70%, 5 min; A50%, 10 min; A70%, 10 min) a dus la creșteri ale conținutului de L-AsAc comparativ cu proba pasteurizată, după cum urmează: 2,64%, 34,51% și 66,67%. Aceste date evidențiază faptul că tratamentul HPU (A70%, 10 min) a fost cel mai eficient dintre tratamentele investigate pentru a asigura un conținut ridicat de vitamina C în suc de struguri.

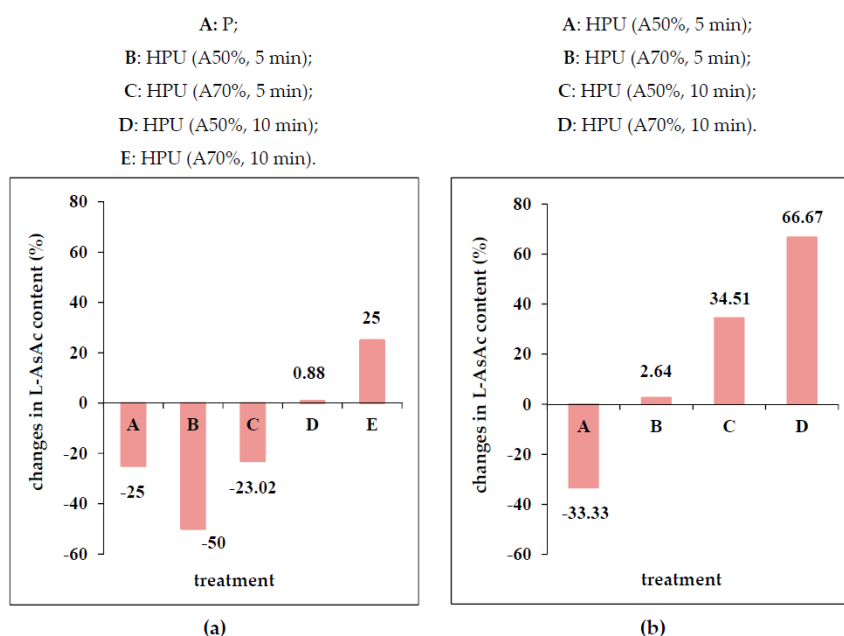


Figura 2.4 Modificările conținutului de acid L-ascorbic (L-AsAc) din probele de suc ca răspuns la tratamentele aplicate: (a) raportate la proba martor (C); (b) raportate la proba pasteurizată (P).

Polifenolii joacă un rol important în compoziția strugurilor roșii, deoarece determină aroma și culoarea sucului (Heinmaa și colab., 2017; Nicolas și colab., 1994) și au numeroase proprietăți benefice pentru sănătatea umană (Heinmaa și colab., 2017; Onakpoya și colab., 2015). Evoluția compușilor fenolici individuali din suc de struguri roșii este prezentată în Tabelul 2.3. Dintre compușii fenolici, cel mai cunoscut este resveratrolul. Cantități semnificativ mai mari de resveratrol au fost observate în probele de suc de struguri expuse tratamentului cu ultrasunete, în special la condiția A70%, 5 min (8,54 mg/L). Resveratrolul nu a fost detectat în proba de suc supusă pasteurizării, ceea ce sugerează că acest compus a fost distrus în timpul tratamentului termic. O creștere a conținutului de resveratrol în urma procesării sucului de struguri prin ultrasunete a fost raportată și de Hasan și colab. (Hasan și colab., 2014). O ușoară creștere a acidului cafeic a fost raportată în suc de mere limpezit tratat prin omogenizare la presiune

ultra-înaltă, o tehnică non-termică (Suárez-Jacobo și colab., 2011), precum și într-un studiu privind tratamentul sucului de mere cu ultrasunete la amplitudine de 70% și frecvență de 25 kHz (Abid și colab., 2014). Se observă, de asemenea, o creștere a conținutului de acid galic de la 2,15 mg/L în proba martor la 2,16 mg/L în probele pasteurizate și la 31,3 mg/L în proba de suc supusă tratamentului HPU (A70%, 5 min). Cele mai ridicate niveluri de acid protocatechuic (5,13 mg/L), epicatechină (76,80 mg/L), acid p-cumaric (1,20 mg/L), rutină (63,31 mg/L), acid rosmarinic (25,93 mg/L), quercetină (5,62 mg/L) și kaempferol (4,59 mg/L) au fost, de asemenea, detectate în probele de suc tratate cu HPU (A70%, 5 min). Compușii fenolici pot fi prezenți fie în formă solubilă în vacuole, fie legați de alți constituenți precum celuloza, hemiceluloza, pectina și urmele de lignină din peretele celular (Cruz-Cansino și colab., 2015). Creșterea conținutului de polifenoli în probele de suc sonicat poate fi atribuită eficienței mai mari de extracție a ultrasunetelor, care determină distrugerea pereților celulari și eliberarea compușilor polifenolici legați (Abid și colab., 2013; , Kataoka, 2010). De asemenea, tratamentul cu ultrasunete poate favoriza eliberarea compușilor fenolici din pereții celulari, datorită colapsului generat prin procesul de cavitație în jurul particulelor coloidale prezente în suc (Cruz-Cansino și colab., 2015).

Antocianinele, cei mai relevanți compuși polifenolici din strugurii roșii, cu structuri glicozidice de tip flavonoidic, prezintă un comportament similar în condiții de încălzire, iar degradarea lor depinde de temperatură și pH (Adams, 1973). La pH = 1, toate legăturile glicozidice sunt susceptibile la hidroliză, în timp ce la valori ale pH-ului cuprinse între 2–4, specifice sucului de struguri, legătura aglicon–zahăr este cea mai instabilă dintre legăturile glicozidice (Adams, 1973). Aceasta înseamnă că, în condițiile noastre de lucru, antocianinele sunt mai puțin susceptibile la degradare comparativ cu flavonoidele, ceea ce ar putea justifica tendința de creștere a conținutului total de polifenoli în raport cu compușii polifenolici individuali analizați. În plus, creșterea conținutului total de polifenoli poate fi atribuită și acizilor hidroxicinamici, al căror conținut poate crește odată cu amplitudinea, respectiv cu temperatura.

Conform rezultatelor raportate, se poate observa că atât timpul de procesare cu ultrasunete, cât și amplitudinea sunt factori influenți în conservarea conținutului de principii active. Datele noastre arată că tratamentul HPU cu amplitudine de 70% timp de 10 minute a condus la o creștere a conținutului de TP și L-AsAc comparativ cu 5 minute, în timp ce tratamentul HPU (A70%, 5 min) ar putea favoriza creșterea nivelurilor unor flavonoide precum rutin, quercetină, epicatechină și kaempferol, precum și a resveratrolului, un compus natural stilben întâlnit în sucul de struguri. În același timp, unii acizi hidroxicinamici, precum acidul ferulic și acidul cafeic, se regăsesc în concentrații mai ridicate după expunerea sucului de struguri la tratamentul HPU (A70%, 10 min).

Tabelul 2.3 Efectul pasteurizării și al tratamentelor HPU asupra profilului compușilor polifenolici din probele de suc de struguri.

Compuși polifenolici (mg/L)	Probă de suc de struguri					
	C*	P**	HPU(A50%, 5 min)	HPU(A70%, 5 min)	HPU(A50%, 10 min)	HPU(A70%, 10 min)
Acid galic	2,15 ± 0,03 ^a	2,16 ± 0,05 ^a	15,23 ± 0,04 ^b	31,30 ± 0,07 ^c	12,82 ± 0,09 ^b	19,49±0,09 ^c

Acid protocatechuic	n.d	2,08±0,35 ^a	n.d	5,13 ± 0,05 ^b	0,79 ± 0,44 ^c	n.d
Acid cafeic	0,93 ± 0,21 ^a	2,62 ± 0,37 ^a	1,30 ± 0,52 ^a	14,31 ± 0,06 ^{ab}	4,41 ± 0,08 ^{ab}	23,27±0,04 ^{ab}
Epicatechină	3,70 ± 0,16 ^a	10,70 ± 0,33 ^a	5,45 ± 0,15 ^a	76,80 ± 0,07 ^{ab}	n.d	35,31±0,54 ^{ab}
Acid p-cumaric	0,28 ± 0,03 ^a	0,1 ± 0,11 ^a	0,04 ± 0,04 ^a	1,20 ± 0,04 ^a	1,13 ± 0,05 ^a	n.d
Acid ferulic	0,27 ± 0,01 ^a	0,32 ± 0,03 ^a	n.d	n.d	n.d	0,81 ± 0,12 ^b
Rutin	2,09 ± 0,11 ^b	2,51 ± 0,6 ^a	9,6 ± 0,1 ^a	63,31 ± 0,02 ^b	n.d	39,02 ± 0,1 ^{ab}
Acid rosmarinic	n.d	n.d	1,19 ± 0,06 ^a	25,93 ± 0,21 ^b	0,39 ± 0,08 ^a	4,31 ± 0,05 ^b
Resveratrol	0,21 ± 0,12 ^a	n.d	0,65 ± 0,13 ^{ab}	8,54 ± 0,14 ^b	0,80 ± 0,06 ^{ab}	2,48 ± 0,04 ^b
Quercetină	0,38 ± 0,07 ^a	n.d	n.d	5,62 ± 0,02 ^b	0,31 ± 0,08 ^a	0,71 ± 0,03 ^{ab}
Kaempferol	0,83 ± 0,05 ^a	0,92 ± 0,06 ^a	n.d	4,59 ± 0,12 ^b	n.d	n.d

* Probă martor; ** Probă de suc pasteurizat; n.d. – nedetectat. Testul ANOVA unifactorial a fost utilizat pentru compararea diferențelor dintre mediile tratamentelor; superscriptele diferite din același rând indică diferențe semnificative între tratamente (testul Tukey, $p < 0,05$). Rezultatele sunt exprimate ca valoarea medie a trei replicări ± deviația standard (SD).

c) Efectele pasteurizării și ale tratamentelor HPU asupra pH-ului, solidelor solubile totale (TSS) și acidității titrabile (TA)

Parametrii fizico-chimici precum pH-ul, conținutul total de solide solubile (TSS) și aciditatea titrabilă (TA) ai sucului de struguri netratat și pasteurizat, precum și ai sucului de struguri tratat timp de 5 și 10 minute cu diferite amplitudini ale ultrasunetelor (A50% și A70%), sunt prezentați în Tabelul 2.4.

Tabelul 2.4. Efectele tratamentelor cu ultrasunete și ale pasteurizării asupra pH-ului, conținutului total de solide solubile (TSS) și acidității titrabile (TA)

Parametrii	Probă de suc de struguri					
	C*	P**	HPU(A50%, 5 min)	HPU(A70%, 5 min)	HPU(A50%, 10 min)	HPU(A70%, 10 min)
pH	3,62 ± 0,01 ^a	3,59 ± 0,01 ^b	3,52 ± 0,01 ^c	3,51 ± 0,01 ^c	3,50 ± 0,01 ^d	3,50 ± 0,01 ^d
TSS (°Brix)	30,18 ± 0,13 ^a	30,73 ± 0,09 ^a	26,47 ± 0,09 ^{bc}	27,73 ± 0,09 ^b	27,13 ± 0,05 ^{abc}	29,67±0,09 ^{ab}
TA (g acid tartric/L)	3,75 ± 0,07 ^a	4,23 ± 0,08 ^b	3,79 ± 0,03 ^a	3,97 ± 0,12 ^{abc}	3,94 ± 0,16 ^{ab}	4,18 ± 0,11 ^{bc}

*Probă martor; **Probă de suc pasteurizat. Testul ANOVA unifactorial a fost utilizat pentru compararea diferențelor dintre medii între tratamente; literele superscrise diferite din același rând indică diferențe semnificative între tratamente (testul Tukey, $p < 0,05$). Rezultatele sunt exprimate ca valoarea medie a trei replici ± deviația standard (SD).

Rezultatele sugerează că tratamentul HPU determină modificări ale probelor, deoarece pH-ul a scăzut odată cu creșterea amplitudinii și a timpului de tratament. Totuși, valoarea pH-ului în rândul probelor sonicate a fost influențată semnificativ de timpul de tratament ($p < 0,001$) și nu a fost influențată de nivelul amplitudinii ($p > 0,05$). De asemenea, valorile pH-ului înregistrate pentru toate probele de suc supuse tratamentelor HPU au fost semnificativ diferite față de cele înregistrate pentru probele C (martor) și P (pasteurizate) ($p < 0,001$).

Conținutul de solide solubile totale (TSS) al probelor tratate cu diferite amplitudini și durate de tratament indică o scădere comparativ cu sucul pasteurizat. În cazul probelor sonicate, rezultatele au sugerat că TSS a crescut odată cu amplitudinea și timpul, valoarea probei sonicate la amplitudine de 70% timp de 10 minute fiind cu 1,71% mai mică decât cea a sucului pasteurizat. Deși tratamentul HPU a determinat modificări ușoare ale probelor, statistic, conținutul de TSS în rândul probelor sonicate a fost influențat semnificativ de nivelul amplitudinii ($p < 0,001$) și nu de timpul de tratament ($p > 0,05$). De asemenea, toate probele HPU au fost semnificativ diferite față de proba P ($p < 0,001$).

O valoare mai ridicată a acidității titrabilă (TA) a fost observată pentru probele pasteurizate. În cazul probelor sonicate, rezultatele au indicat că TA a crescut odată cu amplitudinea și timpul, valoarea probei sonicate la o amplitudine de 70% timp de 10 minute fiind cu 1,18% mai mică decât valoarea înregistrată pentru sucul pasteurizat. TA în rândul probelor sonicate a fost influențată semnificativ atât de nivelul amplitudinii, cât și de timpul de tratament ($p < 0,05$).

După cum s-a menționat anterior, din date reiese clar că diferitele combinații de frecvență ultrasonică și timp de expunere au efecte ușoare asupra pH-ului, TSS și TA ale sucului de struguri. Zaharurile sunt principalii constituenți ai sucurilor de fructe, reprezentând un atribut important de calitate și influențând acceptarea sau respingerea unui produs de către consumatori.

În ceea ce privește aciditatea titrabilă (TA), rezultatele noastre nu sunt similare cu cele observate de alți autori în must de struguri (*Lieu și colab., 2010*), suc de mere-morcov (*Gao și colab., 2012*) și struguri (*Palma și colab., 2002*), ceea ce sugerează că tratamentul cu ultrasunete a crescut extracția acidului tartric. Această diferență poate fi atribuită faptului că în studiul nostru s-a utilizat ultrasunete de înaltă putere la o frecvență fixă de 20 kHz.

d) Calitatea microbiologică

Aplicarea tratamentelor de sonicare a fost recunoscută ca o tehnologie inovatoare potențială care poate îndeplini cerințele Food and Drug Administration (FDA) privind obținerea unei reduceri de 5 log a microorganismelor contaminante (sau patogene) asociate sucurilor de fructe (*Bhat și colab., 2016; Salleh-Mack și colab., 2007*). Calitatea microbiologică a probelor de suc de struguri a fost evaluată pe baza a doi indicatori, și anume numărul total de germeni (TPC) și numărul de Enterobacteriaceae (ENT).

În Tabelul 2.5 se poate observa o reducere a încărcăturii microbiene după pasteurizare și tratamentele cu ultrasunete aplicate sucului de struguri roșii. Proba martor a prezentat valori de 4,53 log UFC/mL pentru TPC și 1,51 log UFC/mL pentru ENT. Microorganismele au fost reduse atât în proba de suc pasteurizat (TPC 2,53 log UFC/mL și ENT 0,73 log UFC/mL), cât și în toate probele supuse tratamentelor HPU. TPC și ENT în probele sonicate au fost influențate

semnificativ de timpul de tratament și de nivelul amplitudinii ($p < 0,001$). Datele din Tabelul 5 arată că atât TPC, cât și ENT au scăzut față de proba martor odată cu creșterea amplitudinii de la 50% la 70%, precum și odată cu creșterea timpului de sonicare de la 5 la 10 minute. Cele mai scăzute valori ale încărcăturii bacteriene (TPC: 1,13 log UFC/mL și ENT: 0,53 log UFC/mL) au fost înregistrate după aplicarea tratamentului HPU (A70%, 10 min). Rezultate similare au fost raportate și de alți autori (*Bhat și colab., 2011; Bhat și colab., 2016; Zafra-Rojas și colab., 2013*), arătând că încărcătura microbiană scade odată cu creșterea timpului de procesare cu ultrasunete. Acest lucru sugerează că celulele microbiene pot prezenta rezistență la tratamentul de sonicare, iar distrugerea lor are loc mai eficient doar atunci când durata tratamentului este prelungită. Distrugerea celulară poate fi cauzată de mai mulți factori, precum mecanisme fizice și chimice combinate care apar în timpul cavitației (indusă de variațiile de presiune), formarea de radicali liberi și peroxid de hidrogen (*Zafra-Rojas și colab., 2013; Oyane și colab., 2009*), ceea ce duce la subțierea membranelor celulare microbiene, precum și la încălzirea localizată moderată ce apare în timpul tratamentului ultrasonic (*Bhat și colab., 2016; Oyane și colab., 2009*).

Tabelul 2.5. Impactul tratamentelor de pasteurizare și HPU asupra numărului total de germeni aerobi mezofili (TPC) și asupra numărului de Enterobacteriaceae (ENT) din suc de struguri

Parametrii	Probă de suc de struguri					
	C*	P**	HPU(A50%, 5 min)	HPU(A70%, 5 min)	HPU(A50%, 10 min)	HPU(A70%, 10 min)
TPC (log UFC/mL)	4,53 ± 0,01 ^a	2,53 ± 0,07 ^b	2,18 ± 0,03 ^{cd}	1,42 ± 0,02 ^{cd}	1,63 ± 0,02 ^c	1,13 ± 0,04 ^c
ENT (log UFC/mL)	1,51 ± 0,01 ^a	0,73 ± 0,04 ^{ab}	1,45 ± 0,05 ^{ab}	0,69 ± 0,03 ^{ab}	1,27 ± 0,02 ^{acd}	0,53 ± 0,0 ^{acd}

*Probă martor; ** probă de suc pasteurizat. Testul ANOVA unifactorial a fost utilizat pentru compararea diferențelor dintre medii între tratamente; literele superscrise diferite din același rând indică diferențe semnificative între tratamente (testul Tukey, $p < 0,05$). Rezultatele sunt exprimate ca valoarea medie a trei replici ± deviația standard (SD).

e) Prepararea sucului de struguri

Strugurii roșii proaspeți (Merlot, proveniți de la Stațiunea de Cercetare-Dezvoltare pentru Viticultură și Vinificație Pietroasa, județul Buzău, România) au fost separați de ciorchini și zdrobiți cu ajutorul unui zdrobitor-dezbrobitor (Enoventa Technologies Enologice, Piazzola sul Brenta, Italia), urmați de procesul de presare cu o presă hidraulică (L.U.C.M.E. Elettromeccanica, Verona, Italia). Au fost utilizate doar fructe fără deteriorări externe. Extracția sucului și filtrarea au fost realizate într-o cameră frigorifică la o temperatură de $10 \pm 1^\circ\text{C}$. Sucul de struguri roșii obținut a fost ulterior supus tratamentelor de pasteurizare și HPU. Ca probă martor a fost utilizat suc de struguri roșii înainte de aplicarea oricărui tratament.

Probele martor, precum și probele pasteurizate și cele tratate cu ultrasunete au fost păstrate în recipiente sterilizate, etanșe (sticle) și depozitate la 4°C până la analizele ulterioare. Toate preparările și tratamentele probelor au fost realizate în triplicat (*Bhat și colab., 2016*).

f) Procesul de pasteurizare

Pasteurizarea probelor de suc de struguri a fost realizată pe o plită cu agitator magnetic (IKA RTC Basic, Ika-Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, Germania), unde probele (150 mL) au fost plasate în recipiente din sticlă acoperite cu folie de aluminiu și încălzite în baie de apă la temperatura de 80°C timp de 2 minute. Această temperatură a fost aleasă pe baza rezultatelor raportate anterior (*Jambrak și colab., 2017*).

g) Echipamentul cu ultrasunete și procesarea

Tratamentele cu ultrasunete au fost realizate utilizând un procesor ultrasonic de 750 W pentru aplicații de volum mic și mediu (VCX 750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, SUA), echipat cu o sondă de 1/2" (13 mm) care operează la o frecvență constantă de 20 kHz. O probă de 150 mL a fost plasată într-un pahar de sticlă, iar sonda ultrasonică a fost fixată la o adâncime de 45 mm în probă. Amplitudinea a fost setată la 50% (A50%) și 70% (A70%), iar pentru fiecare dintre aceste amplitudini probele de suc au fost expuse la ultrasunete timp de 5 și 10 minute.

h) pH, solide solubile totale (TSS) și aciditate titrabilă (TA)

pH-ul a fost măsurat prin metoda electrochimică (*Webster, 2003*), utilizând un potențiometrul (Consort C1010, Consort, Turnhout, Belgia). Aciditatea titrabilă (TA) și solidele solubile totale (TSS) ale probelor de suc de struguri roșii au fost determinate conform metodelor de referință OIV. Solidele solubile totale (°Brix) au fost măsurate cu un refractometru ABBE (ORT 1RS, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Germania). Testele de aciditate titrabilă au fost efectuate pe alicote de 50 mL probă, 30 mL apă distilată fiartă și 1 mL soluție de albastru de bromtimol, plasate într-un pahar de 250 mL și titrate cu soluție standardizată de NaOH 0,1 mol/L (Sigma-Aldrich, Dublin, Irlanda), până la obținerea aceleiași culori ca în testul preliminar (determinarea punctului final). Rezultatele au fost exprimate în g acid tartric/L de suc.

i) Conținutul de acid L-ascorbic (L-AsAc)

Determinarea acidului L-ascorbic (L-AsAc) sau a vitaminei C din probele de suc de struguri investigate a fost realizată prin metoda titrimetrică cu 2,6-diclorofenolindofenol (*AOAC, 2000*). În acest scop, 10 mL din fiecare probă au fost diluați cu 10 mL de acid oxalic 2% (Sigma-Aldrich), apoi amestecul a fost filtrat prin hârtie de filtru Whatman, iar extractul clar obținut a fost utilizat pentru analiză. Ulterior, s-au prelevat 10 mL din extractul clar și s-a adăugat 1 mL acid clorhidric 1N (ReAgent Chemicals, Runcorn, Marea Britanie). Amestecul obținut a fost titrat cu soluție de 2,6-diclorofenolindofenol sodic (Sigma-Aldrich). A fost efectuată și titrarea unei probe martor. Rezultatele au fost exprimate în mg/L de suc.

j) Determinarea conținutului total de compuși fenolici (TP) și a profilului compușilor polifenolici

Conținutul total de compuși fenolici a fost determinat prin testul Folin-Ciocalteu (*Singleton și colab., 1999*). În acest scop, 0,5 mL de probă au fost tratați cu 1,25 mL reactiv Folin-Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germania), diluat 1:10 cu apă. Proba a fost incubată timp de 5 minute la

temperatura camerei, după care s-a adăugat 1 mL Na_2CO_3 60 g/L. După 30 de minute de incubare la 50°C, absorbția probelor a fost măsurată la 750 nm utilizând un spectrofotometru UV-VIS (Specord 205, Analytic Jena, Jena, Germania). Curba de calibrare a fost realizată utilizând acid galic ca standard, în intervalul de concentrații 5–250 $\mu\text{g/mL}$. Rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți acid galic (GAE)/100 mL de suc.

Profilul compușilor polifenolici a fost determinat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS), conform metodei descrise de Abdel-Hameed et al. (Abdel-Hameed și colab., 2013).

k) Analiza microbiologică

Numărul total de germeni (TPC) și numărul de Enterobacteriaceae (ENT) au fost determinate pentru evaluarea calității microbiologice a probelor. Analizele au fost realizate în triplicat conform metodologiei stabilite de American Public Health Association. Probele au fost colectate aseptice într-un recipient steril, imediat după procesare. Pentru pregătirea probelor, s-a realizat omogenizarea pentru asigurarea distribuției uniforme a microorganismelor, urmată de cinci diluții succesive (10^{-5}), utilizând apă distilată sterilă ca lichid de diluție. Determinarea TPC s-a realizat conform SR EN ISO 4833 utilizând mediul Plate Count Agar (PCA), iar detectarea Enterobacteriaceae conform ISO 21528-1,2 utilizând mediul VRBG (agar cu violet roșu biliar glucoză). Mediul PCA permite creșterea germenilor aerobi, în timp ce mediile selective inhibă dezvoltarea altor microorganisme, precum drojdii și mucegaiuri. După însămânțarea a două plăci Petri pentru fiecare diluție serială, acestea au fost incubate pentru perioade diferite: 72 ore pentru TPC la 30°C și 37°C, respectiv 24 ore pentru Enterobacteriaceae la 37°C (Lupu și colab., 2018). Rezultatele au fost exprimate în log unități formatoare de colonii per mililitru de suc (log UFC/mL).

l) Analiza datelor

Toate valorile au fost obținute din trei experimente independente, iar fiecare probă de suc de struguri roșii a fost analizată în triplicat. Rezultatele sunt prezentate ca valori medii $\pm$ deviația standard (SD) a celor trei replicări. Testul de analiză a varianței (ANOVA) unifactorial a fost utilizat pentru analiza datelor și pentru evaluarea diferențelor dintre mediile obținute în urma tratamentelor aplicate. Diferențele au fost comparate prin testul Tukey, cu un nivel de semnificație de $p < 0,05$. Analiza statistică a datelor a fost realizată utilizând software-ul JASP (versiunea 0.11.1, 2019) (JASP Team, Universitatea din Amsterdam, Amsterdam, Țările de Jos).

Ca și concluzii, rezultatele obținute arată că, în comparație cu pasteurizarea, tratamentul HPU a îmbunătățit semnificativ conținutul de compuși polifenolici individuali și conținutul de L-AsAc, fără a avea un efect semnificativ asupra pH-ului, acidității titrabilă (TA) și solidelor solubile totale (TSS). De asemenea, tratamentul HPU a determinat reduceri importante ale încărcăturii microbiene, fără a afecta compușii bioactivi investigați și parametrii fizico-chimici ai probelor de suc de struguri, în comparație cu pasteurizarea. Rezultatele analizei TPC și ENT ale probelor sonicate au fost influențate semnificativ de timpul de tratament și nivelul amplitudinii. Calitatea sucului de struguri roșii este influențată de alegerea parametrilor adecvați ai tratamentului ultrasonic. Tratamentele cu ultrasunete la amplitudinea de 70% au

fost mai eficiente decât cele la A50% în ceea ce privește toți parametrii analizați. În ceea ce privește timpul de procesare, rezultatele noastre arată că, deși tratamentul HPU (A70%, 5 min) este recomandat pentru creșterea nivelului de flavonoide precum rutină, quercetină, epicatechină, kaempferol, precum și resveratrol, tratamentul HPU (A70%, 10 min) a fost cel mai eficient pentru reducerea încărcăturii microbiene și obținerea celui mai ridicat conținut de L-AsAc și TP, împreună cu un nivel crescut de acizi hidroxicinamici precum acidul ferulic și acidul cafeic. Datele raportate în acest studiu sugerează că tratamentul HPU ar putea fi utilizat ca o tehnică emergentă alternativă pentru înlocuirea cu succes a pasteurizării în vederea îmbunătățirii calității sucului de struguri roșii. Totuși, sunt necesare studii suplimentare pentru stabilirea celor mai adecvați parametri de operare ai tratamentului HPU, astfel încât aceștia să fie în concordanță cu cerințele naționale și internaționale privind încărcătura microbiană și prelungirea duratei de valabilitate a sucului de struguri.

1.2.1.1.2 Optimization of A Procedure to Improve the Extraction Rate of Biologically Active Compounds in Red Grape Must Using High-Power Ultrasound, 2023, Sustainability, 15 (8), 6697. <https://www.mdpi.com/2071-1050/15/8/6697>

Pentru a satisface preferințele senzoriale variate ale consumatorilor, este esențială capacitatea de a produce mai multe tipuri de vin roșu, iar producătorii de vin își adaptează în mod continuu tehnicile de vinificație în acest scop. În producerea vinurilor roșii de înaltă calitate, extracția compușilor din struguri, proces care poate fi realizat prin diverse metode, reprezintă obiectivul principal (*Ntuli și colab., 2023*).

În prezent, se urmărește implementarea tuturor tehnologiilor menite să faciliteze extracția culorii și a compușilor aromatici pe parcursul procesului de vinificație. Prin aplicarea tehnologiei ultrasonice, se explorează potențialul extracției continue a substanțelor cu valoare calitativă din exocarp, utilizând fenomenele generate de propagarea ultrasunetelor într-un mediu solid-lichid, precum mustul de struguri (*Chemat și colab., 2017*).

Obiectivul acestui studiu a fost investigarea randamentului de extracție al compușilor biologic activi din struguri zdrobiți, ca rezultat al unui tratament ultrasonic aplicat în etapele inițiale ale procesului de vinificație, înainte de macerare. În plus, scopul a fost identificarea parametrilor de proces optimizați în funcție de amplitudine (A) % și timpul de tratament (t), la scară de laborator, precum și dezvoltarea unei proceduri care să îmbunătățească atât rata de extracție a compușilor bioactivi din struguri, cât și proprietățile antioxidante ale mustului de struguri. În acest sens, au fost evaluați inițial fitochimicalii cu valoare ridicată, precum compușii fenolici totali (TPC), care sunt în general asociați cu proprietățile organoleptice ale vinurilor finite și cu stabilitatea acestora. De asemenea, au fost cuantificate antocianinele monomerice (MA), responsabile pentru culoarea roșie a vinurilor roșii. În plus, a fost evaluată activitatea antioxidantă; dintre toate funcțiile biologice posibile ale compușilor din *Vitis vinifera*, atât capacitatea antioxidantă de reducere a fierului (FRAP), cât și activitatea de neutralizare a radicalilor liberi 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) sunt probabil cele mai relevante în raport cu sănătatea umană.

a) Proiectarea optimizării

Designul experimental a fost realizat cu ajutorul software-ului Design Expert® versiunea 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, SUA, 2022), pentru a optimiza numărul experimentelor și condițiile de operare.

Pe baza rezultatelor experimentului cu factor unic, a fost conceput un design de optimizare. Pentru aceste experimente, a fost utilizată Metodologia Suprafeței de Răspuns (RSM) în cadrul unui model de tip design compozit central (Central Composite Design – CCD). Cei doi factori ale căror efecte au fost studiate sunt amplitudinea (A) % și timpul de tratament (t).

Având în vedere factorii menționați anterior, nivelurile variabilelor independente, precum amplitudinea procentuală (A) și timpul de sonicare (t), au fost stabilite la 50%, 70% și 90% pentru timpi de tratament de 3, 4 și 5 minute (Tabelul 2.6). Variabilele dependente au fost TPC, MA și activitatea antioxidantă, exprimată prin testele FRAP și DPPH.

Tabelul 2.6 Condițiile de tratament pentru extracția ultrasonică

Variabile independente				
Diametrul sondei (mm)	Frecvența (kHz)	Amplitudine (A)%	Timp Tratament (t) min	Variabile dependente
20	20	50	3	TPC
		70	4	MA
		90	5	FRAP
				DPPH

b) Prepararea probelor

Pentru testele de laborator, probele de struguri colectate aleatoriu (100 g) au fost desciorchinate, zdrobite manual și apoi tratate cu ajutorul unui dispozitiv ultrasonic de tip sondă. Proba de control (C), care nu a fost supusă tratamentului ultrasonic, a fost evaluată separat. Probele au fost tratate într-un pahar de sticlă Pyrex de 100 mL, prevăzut cu o manta de răcire cu apă în contracurent. Apa utilizată pentru răcire a fost menținută la o temperatură constantă de 19 °C. Poziționarea amplificatorului acustic în recipient a fost standardizată la o distanță de 20 mm față de fundul acestuia. La finalul tratamentului ultrasonic, probele au fost filtrate în vid (Nalgene Rapid-Flow Filter Units, membrană PES de 0,45 μm). Filtratul a fost colectat într-un flacon și păstrat la frigider, la 4 °C, pentru analize ulterioare. Toate experimentele de extracție au fost realizate în acest mod.

c) Determinarea conținutului total de polifenoli și a antocianinelor

Conținutul total de polifenoli (TPC) a fost determinat prin metoda spectrofotometrică Folin–Ciocalteu, utilizând acidul galic ca standard de referință și exprimând rezultatele în micrograme echivalenți acid galic per mililitru (μg GAE/mL) (Singleton și colab., 1999). O probă de 0,5 mL a fost tratată cu 1,25 mL reactiv Folin–Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germania), diluat anterior 1:10 (v/v) cu apă distilată. După o incubare de 5 minute la temperatura camerei, s-a adăugat 1 mL soluție Na₂CO₃ 60 g/L. Absorbanța probelor a fost determinată la 750 nm cu ajutorul unui spectrofotometru UV–VIS (Specord 205, Analytik Jena Inc., Jena, Germania), după 30 de minute

de incubare la temperatura de 50°C. Curba de calibrare a fost stabilită utilizând acidul galic ca standard, la concentrații cuprinse între 5 și 250 µg GAE/mL.

Antocianinele monomerice (MA) au fost determinate prin metoda diferențială de pH (*Lee și colab., 2005*).

d) Activitatea antioxidantă

Activitatea antioxidantă a probelor investigate a fost evaluată prin testele FRAP și DPPH.

• Testul FRAP

Protocolul testului FRAP a fost bazat pe metoda descrisă de Benzie și Strain (*Benzie și colab., 1996*). În acest scop, au fost utilizate soluții stoc de tampon acetat 300 mM (pH = 3,6), soluție TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină) 10 mM în HCl 40 mM și soluție FeCl₃ × 6H₂O 20 mM. Soluția de lucru a fost preparată prin amestecarea a 100 mL tampon acetat, 10 mL soluție TPTZ și 10 mL soluție FeCl₃ × 6H₂O, fiind ulterior încălzită la 37°C înainte de utilizare.

Înainte de analiză, probele de vin au fost diluate 1:50 (v/v) cu apă distilată, apoi 0,5 mL din probele diluate au fost lăsate să reacționeze cu 2,5 mL soluție de lucru timp de 30 minute la 37 °C. Absorbanța amestecului a fost măsurată la 593 nm față de un martor preparat în aceleași condiții. Rezultatele au fost exprimate în µmol echivalenți Fe²⁺ per mililitru de must de struguri (µmol Fe²⁺/mL).

• Testul DPPH

Activitatea de neutralizare a radicalului liber 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) a probelor a fost determinată conform procedurii descrise de Kalita et al. [33], cu modificări minore.

Activitatea de neutralizare a DPPH (%) a fost calculată conform Ecuației (2.3):

$$\text{Activitate de neutralizare DPPH (\%)} = [(A_{\text{martor}} - A_{\text{proba}})/A_{\text{martor}}] \times 100 \quad (2.3)$$

e) Conținutul de solide solubile totale și aciditatea

Solidele solubile totale (TSS, °Brix) și aciditatea titrabilă (TA, g/L acid tartric) au fost determinate conform procedurii standard din Regulamentul Consiliului CEE 2676/90 (*Commission Regulation, 1990*).

f) Analiza statistică

Toate măsurătorile au fost efectuate în triplicat, iar rezultatele sunt prezentate sub formă de medie ± deviație standard (SD). Pentru analiza statistică a fost utilizat software-ul Design Expert® versiunea 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SUA, 2022). Diferențele semnificative între probe au fost evaluate prin analiza de varianță unifactorială (one-way ANOVA), cu analiză post-hoc utilizând testul Tukey HSD.

Coeficientul de corelație Pearson dintre conținutul total de compuși fenolici, antocianinele monomerice și activitatea antioxidantă a fost calculat utilizând software-ul JASP, versiunea 0.17.1 (JASP Team, Amsterdam, Țările de Jos, 2023).

g) Rezultate

Efectele unui pretratament ultrasonic pentru îmbunătățirea ratei de extracție a polifenolilor și, ulterior, pentru creșterea activității antioxidante a mai multor probe, fiecare în trei repetiții, toate provenind din struguri roșii din soiul Merlot, recolta 2019, au fost analizate în condiții de laborator. Designul experimental a prevăzut tratarea randomizată a 13 probe, fiecare în 3 repetiții, cu 5 puncte centrale, așa cum este prezentat în Tabelul 2.7.

Tabelul 2.7 Designul modelului experimental compozit central și rezultatele

Factori				Rezultate			
Ordine standard	Ordine de execuție	A (%)	B (min)	TPC (μg GAE/mL)	MA (mg CGE/L)	FRAP (μmol Fe ²⁺ /mL)	DPPH Activitate de captare a radicalilor (%)
2	1	90	3	1396,06 ± 5,23	223,46 ± 2,32	41,78 ± 2,25	74,5 ± 0,2
9	2	70	4	947,92 ± 3,79	167,05 ± 1,46	27,52 ± 1,21	73,3 ± 0,6
1	3	50	3	124,5 ± 1,01	20,67 ± 0,72	15,02 ± 0,83	66,8 ± 0,5
6	4	90	4	1177,85 ± 4,87	214,97 ± 2,36	42,96 ± 1,98	75,9 ± 0,6
11	5	70	4	948,05 ± 4,56	169,7 ± 1,55	28,85 ± 1,09	73,2 ± 0,3
5	6	50	4	136,4 ± 1,08	25,49 ± 0,65	16,09 ± 0,78	68,2 ± 0,2
7	7	70	3	482,31 ± 3,82	108,37 ± 1,02	27,17 ± 0,94	72,1 ± 0,5
4	8	90	5	1172,1 ± 3,75	176,29 ± 2,45	48,32 ± 2,23	77,2 ± 1,0
12	9	70	4	949,23 ± 3,98	166,6 ± 1,47	28,02 ± 0,74	73,2 ± 0,9
10	10	70	4	951,19 ± 4,56	168,15 ± 1,62	29,15 ± 1,16	73,3 ± 0,8
3	11	50	5	148,3 ± 2,04	26,22 ± 1,23	18,68 ± 0,43	71,1 ± 0,6
13	12	70	4	950,24 ± 4,21	167,24 ± 1,74	27,97 ± 0,54	73,4 ± 0,5
8	13	70	5	1126,11 ± 2,01	137,74 ± 1,03	29,97 ± 0,81	73,5 ± 0,7

Variabile independente (A: amplitudine; B: timp); conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomeri (MA); activitate antioxidantă: FRAP și DPPH. Rezultatele sunt exprimate ca valoare medie a celor trei replicări ± deviația standard (SD).

În ceea ce privește conținutul de compuși bioactivi, precum TPC și MA, precum și activitatea antioxidantă determinată prin testele FRAP și DPPH, au fost investigate efectele tratamentului ultrasonic de mare putere asupra cineticii de extracție. Toți parametrii menționați au fost analizați atât în mustul de struguri roșii netratat, utilizat ca probă de control (C), cât și în probele supuse tratamentului ultrasonic la amplitudini de 50%, 70% și 90% pentru durate de 3, 4 și 5 minute, după cum urmează: SM50/3 (A: 50%, t: 3 min), SM50/4 (A: 50%; t: 4 min), SM50/5 (A: 50%; t: 5 min), SM70/3 (A: 70%; t: 3 min), SM70/4 (A: 70%; t: 4 min), SM70/5 (A: 70%; t: 5 min), SM90/3 (A: 90%; t: 3 min), SM90/4 (A: 90%; t: 4 min) și SM90/5 (A: 90%; t: 5 min).

Pentru a monitoriza creșterea corespunzătoare a temperaturii, temperatura probelor supuse sonicației a fost măsurată la intervale de 1 minut, utilizând o cameră de termoviziune. Valoarea medie a probei netratate (C), precum și valorile medii înregistrate cu ajutorul unei camere infraroșu orientate frontal (FLIR) pentru fiecare probă, la finalul tratamentului ultrasonic, sunt ilustrate în Figura 2.5.

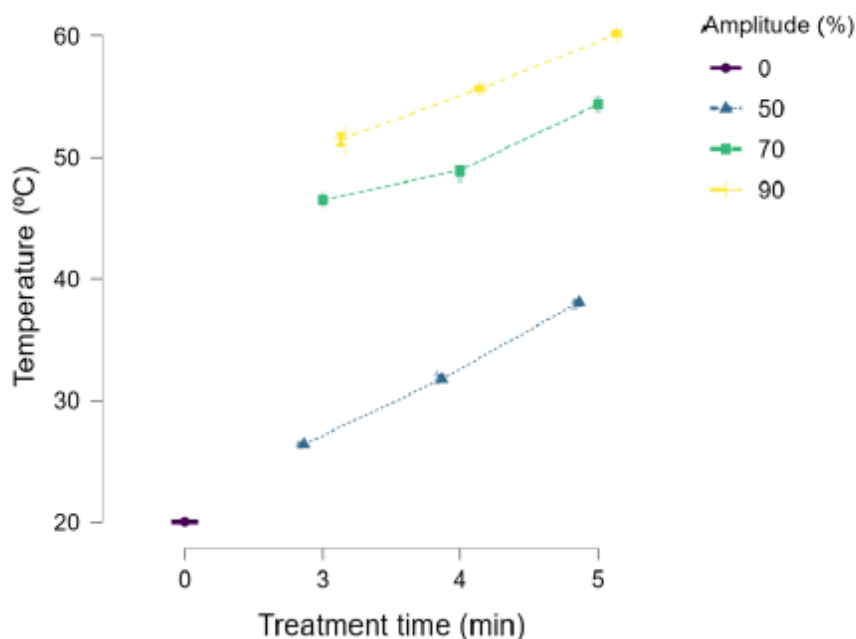


Figura 2.5 Modificările temperaturii probelor tratate cu ultrasunete (US) comparativ cu proba martor (C).

O creștere a temperaturii probelor în urma tratamentului ultrasonic a fost evidentă comparativ cu proba de referință (C, 20 °C), fiind corelată cu intensitatea și durata tratamentului. Temperaturile medii minime și maxime atinse în probe au fost de 26,20 °C pentru SM50/3 și, respectiv, 60,17 °C pentru SM90/5.

Creșterea temperaturii conduce adesea la randamente mai mari de extracție. Optimizarea temperaturii poate fi realizată pentru a obține cel mai bun randament al compușilor țintă fără degradare, deoarece acest parametru poate varia în funcție de tipul produsului (*Palma și colab., 2002*).

În plus, alți autori au raportat că aplicarea ultrasunetelor a condus la rezultate interesante privind recuperarea compușilor bioactivi din tescovină și drojdii, precum și extracția diferitelor compuși aromatici din vinuri (*Bosiljkov și colab., 2017; Drosou și colab., 2015; Roman și colab., 2020*).

Tabelul 2.8 prezintă rezultatele determinărilor fizico-chimice și analitice ale mustului de struguri roșii netratat.

Tabelul 2.8 Caracteristicile mustului de struguri roșii

Probă	TSS (°Brix)	TA (g acid tartric/L)	TPC (μg GAE/mL)	MA (mg CGE/L)	FRAP (μmol Fe ²⁺ /mL)	DPPH Activitate de captare a radicalilor (%)
C	29,9 ± 0,1	3,4 ± 0,03	114,42 ± 5,23	223,46 ± 2,67	16,06 ± 0,9	13,43 ± 1,02

Must de struguri roșii netratat (C); solide solubile totale (TSS); aciditate totală (TA); conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antocianine monomerice (MA); activitate antioxidantă: FRAP și DPPH. Rezultatele sunt exprimate ca valoarea medie a celor trei replici $\pm$ deviația standard (SD).

• Conținutul total de compuși fenolici

Randamentele de extracție ale conținutului total de polifenoli (TPC) au fost observate ca fiind în creștere odată cu creșterea temperaturii. Acest efect poate fi atribuit în principal fenomenului de cavitație, care este favorizat la temperaturi mai scăzute și care facilitează eliberarea compușilor extractibili, îmbunătățind transferul de masă prin difuzie sau prin ruperea pereților celulari ai țesuturilor vegetale (OIV, 2022; Benzie și colab., 1996; Reche și colab., 2022).

TPC pentru probele tratate ultrasonic a variat între 124,5 micrograme echivalenți acid galic per mililitru (μg GAE/mL) și 1396,06 μg GAE/mL, așa cum este prezentat în Tabelul 2.7.

Studii anterioare au evidențiat un randament mai ridicat de extracție a TPC atunci când ultrasunetele de mare putere au fost aplicate asupra strugurilor sau în timpul procesului de vinificație (Ferraretto și colab., 2011; Pérez-Porras și colab., 2021). Alți autori au raportat că nu s-a observat degradarea polifenolilor după sonicația vinului roșu (Natolino și colab., 2002).

În plus, tratamentul ultrasonic cu o amplitudine de 90% timp de 3 minute a determinat cea mai mare extracție de TPC în proba SM90/3, în timp ce valori mai scăzute au fost înregistrate la aceeași amplitudine (90%) pentru 4 și 5 minute, cu o reducere de 15,63% în SM90/4 și 16,04% în SM90/5. O posibilă explicație pentru această scădere o reprezintă temperaturile ridicate înregistrate în vecinătatea sondei ultrasonice, precum și temperaturile medii de 55,71 °C și 60,17 °C atinse în probele SM90/4 și SM90/5, care pot conduce la degradarea compușilor fenolici. Alte cercetări au arătat că polifenolii pot fi protejați împotriva degradării termice la temperaturi de până la 50 °C (Dzah și colab., 2020).

Cu toate acestea, variabile suplimentare precum specia vegetală, originea geografică sau soiul pot influența, de asemenea, cantitatea de compuși fenolici recuperați printr-o metodă de extracție asistată de ultrasunete (Yusoff și colab., 2022).

Parametrii optimi de extracție pentru conținutul total de polifenoli (TPC) au fost analizați statistic utilizând metodologia suprafeței de răspuns (RSM) și analiza de varianță (ANOVA) (Tabelul 2.9).

Tabelul 2.9 Analiza ANOVA și tabelul coeficienților pentru modelul quadratic. Răspuns 1: compuși fenolici totali

Sursă	F – Valoare	p - Valoare	R ²	Adjusted R ²	Coeficienți
Model	13,40	0,0018	0,9054	0,8378	
Termen liber					921,98
A	60,33	0,0001			556,13
B	1,07	0,3361			73,94
AB	0,4989	0,5028			61,94
A ²	3,47	0,1049			-196,5

B^2	0,2193	0,6538	-49,42
Lipsa de adekvare	36229,38	<0,0001	

Amplitude (A); timp (B).

După cum se arată în Tabelul 2.9, termenul corespunzător amplitudinii este semnificativ pentru creșterea extracției polifenolilor. Valoarea F a modelului, de 13,40, indică faptul că modelul este semnificativ. Datorită zgomotului experimental, există o probabilitate de doar 0,18% ca o valoare F atât de mare să apară întâmplător.

În plus, valorile p mai mici de 0,0500 indică faptul că termenii modelului sunt semnificativi. În acest caz, amplitudinea reprezintă un termen semnificativ al modelului. Valorile mai mari de 0,1000 indică faptul că termenii nu sunt semnificativi. Un coeficient de determinare R^2 ridicat (0,9054) indică un nivel bun de ajustare al modelului. Valoarea F a lipsei de adecvare (lack of fit), de 36.229,38, arată că lipsa de adecvare este semnificativă. Există o probabilitate de doar 0,01% ca o astfel de valoare F să apară din cauza zgomotului experimental.

Ecuția finală exprimată în funcție de factorii reali pentru TPC este prezentată în Ecuția (2.4). Această ecuație poate fi utilizată pentru a realiza predicții ale răspunsului în funcție de nivelurile fiecărui factor.

$$Y_{TPC} = -5385.266 + 108.970 \times A + 686.076 \times B - 3.097 \times A \times B - 0.491 \times A^2 - 49.418 \times B^2 \quad (2.4)$$

unde A reprezintă amplitudinea, iar B reprezintă timpul.

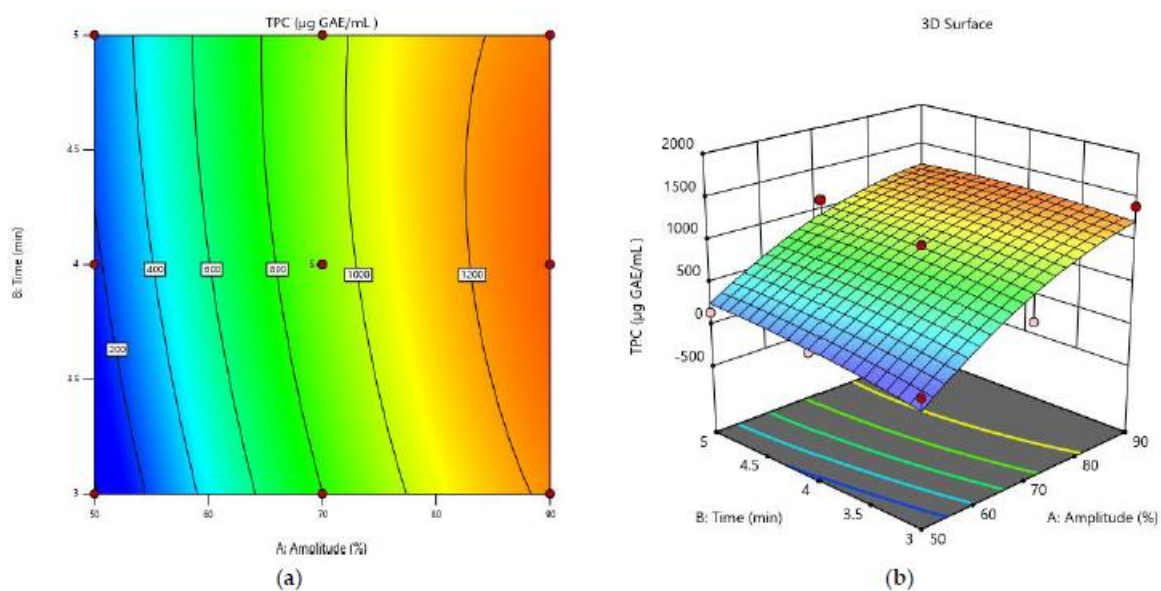


Figura 2.6 Influența parametrilor de proces asupra conținutului de compuși fenolici totali (TPC): (a) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca grafic de tip contur; (b) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca suprafață de răspuns 3D.

Influența parametrilor de proces A și B asupra ratei de extracție a TPC în probele tratate cu ultrasunete este prezentată în Figura 2.6.

Figura 2.6 ilustrează clar faptul că amplitudinea undelor ultrasonice are un impact mai mare asupra rezultatelor decât durata tratamentului. Un timp de tratament mai lung, combinat cu amplitudini mai mici (50%), are un efect negativ, conducând la o extracție mai redusă a TPC. Pe de altă parte, valori mai ridicate ale amplitudinii (90%) îmbunătățesc semnificativ randamentul extracției TPC.

În situația descrisă, condițiile optime ar fi utilizarea unei amplitudini ridicate și a unei durate reduse a tratamentului.

- **Antocianine monomerice**

Antocianinele reprezintă o familie majoră de compuși fenolici prezenți în vinul roșu. Testele de tratament au evidențiat o interacțiune puternică între fenomenul de cavitație și celulele exocarului, determinând o creștere a concentrației de antocianine. Rezultatele obținute sunt în concordanță cu alte studii care includ extracția asistată de ultrasunete în rândul tehnologiilor emergente dezvoltate cu scopul de a reduce timpii de extracție și de a crește randamentele (*Constantin și colab., 2022*).

Conținutul de MA pentru probele tratate ultrasonic a variat între 20,67 mg echivalenți cianidin-3-glucozidă (CGE)/L și 223,46 mg CGE/L, așa cum este prezentat în Tabelul 2.7. Similar cu TPC, cea mai mică valoare a MA a fost înregistrată pentru proba SM50/3 (ordinea de rulare trei), utilizând o amplitudine de 50% timp de 3 minute, în timp ce cel mai ridicat conținut de MA a fost obținut pentru proba SM90/3 (ordinea de rulare unu), utilizând o amplitudine de 90% timp de 3 minute. Se observă o creștere, în general proporțională cu condițiile de tratament, de la 28,7% până la aproximativ de 14 ori a conținutului de MA în probele sonicate comparativ cu proba netratată (C).

În ceea ce privește extracția antocianinelor monomerice, tratamentul ultrasonic la A 90% timp de 3 minute a condus la cea mai ridicată extracție (proba SM90/3), în timp ce valori ușor mai scăzute, de 3,8% (SM90/4) și semnificativ mai reduse, de 21,11% (SM90/5), au fost înregistrate atunci când s-au utilizat 4 și respectiv 5 minute la aceeași amplitudine. Se observă că extracția antocianinelor crește până la o valoare maximă, după care începe să scadă, probabil din cauza influenței temperaturii finale atinse în probele tratate.

Alte cercetări au evidențiat faptul că temperatura are un impact semnificativ asupra extracției antocianinelor, extracția maximă fiind obținută la aproximativ 30–35 °C. Totuși, creșterea temperaturii poate îmbunătăți extracția prin creșterea solubilității antocianinelor și a coeficientului de difuzie. Peste un anumit prag, însă, randamentul scade, de exemplu la temperaturi mai mari de 45 °C, antocianinele se degradează semnificativ (*Cacace și colab., 2006*).

După cum se poate observa, pentru extracția maximă atât a TPC, cât și a MA, amplitudinea ultrasunetelor și timpul de tratament sunt aceleași: amplitudine de 90% pentru 3 minute.

Conform Tabelului 2.8, termenii modelului pentru antocianinele monomerice A, A² și B² sunt semnificativi, deoarece valorile p sunt mai mici de 0,0500. Dacă valoarea este mai mare de 0,1000, termenii modelului nu sunt considerați relevanți. O valoare F atât de mare ar apărea din cauza zgomotului experimental doar în 0,01% din cazuri, însă valoarea F a modelului de

44,35 indică faptul că modelul este semnificativ. De asemenea, valoarea F a lipsei de adecvare (lack of fit), de 396,80, sugerează că aceasta este semnificativă.

Tabelul 2.10 Analiza ANOVA și tabelul coeficienților pentru modelul quadratic. Răspuns 2: antocianine monomerice

Sursă	F – Valoare	p - Valoare	R ²	Adjusted R ²	Coeficienți
Model	44,35	<0,0001	0,9694	0,9475	
Termen liber					162,77
A	190,42	<0,0001			90,39
B	0,0972	0,7644			2,04
AB	2,70	0,1444			-13,18
A ²	9,71	0,0169			-30,08
B ²	7,97	0,0257			-27,25
Lipsa de adecvare	396,8	<0,0001			

Amplitude (A); timp (B).

Coeficientul de determinare ajustat (R² ajustat) de 0,9475 și coeficientul de determinare predictiv (R² prezis) de 0,8878 sunt în bună concordanță (diferența fiind mai mică de 0,2), ceea ce indică faptul că modelul realizează predicții precise. Ecuația (2.5) prezintă forma finală a modelului exprimată în funcție de factorii reali pentru antocianinele monomerice. Această ecuație poate fi utilizată pentru a realiza predicții ale răspunsului în funcție de nivelurile specifice ale fiecărui factor.

$$Y_{MA} = -1134.49 + 17.683 \times A + 262.123 \times B - 0.659 \times A \times B - 0.075 \times A^2 - 27.254 \times B^2 \quad (2.5)$$

unde A reprezintă amplitudinea, iar B reprezintă timpul.

Efectul parametrilor de proces A și B asupra ratei de extracție a MA în probele supuse tratamentului ultrasonic este prezentat în Figura 2.7.

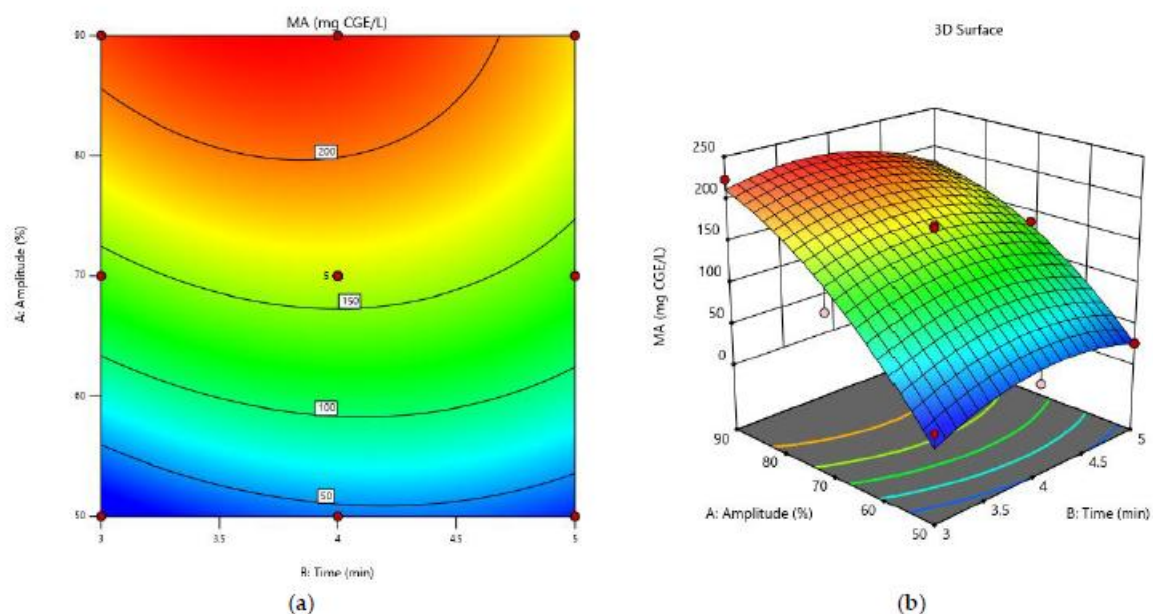


Figura 2.7 Influența parametrilor de proces asupra conținutului de antocianine monomerice (MA): (a) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca grafic de tip contur; (b) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca suprafață de răspuns 3D.

Conform Figura 2.7, care compară influența duratei tratamentului și a amplitudinii undelor ultrasonice asupra extracției antocianinelor monomerice din exocarpu strugurilor roșii, randamentul de extracție al MA crește odată cu ambele variabile, până la un anumit punct, după care începe să scadă. Totuși, atunci când durata tratamentului depășește 3 minute la amplitudinea maximă a ultrasunetelor (90%), rata de extracție a MA scade. La amplitudini ridicate apare o cavitație excesivă, care crește temperatura în vecinătatea sondei, generează mai mulți radicali hidroxil și conduce la o degradare accentuată a compușilor (Ying și colab., 2011).

În plus, o amplitudine prea mică poate să nu furnizeze suficientă energie pentru a rupe pereții celulari, motiv pentru care cele mai scăzute randamente de extracție ale MA au fost observate în probele tratate la nivelul minim al amplitudinii ($A = 50\%$).

Folosind ultrasunete în diferite condiții de operare, studii anterioare au evidențiat, de asemenea, randamente crescute ale extracției antocianinelor din tescovină de afine, reziduuri de vin de dud sau cartofi dulci mov (Fu și colab., 2021; Zhang și colab., 2020; Huang și colab., 2019).

Similar cu TPC, condițiile optime pentru îmbunătățirea extracției MA constau într-o amplitudine ridicată și un timp redus de tratament.

• Activitatea antioxidantă

Proprietățile antioxidante ale compușilor fenolici din struguri au fost intens studiate, incluzând capacitatea de neutralizare a radicalilor liberi, inhibarea oxidării lipidice, reducerea formării hidroperoxidilor și altele. Aceste proprietăți sunt deosebit de importante din punct de vedere al

bioactivității. În plus, antioxidanții pot opri procesul de oxidare prin interacțiunea preferențială cu un agent oxidant, în locul moleculelor sau celulelor țintă (*Vaquero și colab., 2007*).

Activitatea antioxidantă maximă, de 48,32 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ și 77,2%, determinată prin testele FRAP și respectiv DPPH, a fost observată în probele sonicate din ordinea de rulare 8, obținute la o amplitudine de 90% timp de 5 minute (proba SM90/5) (Tabelul 2.7). Cea mai redusă activitate, de 15,02 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ sau 66,8% (ordinea de rulare 3), a fost observată la o amplitudine de 50% timp de 3 minute (proba SM50/3).

S-a observat că extracția maximă a compușilor antioxidanți necesită aceeași amplitudine ultrasonică (90%) ca în cazul TPC și MA, însă timpul optim este de 5 minute, nu 3 minute ca în cazul TPC și MA. În plus, faptul că antioxidanții includ și compuși non-fenolici, care pot necesita temperaturi mai ridicate pentru extracție, poate explica temperatura ușor mai mare de 60,17 °C înregistrată pentru valoarea maximă a compușilor antioxidanți. Aceste rezultate sunt în concordanță cu studii anterioare care au arătat că antioxidanții necesită temperaturi mai ridicate pentru extracție (*Jamshaid și colab., 2022*). Mai mult, rezultatele sugerează că activitatea antioxidantă a probelor este influențată semnificativ de nivelul TPC.

Se poate observa că activitatea antioxidantă a probelor sonicate crește proporțional cu condițiile de tratament, de la 11,84% până la aproximativ de 3,6 ori, conform testului FRAP, și de la 2,77% până la 18,77%, conform testului de neutralizare a radicalului DPPH, comparativ cu proba netratată (C).

Conform mecanismului de acțiune al compușilor antioxidanți, metodele utilizate pentru evaluarea activității antioxidante măsoară capacitatea speciilor antioxidante de a neutraliza radicalii liberi sau de a reduce compuși oxidanți (*Thaipong și colab., 2006*).

Valorile FRAP cuantifică capacitatea compușilor antioxidanți din mustul de struguri roșii de a dona electroni și, astfel, de a reduce speciile oxidate. Un indicator relevant al unui compus cu potențial antioxidant este puterea sa reducătoare (*Vasyliev și colab., 2020*).

Se poate observa că prezența unei cantități semnificative de compuși fenolici în mustul de struguri roșii, ca rezultat al tratamentului ultrasonic, a condus la valori ridicate ale FRAP.

Alte rezultate au arătat că activitatea antioxidantă a compușilor fenolici poate prezenta o limită de saturație la nivel de concentrație, peste care activitatea nu mai crește odată cu concentrarea. Totuși, unele studii au evidențiat existența și a altor factori, în afară de concentrație, care influențează proprietățile antioxidante ale compușilor fenolici, întrucât relația dintre compușii fenolici și activitatea antioxidantă nu este întotdeauna consistentă (*Xia și colab., 2010; Dani și colab., 2009*). În același timp, alte cercetări au demonstrat o relație semnificativă între compușii polifenolici determinați în diverse probe și rezultatele testelor de activitate antioxidantă (*Negro și colab., 2021*).

Tabelul 2.11 Analiza ANOVA și tabelul coeficienților pentru modelul quadratic

Sursă	F – Valoare		p - Valoare		R ²		Adjusted R ²		Coeficienți	
	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH	FRAP	DPPH
Model	330,16	58,81	<0,0001	<0,0001	0,9958	0,9767	0,9928	0,9601		
Termen liber									28,14	73,17
A	1587,16	246,65	<0,0001	<0,0001					13,88	3,58

B	33,68	37,65	0,0004	0,0005	2,17	1,40
AB	2,85	2,05	0,1354	0,1954	0,7200	-0,4000
A ²	12,04	6,08	0,0104	0,0431	1,78	-0,8293
B ²	2,59	0,0556	0,1515	0,8203	0,8266	-0,0793
Lipsa de adekvare	2,40	102,78	0,2085	0.0003		

Amplitude (A); timp (B).

Conform Tabelului 2.11, parametrii modelului A, B și A² sunt semnificativi pentru activitatea antioxidantă măsurată atât prin testul FRAP, cât și prin testul DPPH, deoarece valorile p sunt mai mici de 0,0500. Valorile mai mari de 0,1000 indică faptul că termenii modelului nu sunt decisivi. Semnificația modelului este evidențiată de valorile F de 330,16 și 58,81. Valorile F ale lipsei de adekvare (2,40 și 102,78) indică faptul că lipsa de adekvare nu este semnificativă. Coeficientul de determinare predictiv (R² prezis) (0,9727 pentru FRAP și 0,7829 pentru DPPH) și coeficientul de determinare ajustat (R² ajustat) (0,9928 pentru FRAP și 0,9601 pentru DPPH) sunt în bună concordanță (diferența fiind mai mică de 0,2), ceea ce indică faptul că modelul realizează predicții precise.

Ecuatiile (2.5) și (2.6) prezintă forma finală a modelelor exprimate în funcție de factorii reali pentru activitatea antioxidantă determinată prin testele FRAP și DPPH. Aceste ecuații pot fi utilizate pentru a prezice răspunsul în funcție de nivelurile specifice ale fiecărui factor.

$$Y_{FRAP} = 16.030 - 0.074 \times A - 6.965 \times B + 0.036 \times A \times B + 0.004 \times A^2 + 0.826 \times B^2 \quad (2.5)$$

$$Y_{DPPH} = 37.996 + 0.549 \times A + 3.434 \times B - 0.020 \times A \times B - 0.002 \times A^2 - 0.079 \times B^2 \quad (2.6)$$

unde A reprezintă amplitudinea, iar B reprezintă timpul.

Figura 2.8 prezintă cinetica activității antioxidante în probele tratate cu ultrasunete, precum și suprafețele de răspuns 3D și graficele de tip contur. Se observă că atât valorile FRAP, cât și cele DPPH cresc odată cu ambii factori, până la o valoare maximă de 48,32 μmol Fe²⁺/mL și 77,2% în proba SM90/5.

Alți cercetători au concluzionat că activitatea antioxidantă a vinurilor este mai strâns corelată cu tipul compușilor fenolici individuali decât cu conținutul total de polifenoli (TPC). De asemenea, s-a propus că activitatea antioxidantă este atribuită în principal fracțiunii de flavan-3-oli, mai degrabă decât antocianinelor (*Banc și colab., 2014*).

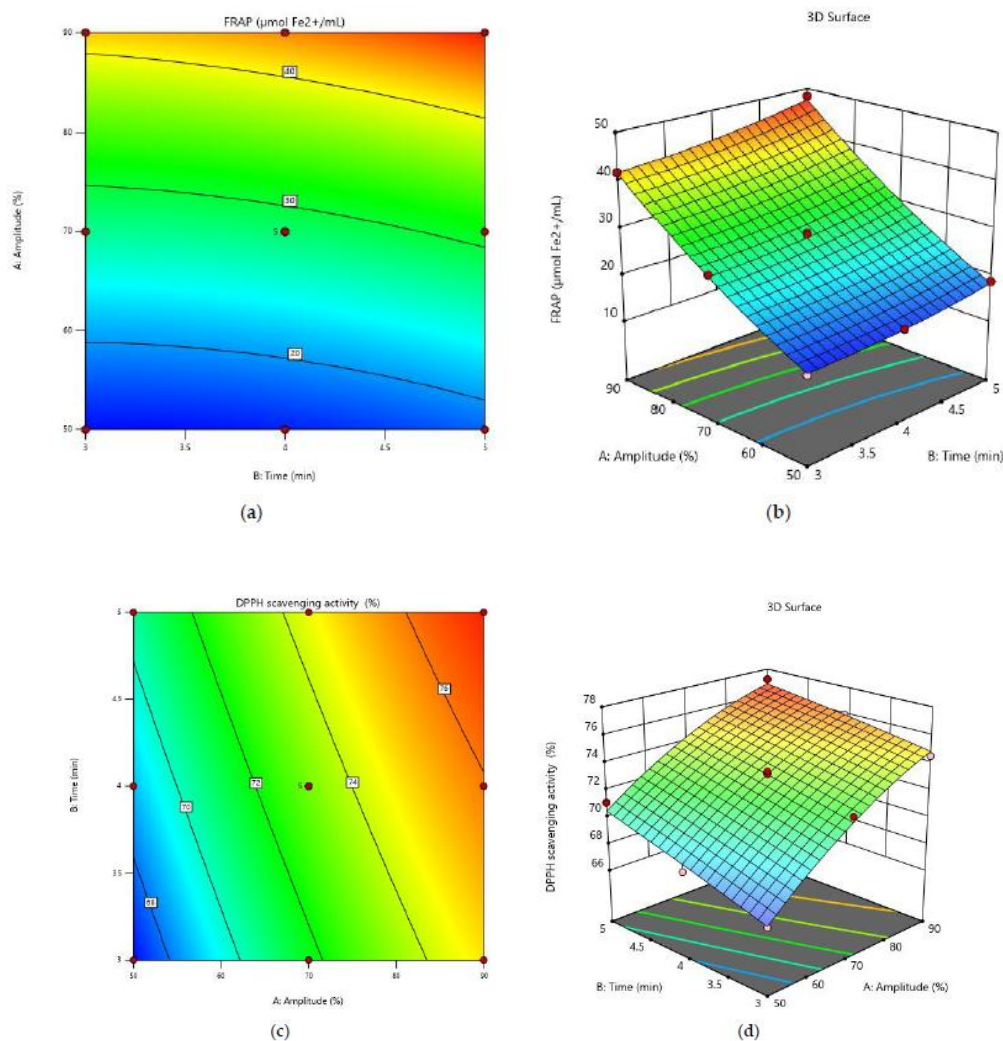


Figura 2.8 Influența parametrilor de proces asupra activității antioxidante: (a) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca grafic de tip contur pentru valorile FRAP; (b) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca suprafață de răspuns 3D pentru valorile FRAP; (c) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca grafic de tip contur pentru valorile DPPH; (d) amplitudinea (A) și timpul (B) reprezentate ca suprafață de răspuns 3D pentru valorile DPPH.

- **Corelații între conținutul total de polifenoli, antocianinele monomerice și activitatea antioxidantă**

Rezultatele studiului nostru arată că, odată cu creșterea amplitudinii și a duratei tratamentului ultrasonic, activitatea antioxidantă crește, exprimată atât prin testul FRAP, cât și prin capacitatea de neutralizare a radicalilor liberi DPPH. Valorile maxime ale activității antioxidante au fost obținute la o amplitudine ultrasonică de 90% și un timp de tratament de 5 minute (proba SM90/5): 48,32 μmol Fe²⁺/mL și 77,2%, respectiv.

De asemenea, se observă că activitatea antioxidantă a probelor sonicate, exprimată prin testele FRAP și DPPH, crește proporțional cu conținutul total de polifenoli și cu cel de antocianine monomerice.

Pentru valorile maxime ale conținutului total de polifenoli (1396,06 μg GAE/mL) și ale antocianinelor monomerice (223,4 mg CGE/L), obținute la o amplitudine ultrasonică de 90% timp de 3 minute (proba SM90/3), activitatea antioxidantă a fost de 3,11 ori mai mare atunci când a fost măsurată prin testul FRAP și cu 14,62% mai mare atunci când a fost evaluată prin testul DPPH, comparativ cu proba de control (C). Aceste rezultate confirmă influența semnificativă a compușilor fenolici și a antocianinelor asupra activității antioxidante.

Aceste constatări sunt în concordanță cu cele raportate de alți autori, care au evidențiat o corelație pozitivă între TPC și activitatea antioxidantă evaluată prin DPPH (*Fernández-Pachón și colab., 2004*), sau care au asociat capacitatea antiradicalară ridicată a probelor cu concentrația de antocianine (*Gismondi și colab., 2017*), dar sunt în contrast cu alte studii (*Rivero-Pérez și colab. 2007*; , *Banc și colab., 2020*).

Analiza curentă indică o corelație foarte bună ($p < 0,01$) între TPC și activitatea antioxidantă măsurată prin FRAP (r Pearson = 0,917) și prin DPPH (r Pearson = 0,878). De asemenea, s-au identificat corelații foarte bune între MA și activitatea antioxidantă, atât prin FRAP (r Pearson = 0,928), cât și prin DPPH (r Pearson = 0,888).

În final, rezultatele noastre arată că activitatea antioxidantă a probelor sonicate este influențată atât de TPC, cât și de MA, deși probele cu cele mai ridicate valori ale TPC și MA nu au arătat întotdeauna valorile cele mai ridicate pentru activitatea antioxidantă, exprimată fie prin FRAP, fie prin capacitatea de neutralizare a radicalilor liberi DPPH (%).

- **Optimizarea modelului experimental pentru creșterea ratei de extracție a compușilor biologic activi și a activității antioxidante în mustul de struguri**

În vederea maximizării extracției compușilor biologic activi din mustul de struguri, precum și a îmbunătățirii activității antioxidante, a fost investigată funcția de optimizare a modelului realizată cu ajutorul software-ului Design Expert® versiunea 13 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, SUA, 2022). Pentru optimizarea numerică, a fost posibilă optimizarea oricărei combinații de unul sau mai multe obiective. Țintele aplicate atât factorilor, cât și răspunsurilor au fost următoarele: amplitudinea și timpul de tratament în interval definit, iar TPC, MA, FRAP și DPPH au fost maximizate.

Funcția de optimizare a software-ului a generat 20 de soluții posibile, indicând soluția cu cea mai mare valoare a funcției de desirabilitate, de 0,918 (Figura 2.9), respectiv o amplitudine de 90% și un timp de tratament de 4 minute și 24 de secunde, această combinație fiind selectată ca soluție optimă pentru maximizarea extracției TPC, MA și a activității antioxidante, atât prin testul FRAP, cât și prin testul DPPH.

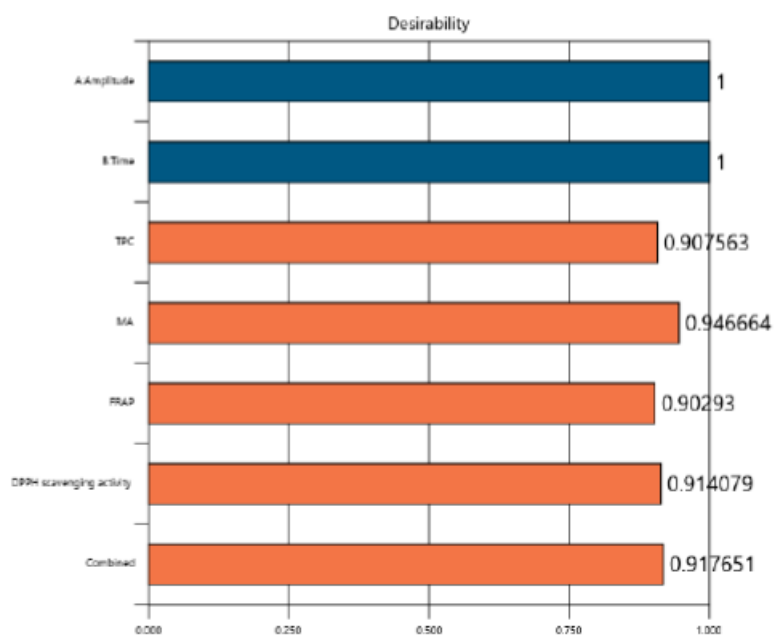


Figura 2.9 Reprezentare grafică a soluției optime: setările optime ale factorilor sunt indicate prin bare roșii, iar predicțiile optime ale răspunsurilor sunt reprezentate în albastru.

Pentru identificarea setărilor factorilor care îndeplinesc obiectivele stabilite, optimizarea numerică explorează spațiul de proiectare utilizând modelele construite în cadrul analizei (Figura 2.10). În anumite condiții, modelul poate prezice cu acuratețe rata de extracție a compușilor.

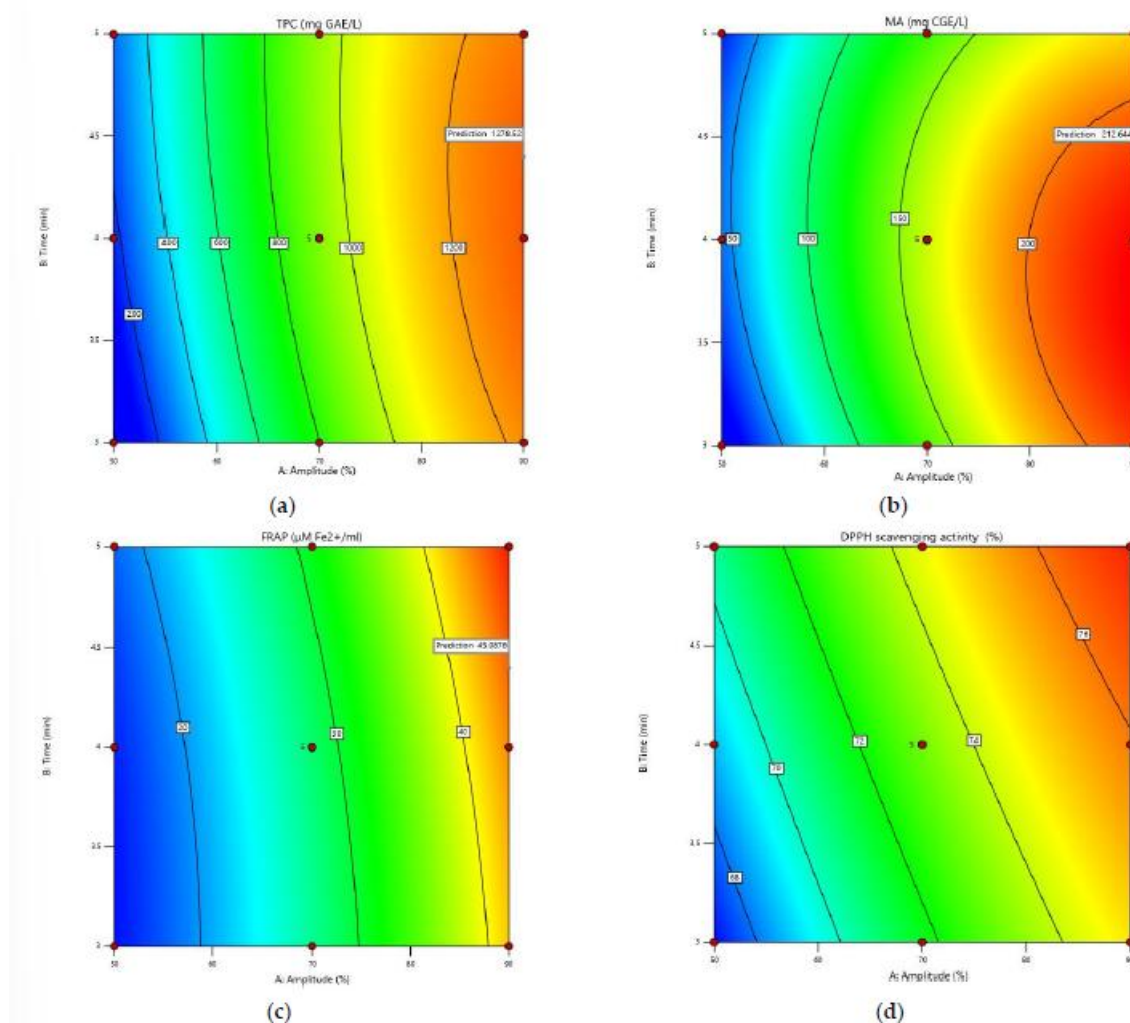


Figura 2.10. Reprezentare grafică a soluției optime: setările optime ale factorilor sunt indicate prin bare roșii, iar predicțiile răspunsurilor optime sunt prezentate în albastru.

Figura 2.11 prezintă graficul de optimizare pentru soluția optimă afișată, evidențiind punctul în care sunt îndeplinite criteriile de răspuns.

- **Confirmarea modelului**

Analiza de optimizare a fost utilizată pentru a ghida testele de validare, care au fost efectuate folosind aceeași metodologie la condițiile optime selectate: amplitudine de 90% și timp de tratament de 4 minute și 24 de secunde. Datele prezise au fost: TPC — 1278,52 ($\mu\text{g GAE/mL}$), MA — 212,64 (mg/L), FRAP — 45,09 ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$) și DPPH — 76,31%, așa cum este ilustrat în Figurile 2.10 și 2.11.

Datele experimentale observate au fost comparate cu valorile prezise de model în aceleași condiții de extracție. Erorile pentru TPC, MA, FRAP și DPPH au fost de -8,70%, -0,99%, 3,14% și 0,25%, respectiv, așa cum este prezentat în Tabelul 2.12, confirmând validitatea modelului.

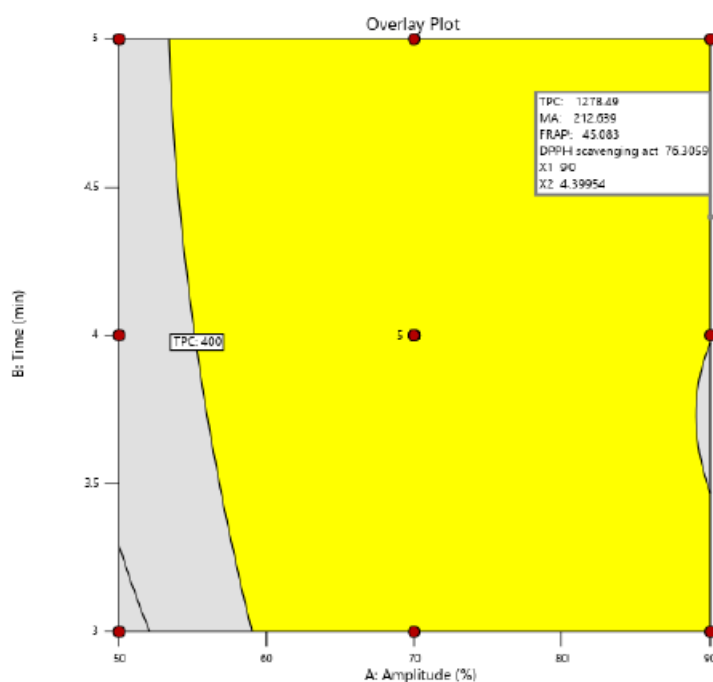


Figura 2.11. Graficul de suprapunere pentru soluția optimă: culoarea galben intens definește setările acceptabile ale factorilor, iar culoarea gri definește setările neacceptabile ale factorilor.

Tabelul 2.12. Tabel de confirmare a modelului

Datele răspunsului	TPC (g GAE/mL)	MA (mg CGE/L)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$)	DPPH Activitate de captare a radicalilor (%)
Observat	1176,16	210,56	46,55	76,5
Prezis	1278,52	212,64	45,09	76,31
Eroare (%)	-8,70	-0,99	3,14	0.25

Conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antocianine monomerice (MA); activitate antioxidantă (FRAP)

Diferențele mici dintre valorile prezise și cele observate au arătat că modelul de optimizare a extracției obținut prin RSM în acest studiu prezintă un grad ridicat de adecvare și are potențialul de a fi utilizat chiar și la scară industrială pentru extracția polifenolilor și a altor compuși antioxidanți din struguri, utilizând ultrasunete de mare putere.

Accelerarea cineticii de extracție printr-o tehnică fizică poate fi importantă atunci când nivelurile compușilor fiziologic activi din struguri sunt ridicate. Utilizarea ultrasunetelor reduce timpul de extracție, intensificând și aproape maximizând randamentul de extracție și activitatea antioxidantă. În ansamblu, utilizarea ultrasunetelor în vinificație deschide posibilitatea optimizării și gestionării mai eficiente a procesului de vinificare a strugurilor roșii. Datorită timpului relativ scurt necesar expunerii la ultrasunete, aplicarea acestora poate fi considerată un pretratament continuu pentru strugurii roșii zdrobiți înainte de umplerea tancului de vinificație. Tratamentul cu ultrasunete de mare putere aplicat strugurilor zdrobiți timp de câteva minute crește atât rata de extracție a compușilor bioactivi, cât și activitatea

antioxidantă, cu de 12 ori pentru TPC, de 14 ori pentru MA, de 3,6 ori pentru FRAP și cu 18,77% pentru activitatea de neutralizare a radicalilor liberi DPPH. Totuși, un timp de tratament de 5 minute și o amplitudine de 90% au condus la o scădere a valorilor TPC și MA, în timp ce valorile FRAP și DPPH au crescut în aceleași condiții de operare. Soluția optimă pentru dezvoltarea unei proceduri care maximizează rata de extracție a TPC și MA, precum și activitatea antioxidantă în prima etapă a procesului de vinificație, pare să fie o amplitudine (A) de 90% și un timp (t) de 4 minute și 24 de secunde.

I.2.1.1.3 Effect of High-Power Ultrasound Treatment on Bioactive Compound Content and Chromatic Characteristics of Red Wines, 2024.

<https://journals.usamvcluj.ro/index.php/fst/article/view/14845>

Evaluarea impactului tratamentului cu ultrasunetelor asupra calității vinului din struguri roșii

Importanța ultrasunetelor în industria procesării strugurilor

Vinul este una dintre cele mai vechi băuturi alcoolice tradiționale din lume. Vinul roșu este, în general, bogat în polifenoli și poate fi considerat o sursă dietetică importantă de polifenoli (*Castaldo și colab., 2019*). Polifenolii sunt compuși esențiali care contribuie la culoarea, gustul, aroma și potențialele beneficii pentru sănătate ale vinului (*Banc și colab., 2014*).

Ultrasunetele de mare putere (HPU) reprezintă o tehnologie care utilizează unde sonore cu frecvențe mai mari de 20 kHz (*Ali și colab., 2023; Hussain și colab., 2023; Ranjha, Irfan, și colab., 2021*). Efectul de bază al ultrasunetelor asupra unui fluid constă în adăugarea unei presiuni acustice peste presiunea hidrostatică deja prezentă în mediu (*Patist și Bates, 2011*).

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea, la scară de laborator, a efectului tratamentului cu ultrasunete (frecvență 20 kHz) asupra facilitării extracției compușilor fenolici din struguri zdrobiți din soiul Merlot, precum și asupra reducerii timpului de macerare. În acest scop, au fost analizați inițial compușii fenolici totali (TPC), frecvent asociați cu caracteristicile organoleptice ale vinurilor roșii finite și stabilitatea acestora. De asemenea, au fost determinați antocianii monomerici (MA), care contribuie decisiv la culoarea specifică a vinurilor roșii, precum și caracteristicile cromatice (intensitatea culorii și nuanța). În plus, capacitatea antioxidantă a fost evaluată prin testul FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Studiul permite o analiză cuprinzătoare și sistematică a mecanismului prin care ultrasunetele influențează calitatea și caracteristicile senzoriale ale vinului, oferind astfel o bază teoretică pentru implementarea comercială a acestei tehnologii în procesul de vinificație.

a) Materiale și echipamente

Aproximativ 100 kg de struguri roșii, din soiul Merlot, recoltați în anul de recoltă 2019, au fost utilizați în cadrul cercetării experimentale.

Sonicația a fost realizată în toate experimentele utilizând un echipament ultrasonic de tip sondă (SONIX VCX750, Sonics and Materials Inc., Newtown, SUA). Amplitudinea poate fi setată ca procent, variind între 10% și 100%.

b) Pregătirea probelor

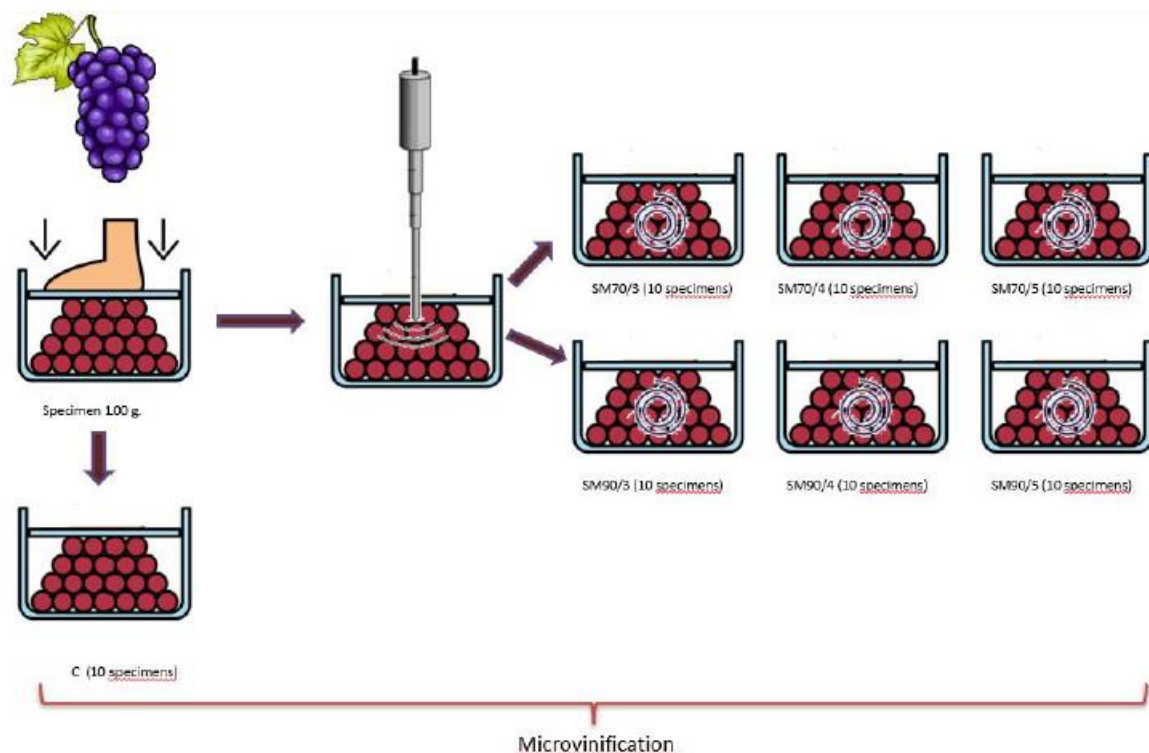


Figura 2.11 Prepararea probelor și a speciemenelor pentru testarea de laborator. Probe sonicate (SM) la amplitudini de 70 și 90% timp de 3, 4 și 5 minute: SM70/3 (A: 70%; t: 3 min), SM70/4 (A: 70%; t: 4 min), SM70/5 (A: 70%; t: 5 min), SM90/3 (A: 90%; t: 3 min), SM90/4 (A: 90%; t: 4 min), SM90/5 (A: 90%; t: 5 min).

c) Determinarea conținutului total de polifenoli și a antocianinelor

Conținutul total de polifenoli (TPC) a fost determinat utilizând metoda spectrofotometrică Folin–Ciocalteu, având ca substanță de referință acidul galic, iar rezultatele au fost exprimate în micrograme echivalenți de acid galic per mililitru ($\mu\text{g GAE/mL}$) (Singleton, Orthofer și Lamuela-Raventos, 1999).

Reactivul Folin–Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germania), în volum de 1,25 mL, a fost adăugat la 0,5 mL probă, diluată anterior 1:10 (v/v) cu apă distilată.

Determinarea antocianinelor monomerice (MA) a fost realizată prin metoda diferențială de pH (Lee, Durst și Wrolstad, 2005). Rezultatele au fost exprimate echivalenți de cianidină-3-glucozid (mg CGE/L). Folosind un coeficient de absorbție molară de $26.900 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ și o masă moleculară de $449,2 \text{ g/mol}$, a fost determinat conținutul total de antociani al probelor.

d) Caracteristici cromatice

Caracteristicile cromatice, descrise prin intensitatea culorii (IC) și nuanță (N), au fost determinate printr-o metodă spectrofotometrică.).

e) Testul de capacitate antioxidantă (FRAP)

Metoda FRAP a fost realizată pe baza protocolului Benzie și Strain (Benzie și Strain, 1996). Ca soluții de stoc au fost utilizate soluția de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (TPTZ) în HCl 40 mM și soluția de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM în tampon acetat 300 mM (pH = 3,6).

Soluția de lucru a fost preparată prin amestecarea tamponului acetat, a soluției TPTZ și a 10 mL soluție $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, fiind ulterior încălzită la 37 °C înainte de utilizare.

Probele de vin au fost diluate 1:50 (v/v) cu apă distilată, iar o alicotă de 0,5 mL din soluția diluată a fost lăsată să reacționeze cu 2,5 mL soluție de lucru timp de 30 minute la 37 °C.

f) Analiza statistică

Analiza statistică a fost efectuată utilizând software-ul DESIGN-EXPERT® versiunea 13 (Stat-Ease Inc., 2022).

Pentru evaluarea diferențelor semnificative între probe s-a utilizat analiza ANOVA unifactorială, urmată de testul post-hoc Tukey HSD. Coeficientul de corelație Pearson între TPC, MA, FRAP, IC și N a fost calculat cu ajutorul software-ului JASP versiunea 0.17.1 (JASP Team, 2023).

După desciorchinare și zdrobire, microvinificația a fost realizată atât pe proba martor, cât și pe probele tratate cu ultrasunete. Operațiunea de macerare a fost efectuată prin extracție secvențială (după 3, 5 și 7 zile), pentru a evalua efectul a doi factori: amplitudinea (A) și timpul de tratament (t), asupra cineticii extracției polifenolilor și antocianilor, precum și asupra valorii FRAP, intensității culorii și nuanței în probele sonicate comparativ cu proba netratată (C).

Toți acești parametri au fost analizați atât pe probele martor (C), după 3 (C3), 5 (C5) și 7 (C7) zile de macerare, cât și pe probele supuse tratamentului ultrasonic la amplitudini de 70% și 90%, timp de 3, 4 și 5 minute, după 3, 5 și 7 zile de macerare, respectiv: SM70/3 (A: 70%; t: 3 min), SM70/4 (A: 70%; t: 4 min), SM70/5 (A: 70%; t: 5 min), SM90/3 (A: 90%; t: 3 min), SM90/4 (A: 90%; t: 4 min) și SM90/5 (A: 90%; t: 5 min), fiecare în trei replicări. Deoarece posibila creștere a temperaturii probelor în urma tratamentului reprezintă un factor important pentru calitatea finală a produsului, aceasta a fost monitorizată pe durata testelor. Temperatura de macerare s-a menținut în intervalul 23–25 °C.

Extracția compușilor fenolici este influențată de durata macerării, care afectează atât conținutul total de polifenoli, cât și interacțiunile dintre diferitele fracții fenolice (*Bautista-Ortín și colab., 2017*). Macerarea este un proces de extracție solid-lichid, în care antocianii și taninurile — principalele substanțe polifenolice caracteristice vinurilor roșii — prezintă afinități diferite pentru solvenți precum apa și etanolul, cu care exocarful intră în contact în mod natural (*Setford și colab., 2017*). Conținutul de antociani la finalul macerării depinde atât de

intensitatea proceselor extractive asociate degradării structurilor celulare, cât și de fenomenele de fixare prin adsorbție (*Ferraretto și colab, 2013*).

Determinările analitice efectuate pe struguri zdrobiți tratați cu ultrasunete și supuși diferitelor durate de macerare (3, 5 și 7 zile) comparativ cu probele martor au evidențiat rezultate semnificative (Tabelul 2.13).

La începutul macerării, probele sonicate au prezentat niveluri mai ridicate de compuși bioactivi (*Maier și colab., 2023*) și caracteristici cromatice superioare comparativ cu proba netratată, diferențe care s-au menținut și la finalul procesului de macerare.

Tabelul 2.13 Efectul tratamentului ultrasonic asupra probelor la finalul procesului de macerare

Probă	Macerare (zile)	TPC ($\mu\text{g GAE/L}$)	MA ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$)	FRAP	IC	N
C3		870,32 $\pm$ 10,72	105,30 $\pm$ 4,02	33,73 $\pm$ 1,11	6,61 $\pm$ 1,21	1,14 $\pm$ 0,07
SM70/3		1407,78 $\pm$ 11,09	240,59 $\pm$ 3,97	43,79 $\pm$ 0,99	23,39 $\pm$ 1,75	1,14 $\pm$ 0,09
SM70/4		1425,02 $\pm$ 10,54	250,82 $\pm$ 2,54	44,69 $\pm$ 1,23	22,12 $\pm$ 2,05	1,27 $\pm$ 0,07
SM70/5	3	1715,31 $\pm$ 9,63	224,51 $\pm$ 2,45	43,96 $\pm$ 1,19	21,46 $\pm$ 1,97	1,21 $\pm$ 0,04
SM90/3		1491,13 $\pm$ 14,21	240,46 $\pm$ 3,01	51,69 $\pm$ 2,56	22,73 $\pm$ 2,06	1,24 $\pm$ 0,05
SM90/4		1778,54 $\pm$ 11,58	239,89 $\pm$ 3,65	61,51 $\pm$ 3,01	22,42 $\pm$ 2,37	1,20 $\pm$ 0,10
SM90/5		1925,12 $\pm$ 12,31	275,33 $\pm$ 2,45	62,43 $\pm$ 2,78	20,29 $\pm$ 1,13	1,12 $\pm$ 0,09
C5		965,16 $\pm$ 10,54	206,87 $\pm$ 5,11	35,40 $\pm$ 1,69	8,35 $\pm$ 1,54	0,73 $\pm$ 0,04
SM70/3		1169,23 $\pm$ 11,23	234,28 $\pm$ 6,02	47,37 $\pm$ 3,47	9,54 $\pm$ 1,50	0,69 $\pm$ 0,03
SM70/4		1378,94 $\pm$ 10,62	241,95 $\pm$ 5,41	52,48 $\pm$ 2,56	12,17 $\pm$ 1,21	0,77 $\pm$ 0,03
SM70/5	5	1795,79 $\pm$ 9,36	318,14 $\pm$ 3,98	52,52 $\pm$ 2,53	19,46 $\pm$ 1,74	0,81 $\pm$ 0,02
SM90/3		1522,74 $\pm$ 11,45	302,83 $\pm$ 2,54	52,52 $\pm$ 2,55	13,63 $\pm$ 1,34	0,74 $\pm$ 0,04
SM90/4		1562,98 $\pm$ 10,35	337,15 $\pm$ 3,87	57,66 $\pm$ 3,04	13,93 $\pm$ 1,49	0,71 $\pm$ 0,06
SM90/5		1689,44 $\pm$ 14,21	382,54 $\pm$ 3,41	51,19 $\pm$ 2,98	24,85 $\pm$ 1,89	0,91 $\pm$ 0,05
C7		778,34 $\pm$ 9,01	220,05 $\pm$ 2,58	35,15 $\pm$ 1,65	8,68 $\pm$ 1,46	0,74 $\pm$ 0,07
SM70/3		1 209,46 $\pm$ 10,36	191,97 $\pm$ 4,05	40,85 $\pm$ 2,55	16,98 $\pm$ 2,03	0,79 $\pm$ 0,03
SM70/4		1467,44 $\pm$ 12,54	234,08 $\pm$ 3,09	57,28 $\pm$ 3,14	11,58 $\pm$ 1,92	0,81 $\pm$ 0,05
SM70/5	7	1618,21 $\pm$ 11,87	215,04 $\pm$ 2,96	58,49 $\pm$ 2,85	17,31 $\pm$ 1,47	0,81 $\pm$ 0,02
SM90/3		1536,61 $\pm$ 11,25	288,83 $\pm$ 5,32	60,35 $\pm$ 2,45	16,13 $\pm$ 1,25	0,75 $\pm$ 0,08
SM90/4		1434,61 $\pm$ 9,89	275,78 $\pm$ 4,58	51,45 $\pm$ 1,95	14,5 $\pm$ 1,07	0,78 $\pm$ 0,07
SM90/5		1909,63 $\pm$ 12,26	335,57 $\pm$ 4,56	59,27 $\pm$ 1,99	21,36 $\pm$ 2,07	0,79 $\pm$ 0,04

Notă: Proba netratată (C); SM70/3 (A: 70%; t: 3 min), SM70/4 (A: 70%; t: 4 min), SM70/5 (A: 70%; t: 5 min), SM90/3 (A: 90%; t: 3 min), SM90/4 (A: 90%; t: 4 min) și SM90/5 (A: 90%; t: 5 min); conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomerici (MA); capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); intensitatea culorii (IC); nuanță (N); rezultatele sunt exprimate ca valoare medie a celor trei replicări $\pm$ deviația standard (SD).

• Efectele tratamentului cu ultrasunete asupra conținutului total de polifenoli

La finalul macerării, conținutul total de polifenoli (TPC) a variat între 870,32 μg echivalenți acid galic/mL (GAE/mL) și 1925,12 μg GAE/mL, conform Tabelului 1. Cea mai mică valoare a TPC a fost înregistrată pentru proba netratată C după 3 zile de macerare (C3), în timp ce cea mai mare valoare a fost observată la proba SM90/5, tot după 3 zile de macerare. Se observă o creștere a

TPC la probele sonicate comparativ cu proba martor C, creștere în general proporțională cu condițiile de tratament: de aproximativ 1,5–2 ori pentru macerarea de 3 zile; de 1,01–2,06 ori pentru 5 zile; și de 1,11–2,45 ori pentru 7 zile. Acest lucru indică faptul că sonicația are un efect pozitiv asupra extracției compușilor fenolici, în concordanță cu alte studii (*Natrella și colab.*, 2023; *Lukić și colab.*, 2019; *Ranjha și colab.*, 2020).

- **Efectele tratamentului cu ultrasunete asupra antocianilor monomerici**

Conținutul de antociani monomerici (MA) în probele sonicate a variat între 105,3 mg echivalenți cianidină-3-glucozid (CGE)/L și 382,54 mg CGE/L (Tabelul 1). Similar TPC, cea mai mică valoare a MA a fost înregistrată în proba martor C (C3) după 3 zile de macerare, iar cea mai mare valoare în proba SM90/5 după 5 zile de macerare. Se observă o creștere a MA la probele tratate, în general proporțională cu intensitatea tratamentului: de 1,43–2,61 ori pentru 3 zile de macerare; de 1,13–1,85 ori pentru 5 zile; și de 0,12–1,52 ori pentru 7 zile, comparativ cu proba martor. La finalul fermentației alcoolice, aproximativ 25% dintre antociani sunt polimerizați, iar după un an de maturare procentul depășește 40% (*He și colab.*, 2012a, 2012b).

- **Efectele tratamentului cu ultrasunete asupra capacității antioxidante**

Valoarea maximă FRAP a fost de 62,43 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$, observată în proba SM90/5 după 3 zile de macerare. Cea mai mică valoare, 33,73 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$, a fost înregistrată pentru proba martor în aceeași perioadă de macerare.

Prezența unui conținut mai ridicat de compuși fenolici în probele tratate contribuie la creșterea capacității antioxidante.

- **Efectele tratamentului cu ultrasunete asupra caracteristicilor cromatice**

Intensitatea culorii (IC) a variat între 6,61 și 24,85 la finalul procesului de macerare. Valoarea maximă a fost observată în proba SM90/5, iar cea minimă în proba martor după 3 zile de macerare. IC crește, în general, odată cu intensitatea tratamentului ultrasonic: de 3,07–3,54 ori pentru 3 zile; de 1,14–3 ori pentru 5 zile; și de 1,67–2,5 ori pentru 7 zile, comparativ cu proba martor. Alte studii (*Pérez-Porras și colab.*, 2021) au raportat că probele martor au prezentat cea mai mică intensitate a culorii, însă diferențele față de vinurile tratate nu au fost întotdeauna semnificative statistic.

- **Evaluarea efectului ultrasunetelor asupra duratei de macerare**

Analiza probelor în funcție de durata macerării arată că TPC crește în primele etape, atingând un maxim în jurul zilei a cincea, după care scade. Alte studii au raportat valori maxime la 6 zile (*Ivanova și colab.*, 2012), iar altele au observat creșteri până la 15 zile (*Alencar și colab.*, 2018b). Conținutul de antociani crește progresiv în timpul macerării, atingând un maxim în jurul zilei a șaptea.

Comparând conținutul total de polifenoli, se observă că probele tratate ultrasonic și macerate doar 3 zile (D3) au înregistrat cele mai mari valori ale TPC (cu excepția probei tratate la 90% timp de 3 minute, care a atins valoarea maximă în ziua a șaptea). Acest comportament a fost

observat chiar și în condițiile în care proba martor a fost supusă unei macerări mai îndelungate (D7).

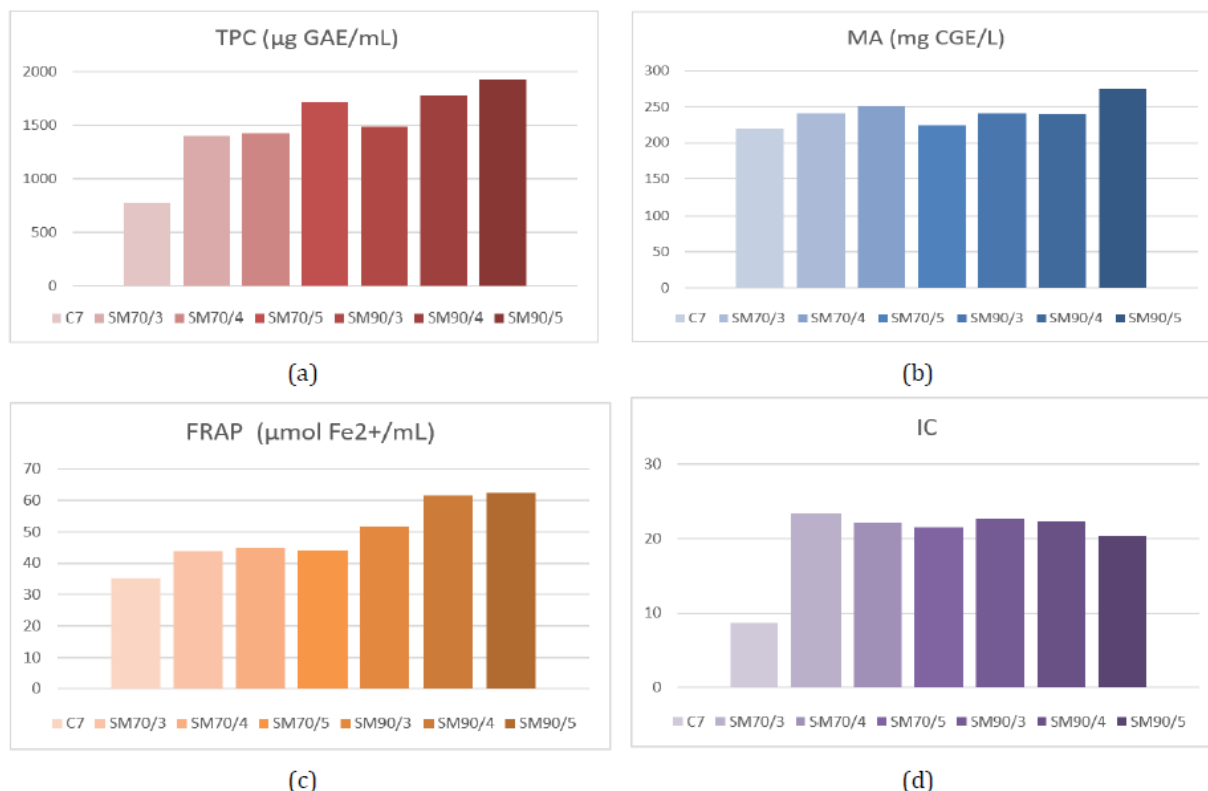


Figura 2.13 Comparație între compușii bioactivi și caracteristicile cromatice ale probelor sonicate după 3 zile de macerare, în raport cu proba netratată după 7 zile de macerare: (a) conținut total de fenoli; (b) antociani monomerici; (c) capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); (d) intensitatea culorii.

În mod similar, probele tratate cu ultrasunete și macerate timp de 3 zile (D3), respectiv 5 zile (D5), au înregistrat cele mai ridicate valori ale conținutului de antociani monomerici, în condițiile în care proba martor a fost macerată timp de 7 zile (D7). De asemenea, cele mai mari valori ale intensității culorii au fost observate pentru probele tratate cu ultrasunete și macerate doar 3 zile (D3), cu excepția probei tratate la amplitudine de 90% timp de 5 minute, al cărei maxim a fost înregistrat în ziua a cincea.

Prin urmare, este evident că tratamentul ultrasonic aplicat strugurilor zdrobiți a determinat degradarea structurilor celulare, facilitând extracția compușilor fenolici în timpul procesului de macerare. În plus, durata macerării-fermentării pe boștină a influențat caracteristicile cromatice finale ale probelor de vin. Ca urmare, devine clar că una dintre direcțiile actuale de interes în industria vinicolă este utilizarea ultrasunetelor datorită capacității lor extractive superioare, care permite reducerea timpului necesar etapei de macerare.

- **Corelația dintre durata macerării, nivelul amplitudinii și timpul de tratament ultrasonic**

Analiza statistică a evidențiat faptul că parametrii studiați au fost influențați de trei factori principali: durata macerării, nivelul amplitudinii și timpul de tratament ultrasonic, atât prin efecte individuale, cât și prin efecte de interacțiune. Analiza varianței (ANOVA) realizată asupra parametrilor analitici, în funcție de diferitele durate de macerare, precum și de condițiile de amplitudine și timp de tratament, a evidențiat diferențe semnificative pentru conținutul total de polifenoli (TPC), conținutul de antociani monomerici (MA), capacitatea antioxidantă (FRAP), intensitatea culorii (IC) și nuanța (N) ale probelor (Tabelul 2.14). Modelul statistic prezentat indică, pentru parametri analizați, valori ale coeficientului de determinare ($R^2 > 0,477$), ceea ce confirmă validitatea și relevanța metodei utilizate.

Tabelul 2.14 Analiza varianței coeficienților de regresie pentru diferiți parametri

Rezumatul modelului	R	R^2	Durbin-Watson		Statistică	p - valoare	F - valoare
			R^2 Ajustat	Autocorelație			
CTP	0,781	0,610	0,587	0,778	0,946	<0,001	26,109
AM	0,703	0,494	0,463	0,540	0,975	<0,001	16,249
FRAP	0,690	0,477	0,445	0,564	0,970	<0,001	15,171
IC	0,603	0,480	0,476	0,572	1,037	<0,001	9,518
N	0,806	0,649	0,628	0,287	1,401	0,009	30,854

Notă: coeficient de corelație (R); coeficient de determinare (R^2); semnificația fiecărui parametru (valoare p); $p < 0,05$ semnificativ statistic și $p < 0,001$ semnificativ statistic înalt; raportul dintre suma pătratelor modelului și eroarea reziduală (valoarea F). Cu cât valoarea F este mai mare, cu atât modelul este mai bun; conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomerici (MA); capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); intensitatea culorii (IC); nuanță (N).

Se poate observa că cinetica extracției crește odată cu mărirea duratei macerării, a procentului de amplitudine și a timpului de tratament, coeficientul de corelație (R) fiind de 0,781 în cazul conținutului total de polifenoli (TPC) și de 0,703 în cazul antocianilor monomerici (MA), în timp ce valoarea FRAP crește cu un coeficient de corelație de 0,690.

Indicele Durbin-Watson, utilizat pentru verificarea autocorelației reziduurilor care ar putea invalida modelul, trebuie să aibă valori între 1 și 3, ideal în jurul valorii 2. În cazul de față, valorile acestui indice pentru toți cei trei parametri sunt apropiate de 1, ceea ce indică faptul că modelul se încadrează în limite acceptabile și poate fi considerat valid.

Analiza ANOVA evidențiază faptul că modelul este semnificativ statistic și că predictorii incluși — atât individual, cât și prin interacțiunile dintre ei — influențează semnificativ ($p < 0,001$) conținutul de polifenoli totali (TPC), antociani monomerici (MA) și capacitatea antioxidantă (FRAP). În ceea ce privește intensitatea culorii (IC), aceasta nu este influențată semnificativ de interacțiunea simultană a celor trei predictorii ai modelului. În schimb, nuanța (N) nu este influențată nici de nivelul amplitudinii, nici de timpul de tratament ultrasonic, fiind determinată exclusiv de durata macerării (Tabelul 2.15).

Tabelul 2.15. Efectul amplitudinii și timpului de tratament, precum și al duratei de macerare, asupra TPC, MA, FRAP, IC și N

Factori	<i>p-value</i>				
	TPC	MA	FRAP	IC	N
Timp macerare (zile)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ampitudine (%)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,276
Timp ultrasonare (min.)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,251
Timp macerare * Ampitudine	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,107
Timp macerare * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ampitudine * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	0,038	0,302
Timp macerare * Ampitudine * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	0,394	0,280

Semnificația fiecărui parametru (valoare p); p < 0,05 semnificativ statistic și p < 0,001 semnificativ statistic înalt; conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomerici (MA); capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); intensitatea culorii (IC); nuanță (N).

Datele obținute oferă dovezi solide că tratamentul cu ultrasunete de mare putere aplicat strugurilor Merlot zdrobiți îmbunătățește procesul de extracție a compușilor polifenolici în etapa de macerare. Creșterile observate în conținutul total de polifenoli, conținutul de antociani monomerici, capacitatea antioxidantă determinată prin metoda FRAP și caracteristicile cromatice sunt corelate cu durata macerării, timpul de tratament ultrasonic și procentul de amplitudine aplicat. În majoritatea cazurilor, probele tratate cu ultrasunete și supuse unei macerări de doar 3 zile au înregistrat cele mai ridicate valori ale parametrilor analizați, chiar și în comparație cu proba martor macerată timp de 7 zile. Analiza varianței (ANOVA) a rezultatelor obținute după perioada de macerare indică faptul că modelul este semnificativ statistic, iar predictorii introduși în model (amplitudinea, timpul de tratament și durata macerării), atât individual, cât și prin interacțiunile dintre aceștia, influențează semnificativ ($p < 0,05$) conținutul total de polifenoli, conținutul de antociani monomerici și capacitatea antioxidantă. În ceea ce privește intensitatea culorii, aceasta nu este influențată semnificativ de interacțiunea simultană a celor trei factori, în timp ce nuanța nu este influențată nici de amplitudine, nici de timpul de tratament, fiind determinată exclusiv de durata macerării. Tratamentul cu ultrasunete de mare putere nu doar că îmbunătățește extracția compușilor fenolici și capacitatea antioxidantă, dar contribuie și la reducerea duratei macerării cu 2 până la 4 zile. Acest aspect reprezintă un rezultat promițător în contextul provocărilor actuale din industria vinicolă. Prin urmare, utilizarea ultrasunetelor poate conduce la economii semnificative de timp în etapa de macerare, constituind o soluție eficientă pentru optimizarea proceselor tehnologice și a managementului în crame.

I.2.1.1.4. Influence of High-Power Ultrasound Treatment on Red Wine Quality Parameters, 2024. https://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2024/issue_1/Art40.pdf

Pentru obținerea unor vinuri cu o calitate cromatică ridicată, este necesară o bună difuzie a compușilor fenolici din struguri în must sau în must-vin. Acest proces de extracție, bazat pe degradarea pereților celulari ai pielitelor și semințelor strugurilor, are loc în etapa de macerare, pentru a permite eliberarea compușilor doriți în mediu. În consecință, durata macerării influențează în mod direct calitatea vinului (*Alencar și colab., 2018*).

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea, la scară de laborator, a efectului tratamentului ultrasonic asupra strugurilor Merlot zdrobiți, asupra matricei fenolice a vinurilor roșii, în special asupra antocianilor, care sunt esențiali pentru culoare, stabilitate și profil senzorial.

În plus, pentru identificarea variabilelor cu cea mai mare putere de diferențiere între probe, a fost utilizat algoritmul de clasificare Random Forest, care evidențiază variabilele cele mai importante în gruparea probelor, în ordine descrescătoare a importanței.

a) Pregătirea probelor

Pentru testările de laborator au fost pregătite probe de 1000 g de struguri roșii Merlot, recolta 2019. Au fost selectate aleatoriu 60 de sub-probe a câte 100 g fiecare, care au fost desciorchinate, zdrobite manual și supuse tratamentului ultrasonic cu sondă. După sonicare, au fost formate 6 probe a câte 1000 g fiecare, fiecare conținând 10 sub-probe de câte 100 g. Caracteristicile fiecărei probe au fost determinate ca medie a rezultatelor obținute pentru cele 10 sub-probe. Proba martor (C), netratată, a fost alcătuită din 10 sub-probe de câte 100 g fiecare și a fost analizată separat, deoarece nu a fost supusă tratamentului ultrasonic. Pentru tratament, sub-probele au fost procesate într-un pahar din sticlă Pyrex de 100 mL, prevăzut cu manta de răcire cu apă în contracurent. Temperatura apei de răcire a fost menținută constant la 19 °C. Amplificatorul acustic a fost poziționat la 20 mm deasupra fundului recipientului pentru a asigura uniformitatea tratamentului. Atât proba martor, cât și probele tratate cu ultrasunete au fost supuse procesului de microvinificație. După macerare, probele au fost extrase secvențial la 3 zile (D3), 5 zile (D5) și 7 zile (D7), apoi au fost presate și supuse fermentației alcoolice.

Pentru controlul procesului de vinificație, s-au adăugat 20 g drojdie de fermentație (*Viniferm Saccharomyces cerevisiae*, Agrovin, Spania) la 100 L de must. Temperatura fermentației alcoolice a fost monitorizată zilnic, variind între 19,7 și 21,3 °C. După finalizarea fermentației alcoolice și malolactice, probele au fost separate de drojdii și limpezite utilizând 30 g bentonită/100 L. Ulterior, probele au fost stabilizate la rece la 9 °C și apoi îmbuteliate. Toate experimentele au fost realizate în aceste condiții.

b) Determinarea conținutului total de polifenoli și a antocianinelor

Conținutul total de polifenoli (TPC) a fost determinat prin metoda spectrofotometrică Folin–Ciocalteu, utilizând acidul galic ca standard, iar rezultatele au fost exprimate în μg echivalenți acid galic/mL (μg GAE/mL) (*Singleton și colab., 1999*). O probă de 0,5 mL a fost tratată cu 1,25 mL reactiv Folin–Ciocalteu (Merck, Darmstadt, Germania), diluat anterior 1:10 (v/v) cu apă distilată. După incubare timp de 5 minute la temperatura camerei, s-a adăugat 1 mL soluție de Na₂CO₃ 60 g/L. După 30 de minute de incubare la 50 °C, absorbanta a fost măsurată la 750 nm

utilizând un spectrofotometru UV-VIS (Specord 205, Analytik Jena Inc., Jena, Germania). Curba de calibrare a fost realizată folosind acid galic în intervalul de concentrații 5–250 µg GAE/mL. Antocianii monomerici (MA) au fost determinați prin metoda diferențială de pH (*Lee și colab.*, 2005). Pentru aceasta, 1 mL de vin a fost diluat în două soluții tampon: 14 mL tampon clorură de potasiu (0,025 M, pH 1,0) și 14 mL tampon acetat de sodiu (0,4 M, pH 4,5). După 15 minute la temperatura camerei, absorbanta a fost măsurată la 520 și 700 nm față de apă deionizată. Rezultatele au fost exprimate în mg echivalenți cianidină-3-glucozid/L (mg CGE/L), iar conținutul total de antociani a fost calculat utilizând o masă moleculară de 449,2 g/mol și un coeficient de absorbție molară de 26.900 L/mol·cm.

c) Determinarea capacității antioxidante (FRAP)

Metoda de determinare a capacității antioxidante prin testul FRAP a fost fundamentată pe protocolul propus de Benzie și Strain (1996). În cadrul acestei metode au fost utilizate două soluții de stoc: o soluție de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM în tampon acetat 300 mM (pH = 3,6) și o soluție de 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazină (TPTZ) preparată în HCl 40 mM. Soluția de lucru a fost obținută prin amestecarea tamponului acetat, a soluției TPTZ și a 10 mL soluție $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, după care a fost încălzită la 37 °C înainte de utilizare. Înainte de analiză, probele de vin au fost diluate în raport 1:50 (v/v) cu apă distilată. Ulterior, o alicotă de 0,5 mL din probele diluate a fost pusă în reacție cu 2,5 mL din soluția de lucru, timp de 30 de minute la 37 °C, pentru dezvoltarea reacției de reducere a fierului.

d) Caracteristici cromatice

Intensitatea culorii (IC) și nuanța (N) probelor au fost determinate prin metodă spectrofotometrică. Intensitatea culorii a fost calculată ca sumă a absorbantelor măsurate la lungimile de undă de 420, 520 și 620 nm, utilizând o cale optică de 1 cm. Nuanța (N) a fost exprimată ca raport între absorbanta la 420 nm și absorbanta la 520 nm, conform metodologiei OIV (International Organisation of Vine and Wine, 2021).

e) Analiza statistică

Rezultatele, obținute în triplicat, sunt prezentate ca medie $\pm$ deviație standard (SD). Analiza statistică a fost realizată utilizând software-ul DESIGN-EXPERT® versiunea 13 (Stat-Ease Inc., 2020). Pentru evaluarea diferențelor semnificative statistic între probe s-a utilizat analiza varianței (one-way ANOVA), urmată de testul post-hoc HSD Tukey. Coeficientul de corelație Pearson a fost calculat cu ajutorul software-ului JASP versiunea 0.17.1 (JASP Team, 2023) pentru parametrii TPC, MA, FRAP, IC și N. Vinurile au fost grupate în funcție de parametrii tratamentului ultrasonic utilizând algoritmul Random Forest Clustering (JASP Team, 2023). Acest algoritm împarte datele în clustere distincte, fiecare observație aparținând unui singur grup.

Probele tratate cu ultrasunete și proba martor au fost supuse microvinificației. Procesul de macerare a fost realizat prin extracție secvențială pe o durată de 3, 5 și 7 zile. După fermentare și îmbuteliere, scopul a fost evaluarea impactului parametrilor tratamentului cu ultrasunete de

mare putere — amplitudinea (A) și timpul de tratament (t) — asupra parametrilor de calitate ai vinului, în special asupra compușilor bioactivi precum conținutul total de polifenoli (TPC), conținutul de antociani monomerici (MA), capacitatea antioxidantă FRAP, intensitatea culorii (IC) și nuanța (N), în probele sonicate comparativ cu proba martor (C).

Tabelul 2.16 Efectele tratamentului ultrasonic asupra parametrilor vinului

Probă	Macerare (zile)	TPC (μg GAE/L)	MA (μmol Fe ²⁺ /mL)	FRAP	IC	N
C3		870,32 ± 10,72	105,30 ± 4,02	33,73 ± 1,11	6,61 ± 1,21	1,14 ± 0,07
SM70/3		1407,78 ± 11,09	240,59 ± 3,97	43,79 ± 0,99	23,39 ± 1,75	1,14 ± 0,09
SM70/4		1425,02 ± 10,54	250,82 ± 2,54	44,69 ± 1,23	22,12 ± 2,05	1,27 ± 0,07
SM70/5	3	1715,31 ± 9,63	224,51 ± 2,45	43,96 ± 1,19	21,46 ± 1,97	1,21 ± 0,04
SM90/3		1491,13 ± 14,21	240,46 ± 3,01	51,69 ± 2,56	22,73 ± 2,06	1,24 ± 0,05
SM90/4		1778,54 ± 11,58	239,89 ± 3,65	61,51 ± 3,01	22,42 ± 2,37	1,20 ± 0,10
SM90/5		1925,12 ± 12,31	275,33 ± 2,45	62,43 ± 2,78	20,29 ± 1,13	1,12 ± 0,09
C5		965,16 ± 10,54	206,87 ± 5,11	35,40 ± 1,69	8,35 ± 1,54	0,73 ± 0,04
SM70/3		1169,23 ± 11,23	234,28 ± 6,02	47,37 ± 3,47	9,54 ± 1,50	0,69 ± 0,03
SM70/4		1378,94 ± 10,62	241,95 ± 5,41	52,48 ± 2,56	12,17 ± 1,21	0,77 ± 0,03
SM70/5	5	1795,79 ± 9,36	318,14 ± 3,98	52,52 ± 2,53	19,46 ± 1,74	0,81 ± 0,02
SM90/3		1522,74 ± 11,45	302,83 ± 2,54	52,52 ± 2,55	13,63 ± 1,34	0,74 ± 0,04
SM90/4		1562,98 ± 10,35	337,15 ± 3,87	57,66 ± 3,04	13,93 ± 1,49	0,71 ± 0,06
SM90/5		1689,44 ± 14,21	382,54 ± 3,41	51,19 ± 2,98	24,85 ± 1,89	0,91 ± 0,05
C7		778,34 ± 9,01	220,05 ± 2,58	35,15 ± 1,65	8,68 ± 1,46	0,74 ± 0,07
SM70/3		1 209,46 ± 10,36	191,97 ± 4,05	40,85 ± 2,55	16,98 ± 2,03	0,79 ± 0,03
SM70/4		1467,44 ± 12,54	234,08 ± 3,09	57,28 ± 3,14	11,58 ± 1,92	0,81 ± 0,05
SM70/5	7	1618,21 ± 11,87	215,04 ± 2,96	58,49 ± 2,85	17,31 ± 1,47	0,81 ± 0,02
SM90/3		1536,61 ± 11,25	288,83 ± 5,32	60,35 ± 2,45	16,13 ± 1,25	0,75 ± 0,08
SM90/4		1434,61 ± 9,89	275,78 ± 4,58	51,45 ± 1,95	14,5 ± 1,07	0,78 ± 0,07
SM90/5		1909,63 ± 12,26	335,57 ± 4,56	59,27 ± 1,99	21,36 ± 2,07	0,79 ± 0,04

Proba netratată (C); SW70/3 (A: 70%; t: 3 min), SW70/4 (A: 70%; t: 4 min), SW70/5 (A: 70%; t: 5 min), SW90/3 (A: 90%; t: 3 min), SW90/4 (A: 90%; t: 4 min) și SW90/5 (A: 90%; t: 5 min); conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomerici (MA); capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); intensitatea culorii (IC); nuanță (N); rezultatele sunt exprimate ca valoare medie a celor trei replicări ± deviația standard (SD).

Studiul a analizat acești parametri în probele martor (C) după 3 (C3), 5 (C5) și 7 (C7) zile de macerare. De asemenea, au fost analizate probele tratate cu ultrasunete la amplitudini de 70% și 90%, cu durate de 3, 4 și 5 minute, după 3, 5 și 7 zile de macerare. Probele au fost codificate astfel: SW70/3 (A: 70%; t: 3 min), SW70/4 (A: 70%; t: 4 min), SW70/5 (A: 70%; t: 5 min), SW90/3 (A: 90%; t: 3 min), SW90/4 (A: 90%; t: 4 min) și SW90/5 (A: 90%; t: 5 min), fiecare variantă fiind realizată în triplicat. Determinările analitice efectuate pe probele tratate cu ultrasunete și pe probele martor, supuse diferitelor durate de macerare (3, 5 și 7 zile), urmate de microvinificare și îmbuteliere timp de trei luni, au evidențiat rezultate relevante (Tabelul 2.16). Deoarece este vorba despre vinuri roșii, este important de luat în considerare impactul potențial al tratamentului ultrasonic asupra compușilor colorați. Probele sonicate au prezentat caracteristici cromatice distincte și concentrații mai ridicate de compuși bioactivi încă de la

începutul macerării comparativ cu probele netratate. Această diferență s-a menținut până la finalul procesului de macerare (*Maier și colab., 2023; Margean și colab., 2020*).

- **Efectele tratamentului ultrasonic asupra parametrilor vinului**

După o perioadă de îmbuteliere de trei luni, atât vinurile obținute din struguri tratați cu ultrasunete, cât și vinurile martor au prezentat o scădere a conținutului total de polifenoli comparativ cu valorile înregistrate la sfârșitul macerării. Cu toate acestea, valorile TPC din probele sonicate au rămas superioare celor din probele martor, indiferent de durata macerării (Tabelul 1). Conținutul total de polifenoli a atins valori maxime pentru toate probele la finalul macerării și a scăzut după îmbuteliere, cu variații cuprinse între 1,12% pentru proba SW70/3 (1169,23 μg GAE/mL la finalul macerării) și 64,62% pentru proba C3 (870,32 μg GAE/mL la finalul macerării). Aplicarea ultrasunetelor de mare putere asupra strugurilor sau în timpul vinificației a demonstrat, în studii anterioare, o creștere a randamentului de extracție a TPC (*Ferraretto și colab., 2011; Pérez-Porras și colab., 2021*). Alte cercetări au raportat absența unei degradări semnificative a polifenolilor după sonicația vinurilor roșii (*Natolino și Celotti, 2022*).

În plus, ultrasunetele de mare putere au demonstrat un impact semnificativ asupra structurii fenolice a vinurilor roșii, în special prin accelerarea procesului de învechire (*Ferraretto și Celotti, 2016*). De asemenea, acestea pot intensifica extracția polifenolilor din struguri în timpul vinificației, efectele variind în funcție de soiul de struguri (*Gambacorta și colab., 2017*). Totuși, efectele specifice asupra polifenolilor din vin în timpul depozitării sunt încă în curs de investigare (*Zhang și Wang, 2017b*). Așa cum se observă în Tabelul 1, tratamentul cu ultrasunete de mare putere (HPU) a determinat variații semnificative ale densității optice (420, 520 și 620 nm) și ale conținutului de antociani monomerici. După o perioadă de trei luni de îmbuteliere, s-a înregistrat o scădere semnificativă a valorilor intensității culorii pentru toate probele, comparativ cu valorile obținute la finalul macerării, cea mai mare scădere fiind observată pentru proba SW90/5, extrasă după 5 zile (24,85 la finalul macerării). Cu toate acestea, datele analizate indică faptul că tratamentul ultrasonic a avut un efect pozitiv asupra conținutului cromatic. Toate probele sonicate, inclusiv cele extrase după 3 zile de macerare, au prezentat valori semnificativ mai ridicate ale intensității culorii comparativ cu probele martor (C7), variațiile situându-se între 31,52% (proba SW70/4, extrasă după 5 zile) și 172,67% (proba SW70/4, extrasă după 3 zile). Alte studii au raportat că tratamentul ultrasonic influențează evoluția proprietăților de culoare și a compușilor fenolici majori în timpul depozitării, cu efecte similare între vinurile tratate și netratate, dar cu modificări mai rapide în cazul probelor tratate (*Zhang și Wang, 2017a*).

Conform altor cercetări, probele martor macerate timp de 48 de ore au prezentat cea mai scăzută intensitate a culorii, însă diferențele față de celelalte vinuri martor nu au fost semnificative statistic. În mod similar, intensitatea culorii probelor sonicate macerate 48 de ore nu a diferit semnificativ de vinurile martor expuse la contact cu pielițele timp de 7 zile (*Pérez-Porras și colab., 2021*).

Conținutul de antociani monomerici a fost, de asemenea, evaluat pentru toate probele imediat după etapa de macerare. După trei luni de îmbuteliere, valorile au fost mai scăzute, înregistrându-se o reducere între 27,35% și 73,03%. Cea mai mică scădere a fost observată

pentru proba SW90/4, extrasă după 7 zile (275,78 mg CGE/L la finalul macerării). Această reducere este probabil cauzată de procese precum polimerizarea cu alți compuși fenolici și reacțiile de oxidare. Influența tratamentului ultrasonic asupra conținutului de antociani monomerici este similară cu efectul asupra intensității culorii. Probele martor au prezentat cel mai ridicat conținut de antociani în varianta C7, însă probele sonicate au evidențiat variații semnificative comparativ cu martorul (Tabelul 1), cu creșteri între 2,05% (SW70/3, extras după 7 zile) și 68,1% (SW90/4, extras după 7 zile). Conform Dalagnol și colab. (2017), extracția asistată de ultrasunete accelerează rata de extracție a antocianilor. Este important de menționat că antocianii liberi reprezintă principala sursă de culoare roșie în vinurile tinere, deși aceștia sunt instabili. Stabilizarea lor se realizează în principal prin condensarea cu taninurile, formând aducte antocianină–tanin stabile. Se estimează că aproximativ 25% dintre antociani pot suferi polimerizare cu molecule flavonoidice la finalul fermentației alcoolice, iar după un an acest procent poate depăși 40% (He și colab., 2012a, 2012b). Capacitatea antioxidantă a crescut pentru toate probele după perioada de îmbuteliere, comparativ cu valorile de la finalul macerării. Creșterea activității antioxidante a variat între 3,52% (SW90/5, extras după 7 zile) și 47,1% (SW70/4, extras după 5 zile). Această creștere sugerează că probele sonicate au păstrat o cantitate semnificativă de compuși fenolici, ceea ce a condus la valori FRAP mai ridicate.

Studiile anterioare au arătat că compoziția fenolică a vinului este influențată de procesul de vinificație, existând o corelație semnificativă între compoziția fenolică și capacitatea de reducere a fierului (Lingua și colab., 2016). De asemenea, capacitatea antioxidantă este mai strâns legată de natura compușilor fenolici individuali decât de conținutul total de polifenoli (Banc și colab., 2020). Nuanța vinurilor după trei luni de îmbuteliere a variat între 0,54 (SW90/5, extras după 3 zile) și 0,72 (SW70/4, extras după 5 zile). O valoare mai mică a nuanței indică o contribuție mai mare a componentei roșii, în timp ce valori mai mari indică o tendință spre tonuri portocalii, asociate degradării antocianilor și formării de complexe cu taninurile.

- **Corelația dintre durata macerării, nivelul amplitudinii și timpul de sonicare**

Analiza statistică a datelor indică faptul că parametrii investigați au fost influențați de trei factori principali: nivelul amplitudinii, timpul de tratament ultrasonic și durata macerării, atât individual, cât și în interacțiune. ANOVA a evidențiat diferențe semnificative pentru conținutul total de polifenoli, antociani monomerici, capacitatea antioxidantă, intensitatea culorii și nuanța vinurilor, în funcție de condițiile de procesare. Evoluția acestor parametri este influențată de modificările simultane ale duratei macerării, procentului de amplitudine și timpului de tratament. Coeficienții de corelație indică $R = 0,791$ pentru TPC, $0,208$ pentru MA și $0,518$ pentru activitatea antioxidantă. Valorile R^2 ajustat arată că cei trei predictori pot explica: 60,4% din variația TPC, 46,3% pentru MA, 22,4% pentru FRAP, 26,2% pentru intensitatea culorii și 22,3% pentru nuanță. Studii anterioare au confirmat proporționalitatea directă dintre amplitudinea traductorului și intensitatea ultrasunetelor, precum și creșterea efectelor sonochimice odată cu creșterea amplitudinii (Mason și Lorimer, 2002). Analiza ANOVA confirmă faptul că modelul este semnificativ statistic, iar predictorii incluși, atât individual cât și prin interacțiuni, influențează semnificativ ($p < 0,05$) conținutul de polifenoli totali, antociani monomerici și capacitatea antioxidantă (FRAP) (Tabelul 2.17).

Tabelul 2.17 Analiza efectului diferiților factori asupra parametrilor vinului.

Factori	<i>p-value</i>				
	TPC	MA	FRAP	IC	N
Timp macerare (zile)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ampitudine (%)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,276
Timp ultrasonare (min,)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,251
Timp macerare * Ampitudine	<0,001	<0,001	<0,001	0,003	0,107
Timp macerare * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Ampitudine * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	0,038	0,302
Timp macerare * Ampitudine * Timp ultrasonare	<0,001	<0,001	<0,001	0,394	0,280

Semnificația fiecărui parametru (valoare p); p < 0,05 semnificativ statistic și p < 0,001 semnificativ statistic înalt; conținut total de polifenoli (TPC); conținut de antociani monomerici (MA); capacitate antioxidantă prin reducere ferică (FRAP); intensitatea culorii (IC); nuanță (N).

Intensitatea culorii pare a fi influențată într-o măsură minimă de interacțiunea dintre nivelul amplitudinii, timpul de tratament și durata macerării. Totuși, este important de menționat că nuanța vinurilor este influențată semnificativ de timpul de tratament și de durata macerării.

- **Evidențierea celor mai relevante variabile care diferențiază vinurile prin analiză de grupare**

Random Forest clustering este un algoritm de partiționare dură care împarte datele în mai multe clustere (grupuri), fiecare observație aparținând unui singur grup (JASP Team, 2023). Această abordare de clustering utilizează algoritmul Random Forest într-o manieră nesupervizată, variabila de ieșire „y” fiind setată la NULL.

Setul de date al vinurilor conține rezultatele determinărilor analitice ale vinurilor produse prin tehnologia tradițională (probe martor), precum și ale vinurilor obținute din struguri zdrobiți și tratați cu ultrasunete înainte de etapa de macerare. Cele 63 de probe (21 de probe analizate în triplicat) includ rezultatele a cinci determinări analitice pentru fiecare probă. Variabilele înregistrate sunt: TPC ($\mu\text{g GAE/mL}$), MA (mg CGE/L), FRAP ($\mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mL}$), IC și N.

Scopul utilizării algoritmului Random Forest este identificarea celor mai discriminante variabile între vinuri. Mai precis, modelul de clustering Random Forest este optimizat în raport cu valoarea BIC, care poate fi analizată prin diagrama „elbow”.

Tabelele 2.18 și 2.19 prezintă date statistice de sinteză și performanță ale modelului, precum criteriul informațional Akaike (AIC) și criteriul informațional bayesian (BIC).

Tabelul 2.18 Date statistice privind gruparea pe clustere

Numărul de	Numărul de	R^2	AIC	BIC	Coeficient de
------------	------------	-------	-----	-----	---------------

clustere	probe	siluetă			
5	63	0,638	162330	215910	0,220

AIC este un estimator al erorii de predicție și oferă un criteriu pentru selecția modelelor. BIC este un criteriu de selecție a modelului dintr-un set finit de modele. Modelul preferat este cel care prezintă cea mai mică valoare a BIC. BIC este strâns corelat cu criteriul AIC și se bazează parțial pe funcția de verosimilitate. Atunci când modelele sunt comparabile, adăugarea de parametri poate crește probabilitatea, însă acest lucru poate conduce la suprapunere. Atât BIC, cât și AIC introduc un termen de penalizare pentru numărul de parametri din model, pentru a rezolva această problemă. Totuși, termenul de penalizare este mai mare în cazul BIC decât în cazul AIC. Valoarea silhouette a modelului variază între -1 și 1, unde valoarea 1 reprezintă o separare perfectă. Suma pătratelor pentru fiecare cluster indică gradul de dispersie în interiorul clusterului, în timp ce R^2 indică proporția de variație explicată de model (Tabelul 2.19). Scorurile silhouette descriu gradul de separare între grupuri.

Tabelul 2.19 Gruparea și dimensiunile clusterelor

Cluster	1	2	3	4	5
Dimensiune (număr de probe)	9	11	16	14	13
Suma pătratelor în cadrul grupului	19170	5998	36059	28188	229117
Coeficient de siluetă	0,468	0,498	0,003	0,108	0,177

Tabelul 2.20 prezintă ierarhizarea variabilelor realizată de algoritmul Random Forest, în ordine descrescătoare a importanței pentru gruparea probelor. Cea mai semnificativă variabilă este conținutul total de polifenoli, urmat de capacitatea antioxidantă și intensitatea culorii vinurilor.

Tabelul 2.20. Importanța variabilelor în gruparea probelor

Parametrii	Valoarea importanței
Conținutul total de polifenoli	13796
Capacitatea antioxidantă	12996
Intensitatea culorii	12952
Antociani monomerici	12628
Nuanță	10089

Diagrama „Elbow” indică punctul în care adăugarea unui nou cluster devine inutilă, cunoscut și sub denumirea de „punct de inflexiune” al curbei. Punctul roșu reprezintă valoarea minimă a criteriului BIC, metrică optimizată de model (Figura 2.14).

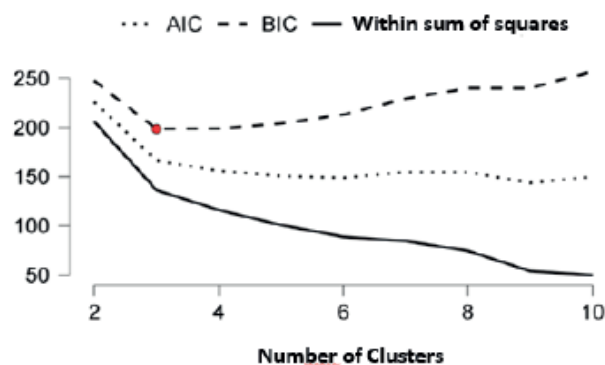


Figure 2.14 Diagrama Elbow

Figura 3 prezintă reprezentarea bidimensională t-SNE, care oferă o imagine de ansamblu asupra caracteristicilor determinate pentru probe. Figura 3 evidențiază gruparea probelor în cluster în funcție de trei factori fixați care le-au influențat caracteristicile: amplitudinea, timpul de tratament și durata macerării.

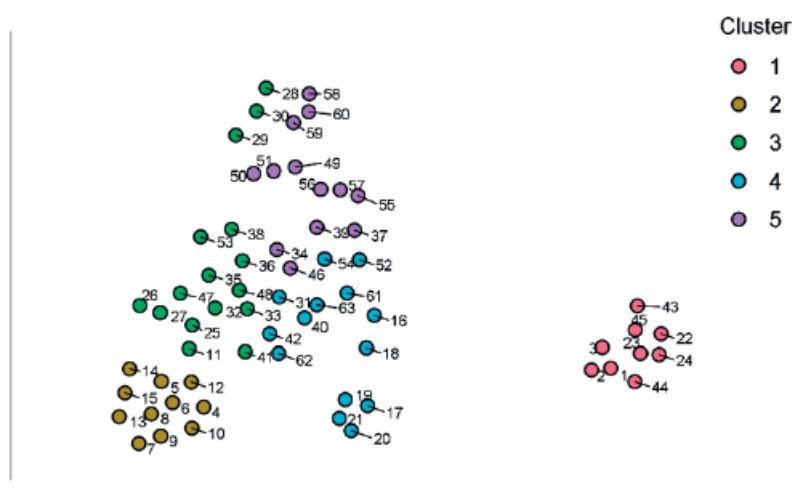


Figura 2.16 Reprezentare bidimensională t-SNE care ilustrează gruparea probelor.

Comparativ cu toate probele supuse tratamentului ultrasonic, probele martor, indiferent de durata macerării, au înregistrat valori semnificativ mai scăzute pentru toți parametrii determinați (a se vedea Tabelul 2.16). Aceste probe martor au fost grupate într-un cluster separat (Clusterul 1).

A fost identificat un cluster (Clusterul 2) în rândul probelor tratate cu ultrasunete. Acest cluster a fost influențat atât de utilizarea unei amplitudini mai reduse (70%) în timpul tratamentului, indiferent de timpul de expunere (3, 4 sau 5 minute), cât și de utilizarea unei amplitudini crescute (90%) asociată unui timp scurt de tratament (3 minute). Ca urmare, pentru acești parametri s-au înregistrat valori semnificativ mai mici ale tuturor indicatorilor analizați, comparativ cu celelalte probe supuse tratamentului ultrasonic.

Clusterul 3 confirmă influența pozitivă a amplitudinii și a timpului de tratament asupra proprietăților vinurilor. Acesta evidențiază, de asemenea, influența duratei de macerare.

Probele din Clusterul 3 au fost extrase după 5 zile, cu 2 zile mai mult decât probele din Clusterul 2. În același cluster este inclusă și o probă supusă unei macerări de 7 zile, dar tratată cu amplitudine redusă (70%) timp de doar 3 minute.

Clusterul 4 și Clusterul 5 grupează probele supuse tratamentului ultrasonic cu amplitudine crescută (90%) timp de 4 sau 5 minute, indiferent de durata macerării, precum și două probe tratate cu amplitudine mai redusă (70%) timp de 4 sau 5 minute, dar cu o durată de macerare de 7 zile. Aceste clustere au înregistrat cele mai ridicate valori pentru toți parametrii analizați ai probelor de vin.

Din aceste rezultate se poate deduce că efectele tratamentului ultrasonic variază semnificativ în funcție de parametrii utilizați.

După o perioadă de trei luni de îmbuteliere, s-a observat o scădere a conținutului total de polifenoli comparativ cu valorile înregistrate la finalul macerării, atât în vinurile obținute din struguri tratați cu ultrasunete, cât și în probele martor, valorile din probele tratate rămânând totuși mai ridicate decât cele ale martorilor, indiferent de durata macerării-fermentării acestora. Totuși, în cadrul fiecărei serii (D3, D5 și D7), această scădere a fost influențată de variația parametrilor tratamentului ultrasonic. **Efectul pozitiv al tratamentului ultrasonic asupra intensității colorante este evident, întrucât toate probele tratate cu ultrasunete, inclusiv cele extrase după 3 zile de macerare, au prezentat valori semnificativ mai mari ale intensității culorii comparativ cu valoarea maximă a probelor martor (C7), variind între 31,52% (proba SW70/4, extrasă după 5 zile) și 172,67% (proba SW70/, extrasă după 3 zile).** În concluzie, tratamentul ultrasonic a modificat semnificativ culoarea vinului, efect considerat benefic pentru calitate, în special în cazul vinurilor tinere, unde culoarea reprezintă un criteriu esențial de evaluare. Conținutul de antociani monomeri al probelor sonicate a prezentat variații semnificative comparativ cu maximum probelor netratate, cu o creștere cuprinsă între 2,05% (proba SW70/3 min, extrasă după 7 zile) și 68,1% (proba SW90/4 min, extrasă după 7 zile). Valoarea maximă a antocianilor în probele martor a fost determinată pentru proba extrasă după 7 zile. Analiza statistică a datelor arată că amplitudinea, timpul de tratament ultrasonic și durata macerării influențează semnificativ ($p < 0,05$) conținutul total de polifenoli, antocianii monomeri și capacitatea antioxidantă. În plus, intensitatea culorii nu este influențată semnificativ de interacțiunea dintre amplitudine, timpul de tratament și durata macerării, în timp ce nuanța vinului este influențată semnificativ doar de timpul de tratament și durata macerării. În plus, pentru identificarea variabilelor cu putere de diferențiere între vinuri, a fost utilizat algoritmul de grupare Random Forest. Acesta a evidențiat că variabila cu cea mai mare importanță este conținutul total de polifenoli, urmat de activitatea antioxidantă și intensitatea culorii vinurilor. Toate probele martor au înregistrat constant valori mai mici pentru toți parametrii analizați și au fost grupate separat, în timp ce probele tratate cu ultrasunete au fost împărțite în patru clustere, confirmând faptul că efectele tratamentului variază semnificativ în funcție de parametrii utilizați (amplitudine și timp). Cu toate acestea, sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege pe deplin implicațiile tratamentului cu ultrasunete asupra culorii vinului și a caracteristicilor organoleptice, precum și fezabilitatea economică și posibilitatea de scalare a implementării ultrasunetelor de mare putere în procesele de vinificație.

1.2.1.2 Optimizarea patametrilor de calitate ai oțetului afine prin utilizarea de tehnologii neconvenționale

În cazul acestei direcții de cercetare, studiile s-au centrat pe extracția de polifenoli și antociani și capacitatea antioxidantă a unor variante de oțet obținute din substraturi alcoolice conținând sucuri de afine tratate cu ultrasunete.

Ultrasound Treatment Influence on Antioxidant Properties of Blueberry Vinegar, 2023. *Fermentation*, 9(7), 600. <https://www.mdpi.com/2311-5637/9/7/600>

Datorită conținutului lor de polifenoli, afinele (*Vaccinium myrtillus* L) reprezintă o sursă valoroasă de arome naturale și antioxidanți pentru oțeturi. Prin utilizarea ultrasunetelor, conținutul acestor compuși valoroși poate fi îmbunătățit în condiții bune.

În continuare au fost efectuate cercetări privind evaluarea conținutului total de polifenoli (CTP), conținutului total de antocianine (CTA) și capacitatea antioxidantă (lucrând cu teste ABTS și DPPH) a mai multor probe obținute prin procesul de fermentație a sucurilor de afine tratate cu ultrasunete. Sucul obținut din fructele de afin a fost stimulat cu ultrasunete (folosind o frecvență de 20 kHz) la amplitudinile A40%, A60% și A80% (A) timp de trei, patru sau cinci minute. După realizarea studiului de optimizare, valorile optime pentru variabile au fost amplitudinea A78,50% și timpul 3,96 minute, iar pentru parametri au fost determinate următoarele valori prevăzute: CTP 628,01 mgGAE/L, CTA 22,79 mg C3G/L, ABTS 391,7 μmol/100mL și DPPH 229,17 μmol/100mL. Tratatamentul cu ultrasunete pentru toate probele de oțet de afine a avut efecte benefice asupra îmbogățirii cu polifenoli și substanțe de antocianină, îmbunătățind antioxidantul și calitatea oțetului de afine.

Prin urmare, obiectivul studiului a fost de a optimiza (utilizând RSM) extracția de polifenoli și antociani și capacitatea antioxidantă a unor variante de oțet obținute din substraturi alcoolice conținând sucuri de afine tratate cu ultrasunete.

a) Analiza materiei prime (afine) și a sucurilor de afine obținute

Aciditatea titrabilă (TA), pH-ul și substanța uscată solubilă (solide solubile totale, TSS indicator exprimat în °Brix) a materiei prime, a sucului de afine și a sucului de afine diluat cu apă sunt prezentate în Tabelul 2.21.

Tabelul 2.21. Aciditatea titrabilă, pH-ul și substanțe solide totale a fructelor de afine (materie primă), sucului de afine și sucului de afine diluat cu apă

Material testat	Aciditate titrabilă (%)	TSS (°Brix)	pH	TSS/TA
Afine	1,29±0,02	12,28±0,47	3,02±0,14	9,44
Suc de afine	0,94±0,01	13,02±0,26	3,17±0,29	12,48
Suc de afine diluat cu apă	0,75±0,01	10,00±0,00	3,3±0,00	11,76

Fiecare valoare reprezintă media a trei determinări ± deviația standard (n = 3).

Conținutul total de fenoli (CTP), conținutul total de antociani (CTA) și potențialul antioxidant, exprimat ca test ABTS și test DPPH, al fructelor de afine (materie primă) și al sucurilor de afine utilizate sunt prezentate în Tabelele 2.22 și 2.23.

Tabelul 2.22. Conținutul total de fenoli, conținutul total de antociani și potențialul antioxidant al fructelor de pădure

Materie primă	CTP (mg GAE/100g)	CTA (mg C3G/100g)	ABTS (μmol TE/g)	DPPH (μmol TE/g)
Afine	642,37±0,24 ¹	80,28±0,82 ¹	38,36±6,03 ¹	27,58±0,5 ¹
	5246,94±19,49 ²	651,46±6,67 ²	312,38±0,74 ²	224,59±5,94 ²

¹Valorile sunt specificate la masa proaspătă (FW); ²Valorile sunt specificate la substanța uscată (DW). Fiecare valoare reprezintă media ± deviația standard (n = 3)

Tabelul 2.23. Conținutul total de fenoli, conținutul total de antocianine și potențialul antioxidant al sucurilor de afine utilizate în proces

Materie primă	CTP (mg GAE/L) (mg GAE /100gDW)	CTA (mg C3G/L) (mg GAE /100gDW)	ABTS (μmol TE/100mL) (μmol TE/g DW))	DPPH (μmol TE/100mL) (μmol TE/g DW)
Suc de afine	1364,52±46,4 ¹	195,28±11,54 ¹	798,2±18,43 ³	653,9±25,18 ³
	1048,0±3,56 ²	149,98±8,82 ²	68,9±7,40 ⁴	50,22±14,72 ⁴
Suc de afine diluat cu apă	972,18±23,4 ¹	142,46±2,80 ¹	600,3±38,19 ³	482, ±28,30 ³
	972,1±23,4 ²	142,46±2,80 ²	60,03±3,80 ⁴	48,27±16,50 ⁴

¹ Valorile exprimate în mg GAE/L (FW). ² Valorile exprimate în mg GAE/100 g DW. ³ Valorile exprimate în μmol TE/100 mL FW. ⁴ Valorile exprimate în μmol TE/g DW. FW masa material proaspăt. DW substanța uscată

Valorile medii ale acidității oțeturilor obținute în acest studiu sunt prezentate în figura 2.17. În general, valorile acidității au fost similare cu datele prezentate de Fonseca et. al pentru oțeturile de afine (*Da Silva Fonseca ș.a., 2018*). Valoarea maximă a conținutului de acid acetic (4,307%) a fost obținută pentru varianta A805 (Figura 2.17).

Conform lui Tarhon M.C. și conform legislației române, oțeturile de fructe trebuie să aibă o aciditate minimă de 3,5 g/100 mL acid acetic și pot prezenta un conținut maxim de etanol rezidual de 1 g/L (Tarhon, 2006).

Oțeturile obținute în acest studiu au fost conforme cu legislația. Legislația nu stabilește valoarea maximă pentru conținutul de acid acetic al oțetului, dar oțetul cu o aciditate care depășește 5.5% poate fi respins de consumatori (*Da Silva Fonseca ș.a., 2018*).

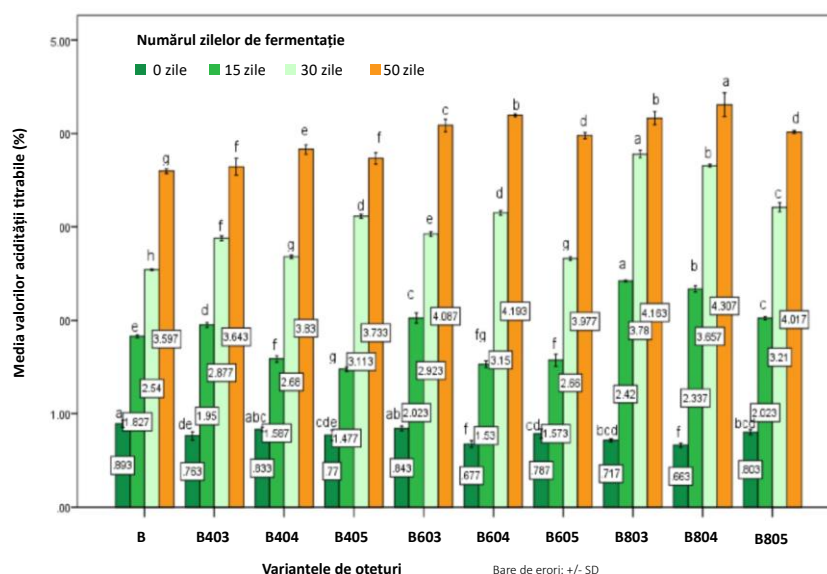


Figura 2.17. Valoarea medie a acidității (% acid acetic) a variantelor de oțet de afine obținute utilizând substraturi tratate cu ultrasunete (grafic al formării acidului acetic în diferite etape ale fermentației acetice). Datele au fost exprimate ca valori medii a 3 determinări ± deviația standard. Valorile cu litere diferite diferă semnificativ prin ANOVA și testul Duncan (p<0.05)

b) Conținutul total de fenoli și conținutul total de antocianine al oțeturilor de affine

Valorile medii ale conținutului total de polifenoli, conținutului total de antocianine și potențialului antioxidant, exprimate ca test ABTS și test DPPH, ale oțeturilor de afine obținute utilizând procesul descris în capitolul material și metode sunt prezentate în Tabelul 2.24.

Tabelul 2.24. Valorile medii ale substanțelor solide totale, conținutului total de polifenoli, conținutului total de antociani monomerici și potențialului antioxidant al oțeturilor de afine

	TSS	CTP		CTA		ABTS		DPPH	
	(°Bx)	(mg GAE/L)	(mg GAE /100gDW)	(mg C3G/L)	(mg GAE /100gDW)	(μmol TE/100mL)	(μmol TE/g DW)	(μmol TE/100mL)	(μmol TE/g DW)
A	8,6	431,33± 24,72 ^e	501,55± 28,74 ^e	13,46± 3,22 ^d	15,65± 3,72 ^d	209,18± 42,60 ^e	24,32± 49,53 ^e	137,41± 11,35 ^e	15,98± 13,20 ^e
A603	8,6	441,41± 51,11 ^e	513,27± 58,75 ^e	15,25± 1,32 ^{cd}	17,73± 1,52 ^{cd}	220,63± 37,22 ^e	25,65± 42,78 ^e	146,68± 16,42 ^e	17,06± 18,87 ^e
A803	8,6	455,45± 38,36 ^e	529,59± 43,44 ^e	16,07± 1,96 ^{cd}	18,69± 2,22 ^{cd}	244,29± 25,87 ^e	28,41± 29,30 ^e	150,66± 11,85 ^e	17,52± 13,42 ^e
A403	8,5	486,77± 25,30 ^{de}	572,67± 29,42 ^{de}	16,45± 2,18 ^{cd}	19,35± 2,53 ^{cd}	260,34± 18,00 ^{de}	30,63± 20,9 ^{de}	139,99± 19,07 ^e	16,47± 22,17 ^e
A604	8,7	475,88± 38,39 ^e	546,99± 44,13 ^e	16,05± 2,60 ^{cd}	18,45± 2,99 ^{cd}	300,62± 34,13 ^{cd}	34,55± 39,23 ^{cd}	155,02± 13,00 ^e	17,82± 14,94 ^e
A805	8,7	601,84± 30,26 ^{ab}	691,77± 33,62 ^{ab}	21,08± 2,44 ^{ab}	24,23± 2,71 ^{ab}	363,69± 14,50 ^b	41,80± 16,11 ^b	217,10± 12,02 ^{ab}	24,95± 13,36 ^{ab}
A605	8,5	547,63± 19,22 ^{bc}	644,27± 22,61 ^{bc}	18,61± 1,50 ^{bc}	21,89± 1,76 ^{bc}	350,51± 25,26 ^{bc}	41,24± 29,72 ^{bc}	187,56± 11,07 ^{cd}	22,07± 13,02 ^{cd}
A804	8,83	536,53± 24,00 ^{cd}	607,62± 26,67 ^{cd}	20,74± 1,86 ^{ab}	23,49± 2,07 ^{ab}	317,31± 25,04 ^{bc}	35,94± 27,82 ^{bc}	179,96± 12,04 ^d	20,38± 13,38 ^d
A404	9,0	643,05± 28,05 ^a	714,50± 32,62 ^a	23,29± 1,34 ^a	25,88± 1,56 ^a	417,19± 37,53 ^a	46,35± 43,64 ^a	238,04± 14,18 ^a	26,45± 16,49 ^a
A405	9,0	588,15± 27,39 ^{abc}	653,50± 32,22 ^{abc}	21,15± 2,38 ^{ab}	23,50± 2,80 ^{ab}	361,03± 17,93 ^b	40,11± 21,09 ^b	204,56± 11,33 ^{bc}	22,73± 13,33 ^{bc}

Datele au fost exprimate ca medie a 3 determinări ± deviație standard. Valorile cu litere diferite diferă semnificativ prin testul ANOVA și testul lui Duncan ($p < 0.05$).

Pentru a înțelege influența tratamentelor cu ultrasunete asupra compușilor biologic activi ai oțeturilor de afine și pentru a îmbunătăți nivelurile acestor substanțe valoroase, a fost folosită Metoda suprafeței de răspuns. Toate ecuațiile polinomiale matematice referitoare la indicatorii oțeturilor obținute în acest studiu sunt prezentate ca rezultate ale RSM. Astfel, în scopul optimizării procesului pentru creșterea nivelului de CTP și CTA, a fost folosit următorul model polinomial conform formulelor 2.8 și 2.9:

$$\text{CTP (mg GAE/L)} = 601.81 + 57.73 \times X_1 + 30.90 \times X_2 - 28.46 \times X_1^2 - 55.83 \times X_2^2 + 1.57 \times X_1 \times X_2 \quad (2.8)$$

$$\text{CTA (mg C3G/L)} = 21.08 + 2.55 \times X_1 - 0.6538 \times X_2 - 0.7289 \times X_1^2 - 1.90 \times X_2^2 - 0.1972 \times X_1 \times X_2 \quad (2.9)$$

unde X_1 indică amplitudinea ultrasunetelor, iar X_2 se referă la durata tratamentului.

Aceste modele indică efectul amplitudinii și timpului asupra valorilor de CTP și CTA în oțetul de fructe, ca rezultat al RSA, utilizând planul experimental prezentat în Tabelul 2.25.

Tabelul 2.25. Răspunsurile măsurate în planul experimental (RSA)

Probe (ID)	Variabile independente		Variabile dependente			
	Amplitudine (X ₁)	Timp (X ₂)	Rezultat 1 CTP (mg GAE/L)	Rezultat 2 CTA (mg C3G/L)	Rezultat 2 ABTS (μmolTE/100mL)	Rezultat 3 DPPH (μmolTE/100mL)
B	-	-	431,33	13,46	209,18	137,41
1 (A603)	60	3	475,88	16,05	300,62	155,02
2 (A803)	80	3	536,53	20,74	317,31	179,96
3(A403)	40	3	441,41	15,25	220,63	146,68
4(A604)	60	4	600,19	21,01	363,43	216,94
5(A604)	60	4	605,32	21,11	364,44	217,88
6(A805)	80	5	588,15	21,15	361,03	204,56
7(A605)	60	5	547,63	18,61	350,51	187,56
8(A604)	60	4	600,21	21,05	363,32	216,44
9(A804)	80	4	643,05	23,29	417,19	238,04
10(A604)	60	4	603,28	21,13	363,42	217,88
11(A404)	40	4	455,45	16,07	244,29	150,66
12(A604)	60	4	600,19	21,12	363,84	216,37
13(A405)	40	5	486,77	16,45	260,34	139,99

Datele au fost exprimate ca medie a 3 determinări $\pm$ deviație standard. Valorile cu litere diferite diferă semnificativ prin testul ANOVA și testul lui Duncan ($p < 0,05$).

Rezultatele referitoare la analiza varianței (ANOVA) pentru răspunsuri în cazul CTP (mg GAE/L) și CTA (mg C3G/L) al probelor de oțet de fructe la diferite niveluri de amplitudine și timp sunt prezentate în Tabelul 2.26.

În cazul probelor tratate inițial cu ultrasunete cu amplitudinea de 80% timp de 4 minute, valorile CTP au fost cele mai mari (643,2 mg GAE/L). Cea mai mică valoare a CTP a fost găsită în probele tratate cu ultrasunete cu amplitudinea de 40% timp de 3 minute (441,4 mg GAE/L) (Figura 2.18).

Referitor la CTA al probelor, cea mai mică valoare a fost raportată la 3 minute și cu o amplitudine de 40%, în aplicația 3 (15,31mg C3GE/L) (Tabelul 2.25). Cea mai mare valoare a CTA a fost identificată în varianta tratată cu amplitudinea de 80% timp de 4 minute (23,29mg C3GE/L) (Tabelul 2.25).

Modificarea valorilor CTP și CTA, în funcție de timpul și amplitudinea ultrasunetelor, este prezentată în figurile 2.18 și 2.19. În modelul de optimizare, s-a determinat că CTP a fost de 628,02 mg GAE/L și CTA a fost de 22,79 mg C3G/L, după 3.96 minute și tratament cu amplitudinea de 78,50%, s-a constatat o creștere cu 45,6% pentru CTP, comparativ cu controlul netratat, și respectiv o creștere cu 69,3% a fost identificată pentru valoarea CTA.

Factor Coding: Actual

TPC (mg GAE/L)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

441.4 643.05

X1 = A: A

X2 = B: Time

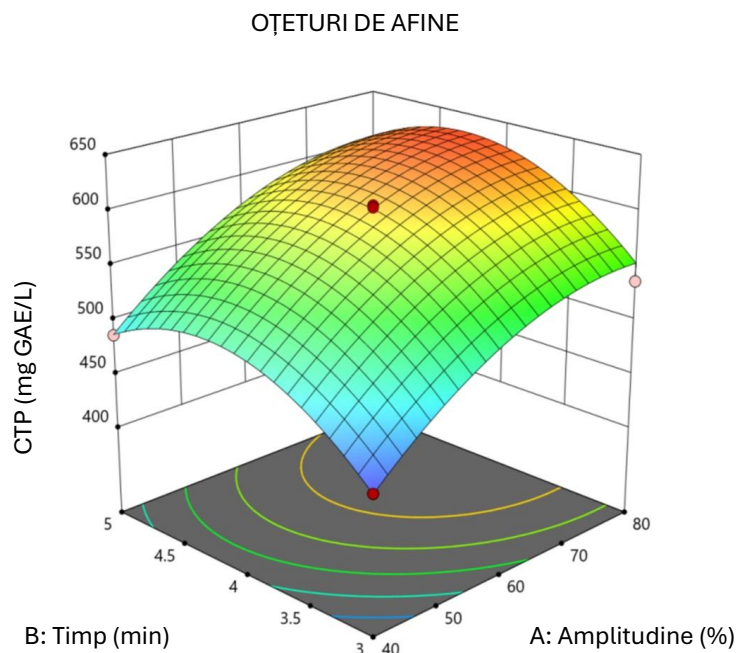


Figura 2.18 Suprafața de răspuns care arată efectul timpului (minute) și amplitudinii (A%) a tratamentelor cu ultrasunete asupra compușilor bioactivi ai oțeturilor de afine: CTP (mg GAE/L) Rezultate similare (referitoare la efectele pozitive ale tratamentelor cu ultrasunete asupra CTP-ului oțetelor) au fost raportate de Yikmiş și colab. pentru oțet de mere și de roșii, de Lieu și colab. pentru suc de struguri, de Brezan și colab. pentru cidru de mere și de Bhat și colab. pentru suc de lime (Yikmiş, 2019; Yikmiş ș.a., 2021; Brezan, 2020; Lieu și Le, 2010; Bhat ș.a., 2011).

Factor Coding: Actual

TAC (mg C3G/L)

Design Points:

● Above Surface

○ Below Surface

15.25 23.29

X1 = A

X2 = B

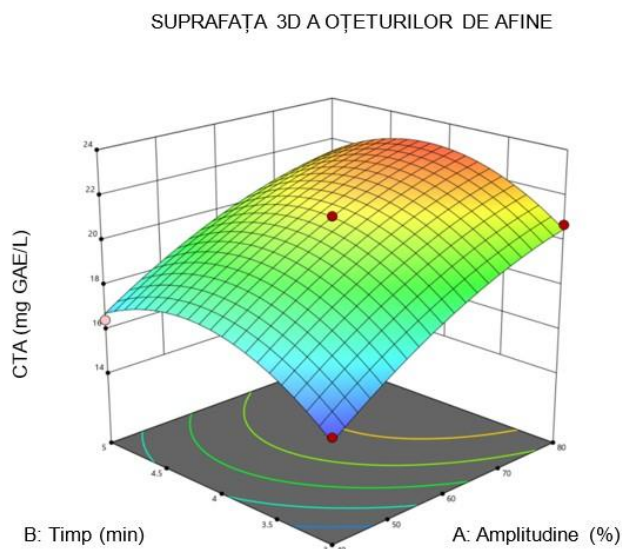


Figura 2.19 Suprafața de răspuns care arată efectul timpului (minute) și amplitudinii (A%) a tratamentelor cu ultrasunete asupra compușilor bioactivi ai oțeturilor de afine: CTA (mg C3G/L)

c) Capacitatea antioxidantă a oțeturilor de fructe de pădure

În scopul optimizării procesului pentru creșterea nivelului de ABTS și DPPH, a fost utilizat următorul model polinomial conform formulelor 2.10 și 2.11:

$$\text{ABTS } (\mu\text{mol TE}/100\text{mL}) = 363,69 + 55,23 \times X_1 + 19,25 \times X_2 - 26,06 \times X_1^2 - 28,64 \times X_2^2 + 1,01 \times X_1 \times X_2 \quad (2.10)$$

$$\text{DPPH} (\mu\text{mol TE}/100\text{mL}) = 217,1 + 27,68 \times X_1 + 9,64 \times X_2 - 14,55 \times X_1^2 - 28,41 \times X_2^2 + 7,82 \times X_1 \times X_2 \quad (2.11)$$

unde X_1 indică amplitudinea ultrasunetelor, iar X_2 se referă la durata tratamentului.

Tabelul 2.27 prezintă rezultatele analizei ANOVA pentru valorile ABTS ($\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$) și DPPH ($\mu\text{mol TEAC}/100 \text{ mL}$) ale probelor de oțet de fructe de pădure. În acest studiu, s-a identificat un coeficient de determinare ($R^2 = 0,8607$ pentru ABTS și $R^2 = 0,9189$ pentru DPPH) pentru a satisface nivelul cerut.

B²	4946,38	1	4946,38	54,53	0,0002	*
Lack of Fit	632,73	3	210,91	381,58	< 0,0001	-
R² = 0,9527; Adjusted R²=0,9189; Std. Dev.=9,41; Media= 190,66; C.V. %=4,94						

SS= Suma pătratelor abaterilor; DF= numărul gradelor de libertate; MS= media pătratică; p= nivel de încredere

Variația valorilor ABTS și DPPH, în funcție de variabilele US (amplitudinea și timpul), este prezentată în Figurile 2.20 și 2.21.

La finalul optimizării, s-a constatat că ABTS a fost de 363,69 ($\mu\text{mol TE}/\text{L}$) și DPPH respectiv 217,102 ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$) cu un tratament de 3,96 minute și amplitudine de 78,50% (Figura 2.22).

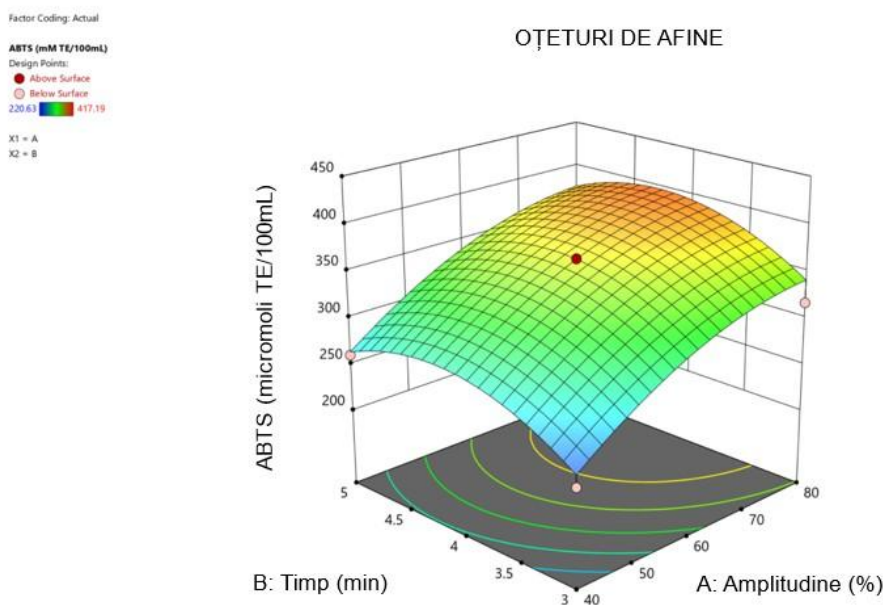


Figura 2.20. Suprafața de răspuns care arată efectul timpului (minute) și amplitudinii (A%) a tratamentelor cu ultrasunete asupra potențialului antioxidant al oțeturilor de afine: test ABTS

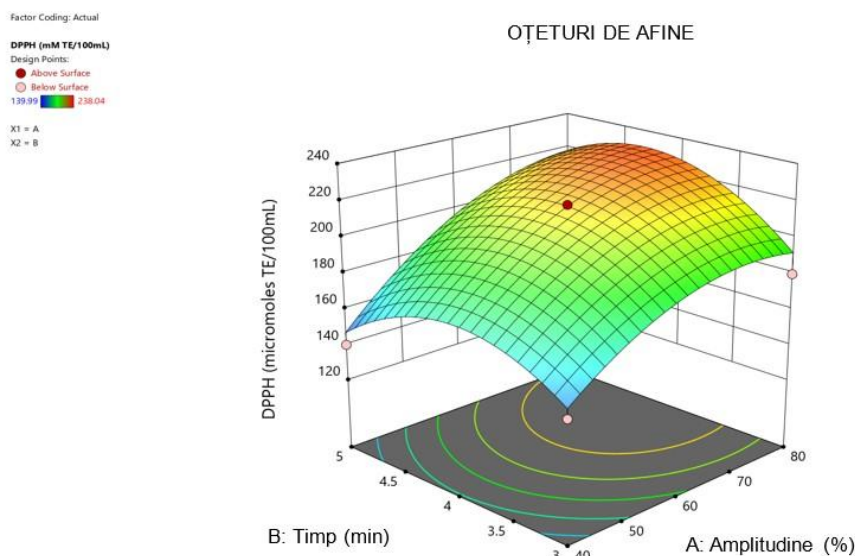


Figura 2.21. Suprafața de răspuns care arată efectul timpului (minute) și amplitudinii (A%) a tratamentelor cu ultrasunete asupra potențialului antioxidant al oțeturilor de afine: (b) test DPPH

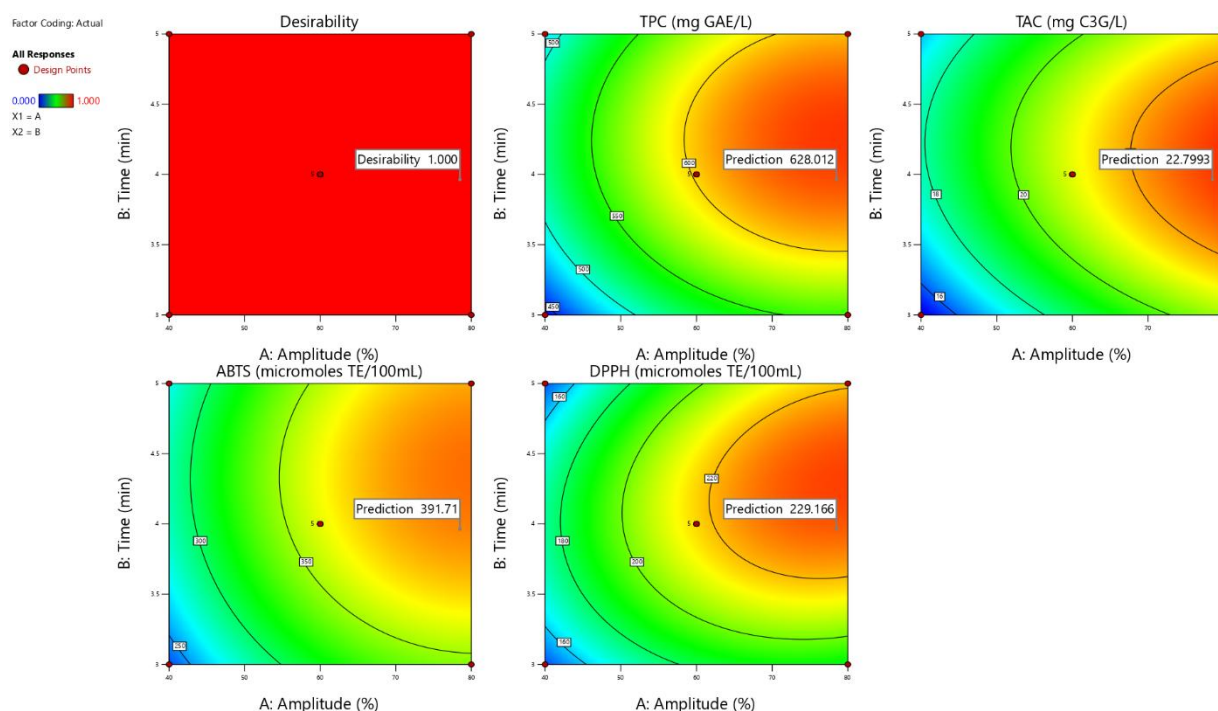


Figura 2.22. Ploturile de contur care indică valorile optime prezise pentru toate răspunsurile (valorile prezise ale parametrilor pentru amplitudinea de 78,50% și perioada de timp de 3,96 minute a tratamentului cu ultrasunete). CI (%) pentru CTP (612,715; 643,31), pentru CTA (22,4769; 23,1216), pentru ABTS (366,732; 416,689) și pentru DPPH (218,104; 240,227)

Cea mai mică valoare a DPPH ($\mu\text{mol TE/L}$) a fost determinată în proba tratată timp de 5 minute și amplitudine de 40% în aplicația 13 ($139,1\mu\text{mol TE/100mL}$); cea mai mare valoare a DPPH a

fost detectată în proba tratată cu amplitudinea de 80% timp de 4 minute ($238,9\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$).

Capacitatea antioxidantă menționată în acest studiu este mai mare decât cea raportată de Arvaniti ș.a. (2019) pentru oțeturile grecești comerciale și făcute în casă (din cidru de mere) și similară cu cea specificată de Fonseca ș.a. (2018) pentru oțetul de afine și miere obținut folosind un alt proces de fermentație. După cum au afirmat Wang ș.a. (2017), radicalii ABTS și DPPH au o compoziție stereo-chimică diferită și, în consecință, conferă, după interacțiunea cu antioxidanții, o reacție calitativ diferită pentru dezactivarea radicalilor. Prin urmare, este clar că este necesară mai mult decât o singură analiză pentru a furniza cantitatea de informații necesare pentru a estima potențialul antioxidant.

Figura 2.22 arată că este probabil să se obțină o gamă satisfăcătoare de antioxidanți prin aplicarea unei amplitudini A78,50% și a unei perioade de timp de 3,96 minute, iar acest fapt se datorează probabil sensibilității ridicate a fenolilor la aceste condiții.

d) Analiza HPLC a compușilor fenolici

În acest studiu, au fost identificate patru compuși fenolici (acid elagic, acid galic, acid ferulic și acid clorogenic) în mai multe probe alese în funcție de rezultatele obținute utilizând optimizarea modelului. Nivelul acestor antioxidanți în oțeturi obținute folosind substraturi tratate cu ultrasunete la amplitudinea 80% și 60% pentru 4 și 5 minute și substraturi netratate sunt prezentate în Tabelul 2.28.

Tabelul 2.28. Compuși fenolici identificați în probele de oțeturi prin HPLC

Proba	Acid Elagic ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Acid Galic ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Adic Ferulic ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)	Acid Clorogenic ($\mu\text{g}/100\text{mL}$)
A	$1,781\pm 0,085^d$	$21,466\pm 2,72^d$	$1,506\pm 0,038^d$	$17,422\pm 1,083^b$
A804	$3,347\pm 0,026^a$	$35,22\pm 1,03^a$	$2,538\pm 0,116^a$	$18,801\pm 0,995^a$
A805	$3,271\pm 0,018^b$	$34,065\pm 0,85^b$	$1,967\pm 0,047^b$	$8,588\pm 0,084^d$
A604	$3,062\pm 0,104^c$	$28,215\pm 1,34^c$	$1,59\pm 0,062^c$	$14,238\pm 1,027^c$
A605	$2,353\pm 0,163^c$	$21,914\pm 2,78^d$	$1,536\pm 0,009^{cd}$	$8,447\pm 0,082^d$

Datele au fost exprimate ca medie a 3 determinări $\pm$ deviație standard. Valorile cu litere diferite diferă semnificativ prin testul ANOVA și testul lui Duncan ($p<0,05$).

După cum se poate observa în acest tabel, nivelul tuturor compușilor fenolici testați prin HPLC a fost cel mai ridicat în proba de oțet A804 (ID din Tabelul 2.28). Acest oțet a fost obținut folosind A 80% timp de 4 minute, aceste valori ale parametrilor de tratament fiind foarte apropiate de cele înregistrate după aplicarea modelului de optimizare (A 78,5%, 3,96 minute).

Figura 2.23 prezintă rezultatele analizei senzoriale a probelor de oțet de afine. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între toate probele în ceea ce privește gustul oțeturilor. Proba A804 (8,18) (ID din Tabelul 2.23) a fost proba preferată în ceea ce privește evaluarea culorii (8,27), intensitatea aromatică (8,18), mirosul înțepător (7,07) și evaluarea generală a impresiei (8,18) ($p < 0,05$).

Au existat diferențe semnificative între probe la $p<0,05$ și n.s. fără diferență statistică.

Alți cercetători au raportat, de asemenea, o îmbunătățire a evaluărilor senzoriale datorită tratamentelor cu ultrasunete utilizate în procesarea diferitelor sucuri de fructe (*Jambrack ș.a., 2017*).

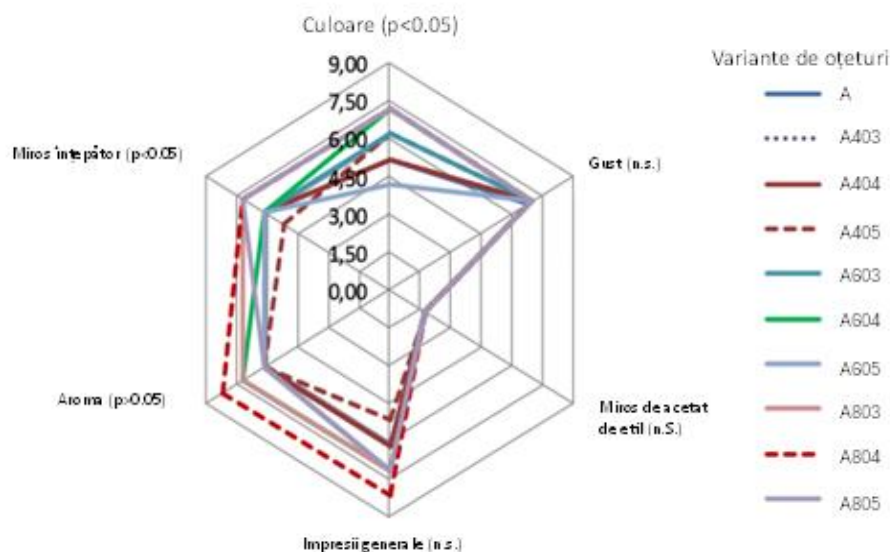


Figura 2.23 Rezultatele analizei senzoriale pentru oțeturile de afine

e) Producția variantelor de oțet de afine

Afinele proaspete au fost sortate, zdrobite mecanic (cu un mixer) și sucul de afine a fost obținut în condiții de laborator folosind un extractor de suc centrifugal Bosch MES3500 (700 W) (Bosch GmbH, Stuttgart, Germania) urmând o procedură tipic aplicată la scară casnică. Sucul clar de afine obținut a fost utilizat pentru producerea oțetului conform schemei tehnologice prezentate în figura 2.24.

În primul rând, sucurile de afine au fost diluate cu apă pentru a obține substraturi cu substanțe solubile totale de 10 °Brix. Apoi, aceste substraturi au fost amestecate cu etanol (7%, v/v) și glucoză (4%, w/v), și oțet de mere (10%, v/v, pentru acidificare). Un amestec comercial de săruri minerale (0.03%, w/v; Acetozym® (Heinrich Frings GmbH & Co, SUA)) a fost folosit pentru a suplimenta substraturile. După tratamentul cu ultrasunete, acest substrat, având suficient alcool pentru fermentația acetică, a fost inoculat (în raport de 10%, v/v) cu o cultură de bacterii acetice pregătită conform lui Cunha și Fonseca (*Da Cunha ș.a., 2016; Da Silva Fonseca ș.a., 2018*). Astfel, un volum de 200 mL de substrat tratat cu ultrasunete a fost transferat în borcanul de sticlă și inoculat cu 20 mL de cultură de bacterii. Volumul total pentru toate variantele a fost de 220 mL, iar temperatura a fost setată la 30°C

- **Aciditate titrabilă, pH și Substanțe Solubile Totale**

Valorile pH-ului, acidității titrabile (% acid acetic) și substanțelor solubile totale au fost determinate pentru substraturi (înainte de fermentație) și pentru probele de oțet.

- **Tratamentul cu ultrasunete**

Înainte de inoculare, substraturile au fost tratate cu ultrasunete (VCX-750, Sonics & Materials, Inc. Newtown, CT, SUA) folosind o frecvență continuă de 20 kHz, o amplitudine de A40%, A60% și A80% și o putere de 750 W pentru perioade de 3, 4 și 5 minute pentru mostre de 19 mm și 500 ml ca amestec (Brezan *ș.a.*, 2020).

• Design experimental factorial

Variantele de oțet de afine au fost analizate folosind software-ul de analiză statistică Minitab (Minitab 18.1.1) și metodologia RSM (metoda suprafeței de răspuns), pentru a optimiza efectul tratamentelor cu ultrasunete asupra proprietăților antioxidante ale produselor. Ca plan experimental, a fost aleasă o proiectare compusă centrală. A fost creat și conceput un experiment factorial complet cu doi factori și trei niveluri. Amplitudinea (X1) și timpul (X2) tratamentelor cu ultrasunete au fost alese ca argumente, iar conținutul total de fenoli, conținutul total de antociani, valorile DPPH și ABTS au fost variabilele dependente (răspunsurile designului). Modelul a fost creat folosind o ecuație polinomială. Tabelul 2.21 prezintă aplicațiile testate (probele ID) utilizate pentru optimizare.

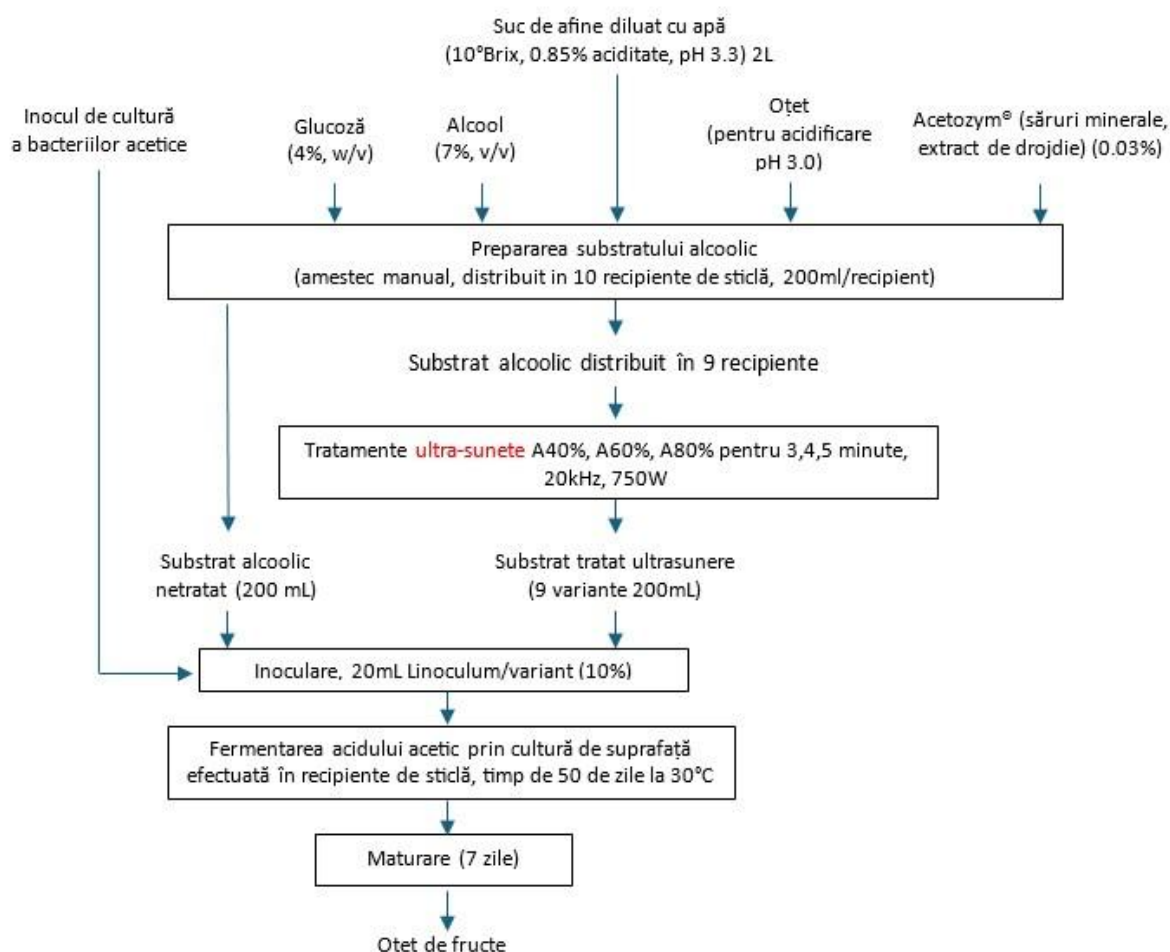


Figura 2.24 Principalele etape din procesul de obținere a oțetului de afine (Abrevieri: US = ultrasunete)

- **Conținutul total de fenoli (CTP) și conținutul total de antociani monomeri (CTA)**

Conținutul total de fenoli (CTP) al probelor a fost analizat folosind metoda Folin–Ciocâlteu (*Singleton ș.a.,1999*) utilizând un spectrofotometru cu plăci (Tecan, SunRiseTM, software MagellanTM, Männedorf, Elveția). CTP a fost indicat în miligrame echivalente de acid galic (GAE) raportate la litru de oțet, respectiv în miligrame echivalente de acid galic raportate la 100 g DW (dry weight, substanță uscată).

Antocianii monomerici totali au fost determinați folosind metoda diferențială de pH, iar absorbanta a fost măsurată pe un spectrofotometru DR2800 (Hach Lange, Loveland, SUA) (*Wang H ș.a., 2017*). Rezultatele au fost raportate ca mg de cianidin 3-O-glucozidă (C3G) pe litru de oțet, respectiv pe 100 g DW (substanță uscată).

- **Metoda ABTS.** Potențialul antioxidant al variantelor de oțet în reacție cu radicalul ABTS (acid 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonic) (ABTS·+) a fost determinat conform unei metode descrise de Re et al. (*Re R ș.a., 1999*). Standardele Trolox au fost utilizate pentru a genera curba de calibrare. Rezultatele au fost raportate în μmol echivalenți Trolox per litru de oțet (μmol TE/L) și per gram de substanță uscată (μmol TE/g DW).
- **Metoda DPPH** Testul cu 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) a fost efectuat conform unei metode descrise de Kumara ș.a. (*Kumaran și Karunakaran, 2006*). Absorbția a fost analizată la 517 nm (spectrofotometru DR2800, Hach Lange, Loveland, SUA) având metanolul ca probă martor. Capacitatea antioxidantă a probelor împotriva radicalilor DPPH a fost exprimată ca micromoli echivalenți Trolox per 100 mL de oțet (μmol TE/100mL) și per gram de substanță uscată (μmol TE/g DW), folosind o curba de calibrare realizată anterior.

• **Analiza HPLC** Profilul compușilor polifenolici a fost determinat prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) conform metodei descrise de Abdel-Hameed și colab. (*Abdel-Hameed ș.a., 2013*). Separările au fost efectuate folosind un cromatograf Agilent Technologies 1200 echipat cu detector UV-DAD, utilizând o coloană de 250 mm x 4 mm Licrocart (Licrospher PR-18 5μm) (Merck, Darmstadt, Germania) operată la 30 °C. Toate datele înregistrate au fost procesate folosind software-ul Agilent Chem Station B.04.03 (Agilent, SUA). Faza mobilă a constat din apă/acid acetic (97:3, v/v) (eluent A) și acetonitril (eluent B) la un debit de 1 mL/min. Profilul gradientului liniar a fost următorul: 97% A (0 min), 97–91% A (5 min), 91–84% A (5-15 min), 84–65% A (15-20,8 min), 65–64,5% A (20,8-36 min), 64,5–50% A (36-37 min), 50% A (37-38 min), 50–97% A (38-39 min) și 97% A (42 min). Volumul de injecție a fost de 20 μL.

- **Analiza senzorială**

Acceptabilitatea generală a probelor de oțet a fost evaluată prin considerarea profilurilor de miros și gust (impresie generală, senzație pungentă, intensitate aromatică, gust și miros de acetat de etil). La evaluarea probelor de oțet au participat 12 femei și 10 bărbați. Fiecare probă a fost dozată în recipiente de sticlă de 20 ± 1 g și a fost păstrată la 4...6 °C până la servire. Pentru efectuarea analizei, s-a utilizat o scală hedonică de 9 puncte. Scorurile scalei au fost următoarele: excelent, 9; foarte bun, 8; bun, 7; acceptabil, 6; și slab, <6.

- **Analiza statistică**

În scopul optimizării potențialului antioxidant al oțetului de afine, s-a utilizat RSM (Minitab 18.1, Minitab, Inc). Au fost obținute grafice tridimensionale (Sigma Plot 12.0 Statistical Analysis Software, Systat Software, Inc.). Analiza a fost efectuată de trei ori.

Acest studiu oferă dovezi solide privind integrarea tratamentului cu ultrasunete aplicat substratului alcoolic care conține suc de afine, ca etapă eficientă în producția de oțet, pentru a crește extracția compușilor bioactivi și, implicit, pentru a îmbunătăți proprietățile antioxidante ale produselor rezultate. Valoarea adăugată a acestui studiu constă atât în utilizarea unei rețete noi pentru obținerea oțetului de afine, bazată pe un substrat alcoolic care conține suc de fructe, cât și în optimizarea, prin metodologia suprafeței de răspuns (RSM), a procesului de extracție a compușilor antioxidanți din afine. Datele obținute au demonstrat că oțeturile de afine tratate cu ultrasunete și optimizate prezintă o calitate superioară în ceea ce privește conținutul de polifenoli și antociani, având totodată proprietăți antioxidante mai bune. Pentru valorile optime ale acestor parametri, s-au determinat valori mai bune ale amplitudinii ultrasunetelor și duratei de tratament de 78,50% și, respectiv, 3,95 minute. Analiza senzorială a variantelor de oțet de afine a arătat că probele obținute din substraturi tratate cu ultrasunete au fost, în general, mai apreciate comparativ cu proba de control. Proba de oțet obținută prin tratament cu ultrasunete la amplitudine de 80% timp de 4 minute, care a prezentat cele mai ridicate niveluri de CTP și CTA și cele mai puternice proprietăți antioxidante evaluate prin testele DPPH și ABTS, a fost cea mai preferată din punct de vedere al culorii, intensității aromatice, senzației de înțepătură și impresiei generale.

Oțeturile de afine obținute prin tratamentul cu ultrasunete al materiei prime reprezintă o sursă importantă de compuși polifenolici care contribuie la aportul zilnic de antioxidanți. Se intenționează extinderea cercetărilor pentru o analiză mai detaliată a compușilor polifenolici din variantele de oțet de afine obținute prin tratamente cu ultrasunete. Rezultatele evidențiază faptul că utilizarea unui substrat alcoolic tratat ultrasonic reprezintă o abordare inovatoare cu aplicabilitate practică, atât pentru inițierea rapidă a fermentației acetice, cât și pentru îmbunătățirea proprietăților antioxidante ale oțetului de afine. În lumina acestei abordări, se intenționează continuarea cercetărilor asupra oțeturilor de afine ca produse cu potențial antioxidant promițător și multiple beneficii pentru sănătatea umană.

I.2.2 Evaluarea calității, siguranței și funcționalității produselor alimentare procesate prin metode moderne de analiză și valorificare tehnologică

Această direcție de cercetare a abordat următoarele tematici:

- metode standardizate *versus* metode alternative de analiză microbiologică a produselor alimentare
- utilizarea tehnicilor moderne de analiza a expunerii produselor din carne la prezența hidrocarburilor policiclice aromatice
- utilizarea diferitelor metode de analiză cantitativă și calitativă la produsele din pește gătit prin diferite tehnici

1.2.2.1 Metode standardizate versus metode alternative de analiză microbiologică a produselor alimentare

<https://www.e-repository.org/rbl/vol.25/iss.4/9.pdf>

Metodele convenționale de testare bacteriologică se bazează pe utilizarea unor medii de cultură specifice pentru enumerarea și izolarea celulelor bacteriene viabile din alimente. Aceste metode sunt foarte sensibile, relativ ieftine și pot furniza atât informații calitative, cât și cantitative privind numărul și natura microorganismelor prezente în proba alimentară. Metodele tradiționale de detectare a bacteriilor implică următoarele etape fundamentale: preîmbogățire, îmbogățire selectivă, însămânțare pe medii selective, screening biochimic și confirmare serologică (*Pucleanu și colab., 2017*).

Metodele rapide și inovatoare în testele microbiologice oferă rezultate mai sensibile, mai precise și mai reproductibile comparativ cu metodele convenționale (*Nemati și colab., 2016; Van Der Zee și colab., 1997*).

O metodă rapidă poate fi un test care oferă rezultate instantanee sau în timp real, dar poate reprezenta și o simplă modificare a unei proceduri care reduce durata analizei. Aceste metode nu se limitează doar la detecția și enumerarea timpurie a microorganismelor, ci includ și caracterizarea izolatelor prin metode microbiologice, chimice, biochimice, biofizice, biologice moleculare, imunologice și serologice (*Mandal și colab., 2011*).

Industria alimentară are nevoie de metode rapide și sensibile din mai multe motive: furnizarea de informații imediate privind posibila prezență a agenților patogeni în materiile prime și produsele finite; prezența frecventă a unor numere reduse de bacterii patogene în medii biologice complexe, alături de microorganisme nepatogene; faptul că prezența chiar și a unui singur microorganism patogen poate reprezenta o doză infecțioasă; monitorizarea controlului proceselor tehnologice, a curățeniei și a practicilor igienice în timpul fabricației; reducerea erorilor umane, precum și economisirea timpului și a costurilor de muncă (*Mandal și colab., 2011*).

Aceste metode sunt disponibile pentru detectarea rapidă sau estimarea grupurilor de microorganisme indicatoare, a microorganismelor patogene, a toxinelor bacteriene și micotoxinelor, precum și a mucegaiurilor. Metodele alternative pot fi clasificate în funcție de principiile pe care se bazează: metode convenționale modificate, măsurarea instrumentală a metabolismului bacterian, bioluminescență, tehnici imunologice, tehnici ADN și combinații ale acestora. Pentru a răspunde cerințelor utilizatorilor, trusele de testare trebuie să fie precise, sensibile, specifice, rapide (24 de ore sau mai puțin), ușor de utilizat și să necesite un consum redus de muncă. De asemenea, acestea trebuie să permită informatizarea, să aibă o limită de detecție scăzută și costuri reduse de investiție și operare (*Van Der Zee și colab., 1997, Van Der Zee și colab., 1994, Guillermo și colab., 2012*).

Pentru a răspunde provocărilor viitoare într-un mediu în continuă schimbare, este necesară identificarea competențelor adecvate și dezvoltarea unui model de formare specializată și continuă (*Shaping The Future Of Food Safety, Together, 2015*).

După 48 de ore de incubare, metoda PCR a oferit în toate cazurile rezultate egale sau superioare metodelor culturale de referință ale Food and Drug Administration, de exemplu în cazul detecției *Listeria monocytogenes* (*Patrinos și colab., 2016*). Studiul independent de

validare realizat de Campden and Chorleywood Food Research Association Group (CCFRA) a demonstrat că sistemul LightCycler pentru detectarea *Listeria monocytogenes* prezintă o sensibilitate comparabilă cu metodele de referință (Junge și colab., 2006).

Scopul acestui studiu a fost de a verifica concordanța rezultatelor obținute prin metode diagnostice alternative rapide cu cele ale metodelor standardizate, prin analiza unor probe alimentare prelevate în cadrul programelor de autocontrol din diferite unități de procesare din județul Brașov.

Analiza comparativă a metodelor diagnostice microbiologice alternative și standardizate utilizate în expertiza alimentelor

Probele au fost inițial testate prin metode alternative, iar cele care au prezentat rezultate pozitive (neconforme) au fost ulterior analizate prin metode standardizate, în vederea confirmării sau infirmării rezultatelor obținute.

Testele efectuate prin metode alternative au inclus:

- detectarea agenților patogeni alimentari (*Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*) cu ajutorul echipamentului Mini Vidas;
- enumerarea indicatorilor de calitate (*Staphylococcus* coagulazo-pozitiv, *Escherichia coli*, Enterobacteriaceae, numărul total de germeni aerobi, drojdii și mucegaiuri) utilizând echipamentul TEMPO;
- identificarea bacteriană cu ajutorul echipamentului VITEK 2 COMPACT.

Metodele de referință utilizate pentru confirmarea cazurilor de pozitivitate rezultate în urma testelor rapide au fost următoarele metode standardizate:

- detecția agenților patogeni alimentari: SR EN ISO 6579-1 (*Salmonella spp.*); SR EN ISO 11290-1 (*Listeria spp.*); SR EN ISO 10272-1 (*Campylobacter spp.*);
- enumerarea indicatorilor de calitate: SR EN ISO 6888-2:2002/A1:2005 (*Staphylococcus spp.*); SR ISO 16649-2:2007 (*Escherichia coli*); SR EN ISO 21528-1,2 (*Enterobacteriaceae*); SR EN ISO 4833-1/2014 (numărul total de germeni); SR EN ISO 21527-1 (drojdii și mucegaiuri);
- metoda Kaufmann–White pentru identificarea bacteriană.

Expertiza a fost realizată în cadrul Laboratorului Sanitar Veterinar și pentru Siguranța Alimentelor din Brașov, utilizând metode validate și acreditate conform SR EN ISO 17025/2005, atât pentru metodele de referință, cât și pentru metodele alternative. Identificarea bacteriană prin metoda Kaufmann–White a fost efectuată în cadrul Institutului de Igienă și Sănătate Publică Veterinară din București.

Pentru detecția agenților patogeni alimentari au fost analizate un număr de 7761 de probe utilizând sistemul Mini Vidas, așa cum sunt detaliate în Tabelul 2.29.

Echipamentul Mini Vidas este un sistem compact de înaltă performanță utilizat în identificarea germenilor cu potențial patogen ridicat (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, enterotoxine stafilococice etc.), având ca principiu de funcționare analiza imunologică.

Table 2.29. Numărul de probe prelevate și analizate prin tehnici alternative pentru detectarea agenților patogeni alimentari

Parametrii Analizați	Probe	
	Nr.	%
<i>Salmonella spp.</i>	4257	54,85
<i>Listeria spp.</i>	2983	38,44
<i>Campylobacter spp.</i>	521	6,71
TOTAL	7761	100.00

Comparativ cu metodele standardizate, utilizarea acestuia permite reducerea semnificativă a timpului necesar pentru etapele de pregătire, precum prepararea mediilor de cultură, sterilizarea materialelor din sticlă, ambalarea, etichetarea, inocularea, citirea plăcilor, autoclavarea și spălarea materialelor de laborator, prin utilizarea de reactivi predefiniți, gata de utilizare (Figura 2.25).



Figura 2.25 Analizor automat MiniVidas

Analizorul automat MiniVidas oferă o gamă largă de analize și aplicații, precum și siguranță și ușurință în utilizare, fiind un sistem automatizat, standardizat și robust, care permite citirea obiectivă a rezultatelor și furnizarea rapidă a acestora în comparație cu fluxurile de lucru clasice.

Matricile din care pot fi identificați agenții patogeni alimentari, precum și timpul necesar diagnosticului de laborator pentru detectarea acestora, sunt prezentate în (Tabelul 2.30).

Tabelul 2.30. Matrici și timpi necesari

Germeni bacterieni care pot fi identificați	Matrice	Timpi necesari (ore)
<i>Salmonella spp.</i>	Toate produsele alimentare pe durata perioadei de valabilitate.	48
<i>Listeria monocytogenes</i>	Toate produsele alimentare înainte de părăsirea controlului direct al unității care le-a produs și produsele comercializate pe durata termenului de valabilitate (carne și produse din carne, lapte crud, brânzeturi din lapte nepasteurizat, produse	72

	de cofetărie și patiserie, alimente, pește și produse din pește).	
<i>Campylobacter jejuni</i>	Carcase de pui – perioada de supraveghere 1.04 – 30.09 (sezonul cald).	72

Pentru determinarea indicatorilor de calitate, au fost analizate 5123 de probe utilizând echipamentul TEMPO, după cum urmează: (Tabelul 2.31).

Tabelul 2.31. Numărul de probe prelevate și examinate prin tehnici alternative pentru enumerarea indicatorilor de calitate

Parametrii Analizați	Probe	
	Nr.	%
<i>Salmonella spp.</i>	855	16,69
<i>E.coli</i>	1235	24,10
<i>Enterobacteriaceae</i>	943	18,41
NTG	1520	29,67
D +M	570	11,13
TOTAL	5123	100.00

Metoda TEMPO este o metodă complet automatizată care permite determinarea cantitativă a germenilor bacterieni. Aceasta se bazează pe microbiologia clasică, având la bază metoda tuburilor multiple. Spre deosebire de metodele standardizate, aceasta prezintă o serie de avantaje, dintre care cele mai importante sunt: sensibilitatea ridicată și ușurința în utilizare, furnizarea rapidă a rezultatelor, precum și reducerea timpului necesar pentru etapele de preparare a mediilor de cultură, sterilizarea materialelor din sticlă, ambalare, etichetare, inoculare, citirea plăcilor, autoclavare și spălarea materialelor de laborator etc. (Figura 2.26).



Figura 2.26 Stație de citire: citirea, interpretarea, validarea și transferul rezultatelor

Mediul este inoculat cu o diluție a probei de analizat și transferat, prin intermediul instrumentului de umplere TEMPO, în cardul TEMPO. Mediul este distribuit în mod omogen în 48 de godeuri (puțuri), cu trei volume diferite. Ulterior, cardul este sigilat ermetic pentru a elimina orice risc de contaminare în timpul manipulării. În etapa finală, interpretarea, validarea și transferul rezultatelor se realizează într-o singură etapă (Figura 2.27).



Figura 2.27 Cartelă cu tub de transfer și fiolă cu mediu de cultură specific

Matricile din care pot fi identificați indicatorii de calitate bacteriologică, precum și timpul necesar diagnosticului de laborator pentru detectarea agenților patogeni alimentari, sunt prezentate în (Tabelul 2.32).

Tabelul 2.32 Matrici din care pot fi identificați indicatorii bacterieni de calitate și timpul necesar pentru diagnosticul de laborator în vederea detectării agenților patogeni de origine alimentară

Germeni bacterieni care pot fi identificați	Matrice	Timpi necesari (ore)
<i>E.coli</i>	Produse din carne, carne separată mecanic, brânzeturi din lapte tratat termic, produse non-lactate.	24
<i>Staph.c.p</i>	Brânzeturi din lapte crud supuse unui tratament termic inferior pasteurizării și lapte tratat termic, lapte praf, produse din pește.	24
Enterobacteriaceae	Bovine, ovine, caprine, cabaline și suine; lapte pasteurizat și produse lactate pasteurizate; lapte praf; înghețată și deserturi lactate; formule pentru sugari și alimente destinate unor scopuri medicale; produse din ouă.	48
NTG	Materie primă – lapte crud; carcase de bovine, ovine, caprine, suine, cabaline și păsări; carne tocată și carne separată mecanic.	48
D+M	Produse de patiserie	72

Unele dintre probele neconforme identificate în cadrul detecției agenților patogeni alimentari (12 tulpini de *Salmonella* spp. și 9 tulpini de *Listeria* spp.) au fost reexamineate prin metodele Vitek 2 Compact și Kaufmann–White, în vederea confirmării rezultatelor inițiale.

Vitek 2 Compact este un sistem automat de confirmare biochimică și a sensibilității la antibiotice, capabil să selecteze izolate de microorganisme patogene și cu potențial patogen ridicat de pe medii solide, prin efectuarea unor teste biochimice într-un timp foarte scurt, ceea ce conduce la reducerea duratei de obținere a rezultatelor (Figura 2.28).

După o perioadă variabilă de timp, echipamentul generează un raport tipărit în care sunt indicate proprietățile biochimice ale genului bacterian identificat, precum și probabilitatea de validare a acestuia.



Figura 2.28 Vitek 2 Compact.

Exemple: *Salmonella spp.* – 5–6 ore; *Listeria monocytogenes* – 6–8 ore; *Campylobacter spp.* – 8–12 ore; *Escherichia coli* – 4–6 ore; *Staphylococcus spp.* – 4–6 ore; drojdii și mucegaiuri – 4–6 ore.

Prin utilizarea acestui sistem se realizează economii de materiale și reactivi. Astfel, cardurile utilizate includ toate tipurile de reactivi necesari pentru identificare și confirmare, fără a necesita materiale din sticlă, sterilizare termică, incubatoare sau alte etape prediagnostice.

Este un dispozitiv ușor de utilizat, cu timp de lucru redus, software intuitiv și conectivitate la sistemul informatic. Metoda este complet automatizată și utilizează carduri de diagnostic diferite pentru identificarea bacteriilor Gram-pozitive (GP), Gram-negative (GN), bacteriilor anaerobe (ANC), campylobacteriilor (NH), corynebacteriilor (CBC), drojdiilor și mucegaiurilor (YST) și bacteriilor din genul *Bacillus* (BCL).

Etapele de lucru sunt următoarele: calibrarea aparatului prin utilizarea kiturilor specifice fiecărei metodologii, inocularea materialului patologic din culturile microbiene purificate anterior în stripurile kitului, determinarea densității optice bacteriene (OD) cu ajutorul unui dispozitiv numit DENSIMAT (densitometru), specific fiecărui gen bacterian, atașarea tubului cu densitatea bacteriană determinată pe cardul specific metodei, introducerea tubului lateral al cardului în tubul de sticlă cu densitate optică stabilă, plasarea cardului în suportul mobil al aparatului, închiderea compartimentului, procesarea datelor de identificare, atribuirea unui cod de probă, selectarea genului bacterian care urmează a fi testat, validarea solicitărilor și pornirea aparatului (Figura 2.29).



Figura 2.29. Etapele principale pentru identificarea germenilor bacterieni utilizând sistemul Vitek 2 Compact

După analiza celor 7761 de probe pentru detectarea agenților patogeni alimentari și a celor 5123 de probe pentru determinarea indicatorilor de calitate prin metode diagnostice alternative rapide, au fost obținute următoarele rezultate: (Tabelele 2.33 și 2.34).

Tabelul 2.33. Rezultate obținute în urma detectării agenților patogeni alimentari prin metode alternative rapide de diagnostic

Parametrii Analizați	Probe Nr.	Rezultate			
		Neconform		Conform	
		Nr.	%	Nr.	%
<i>Salmonella spp.</i>	4257	36	0,85	4221	99,15
<i>Lsteria spp.</i>	2983	21	0,70	2962	99,30
<i>Campylobacter spp.</i>	521	3	0,58	518	99,42
TOTAL	7761	60	0,77	7701	99,23

Interpretarea rezultatelor s-a realizat în conformitate cu prevederile Regulamentului (CE) nr. 2073/2005, care stabilește criteriile microbiologice de siguranță alimentară, definind caracteristicile de proces acceptabile, precum și criteriile microbiologice de siguranță pentru produsele alimentare, indicând un prag peste care un aliment este considerat neconform din punct de vedere al contaminării.

Tabelul 2.34. Rezultatele obținute în urma examinării indicatorilor de calitate prin metode alternative de diagnostic rapid

Parametrii Analizați	Probe Nr.	Rezultate	
		Neconform	Conform

		Nr.	%	Nr.	%
<i>Staphylococ c.p.</i>	855	52	6,08	803	93,93
<i>E. coli</i>	1235	67	5,43	1168	94,57
<i>Enterobacteriaceae</i>	943	79	8,38	864	91,62
NTG	1520	131	8,62	1389	91,38
D + M	570	41	7,19	529	92,81
TOTAL	5123	370	7,22	4753	92,78

S-a constatat că majoritatea neconformităților au fost înregistrate în cazul numărului total de germeni (8,62%), *Enterobacteriaceae* (8,38%) și drojdii + mucegaiuri (7,19%), iar cele mai puține în cazul *Campylobacter spp.* (0,58%), *Listeria spp.* (0,70%) și *Salmonella spp.* (0,85%).

Cele 60 de probe cu rezultate neconforme obținute prin teste alternative rapide pentru agenți patogeni alimentari au fost reexamineate prin metode standardizate de referință, în conformitate cu prevederile Regulamentului (CE) nr. 2073/2005. S-a constatat o corelație de 100% a rezultatelor obținute, așa cum se poate analiza în Tabelul 2.35.

Tabelul 2.35. Corelarea rezultatelor obținute prin metode de referință și metode alternative

Parametrii Analizați	Probe neconforme		Corelație
	Metode alternative	Metode de referință	%
<i>Salmonella spp.</i>	36	36	100
<i>Listeria spp.</i>	21	21	100
<i>Campylobacter spp.</i>	3	3	100
TOTAL	60	60	100

Cele 370 de probe cu rezultate neconforme obținute prin teste alternative rapide pentru indicatorii de calitate au fost analizate prin metode standardizate de referință, fiind obținută o corelație de 98,38%, după cum urmează: (Tabelul 2.36).

Tabelul 2.36. Conformitatea rezultatelor obținute prin metodele de referință

Parametrii Analizați	Probe neconforme		Corelație
	Metode alternative	Metode de referință	%
<i>Staphylococ c.p.</i>	52	52	100
<i>E. coli.</i>	67	67	100
<i>Enterobacteriaceae</i>	79	79	100
NTG	131	126	96,18
D+M	41	40	97,56
TOTAL	370	364	98,38

Aceasta înseamnă că metoda Mini Vidas utilizată pentru detectarea agenților patogeni alimentari generează rezultate echivalente (100%) cu cele obținute prin metodele de referință, iar metoda TEMPO, utilizată pentru determinarea indicatorilor de calitate, prezintă un grad de corelație de 98,38% față de metodele standardizate.

În ceea ce privește identificarea bacteriană cu ajutorul echipamentului Vitek 2 Compact, cele 12 probe de *Salmonella* spp. și cele 9 probe de *Listeria* spp. au fost analizate și prin metoda Kaufmann–White.

Pentru ambele genuri s-a constatat o corelație de 91,68%, existând diferențe semnificative între speciile de *Salmonella* și *Listeria*. Astfel, pentru genul *Salmonella*, corelația rezultatelor a fost de 77,8%, iar în cazul genului *Listeria*, corelația rezultatelor a fost de 100%, după cum urmează: (Tabelul 2.37).

Tabelul 2.37 Serotipuri identificate ale *Salmonella enterica* și *Listeria* spp.

Microorganisme	Specii/ serotip	Metoda Vitek 2 Compact	Metoda Kaufmann–White	Procent de corespondență (%)
<i>Salmonella</i> <i>enterica</i>	<i>enteritidis</i>	3	2	66.7
	<i>taksony</i>	1	1	100
	<i>infantis</i>	3	4	66.7
	<i>newport</i>	3	3	100
	<i>saintpaul</i>	2	2	100
<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	3	3	100
	<i>L. ivanovii</i>	3	3	100
	<i>L. innocua</i>	3	3	100

Neconcordanțele rezultatelor obținute prin utilizarea metodelor Vitek 2 Compact și Kaufmann–White au fost identificate în cazul speciilor *Salmonella enteritidis* și *Salmonella infantis*. În cazul speciei *Listeria monocytogenes*, corelația rezultatelor a fost de 100%.

În urma utilizării metodelor diagnostice alternative rapide pentru examinarea probelor alimentare prelevate din unități de procesare, s-a constatat că majoritatea neconformităților au fost înregistrate în cazul testării indicatorilor de calitate și într-o proporție semnificativ mai redusă în cazul testării agenților patogeni alimentari.

Rezultatele obținute au stat la baza măsurilor corective implementate în unitățile de procesare, precum și a sancțiunilor aplicate loturilor de proveniență, după confirmarea sau infirmarea acestora prin metode standardizate de referință, în conformitate cu prevederile Regulamentului (CE) nr. 2073/2005.

Metodele diagnostice alternative rapide utilizate pentru detectarea agenților patogeni alimentari au generat rezultate echivalente cu cele ale metodelor standardizate de referință. În cazul metodelor rapide pentru determinarea indicatorilor de calitate, rezultatele au prezentat un grad de corelație de 98,38% față de metodele de referință.

1.2.2.2 Utilizarea tehnicilor modene de analiza a expunerii produselor din carne la prezența hidrocarburilor policiclice aromatate

<https://agmv.ro/wp-content/uploads/2019/10/EVALUAREA-EXPUNERII-C%C4%82RNII.pdf>

Hidrocarburile Aromatice Policiclice (HAP) reprezintă o clasă de compuși organici care conțin două sau mai multe nuclee aromatice condensate (fuzionate). Acestea includ numeroase substanțe cu potențial cancerigen și genotoxic, dintre care cele mai importante sunt: Benzo(a)pyrene, Benzo(a)anthracene, Benzo(b)fluoranthene, Benzo(i)perylene, Chrysene, Cyclopenta(c,d)pyrene, Dibenzo(a,h)anthracene, Dibenzo(a,e)pyrene, Dibenzo(a,h)pyrene, Dibenzo(a,l)pyrene, Indeno(1,2,3-cd)pyrene, 5-Methylchrysene (*Olabemiwo, 2013*).

Hidrocarburile Aromatice Policiclice (HAP) prezintă un potențial carcinogen pronunțat, descris în literatura științifică de peste 200 de ani. În anul 1775, fizicianul englez Percivall Pott a evidențiat pentru prima dată existența unei corelații între incidența cancerului de scrot la hornari și contactul continuu cu cenușa bogată în HAP (*Dogaru, 2014*).

Formarea HAP în alimente depinde de metodele de procesare termică, fiind influențată de compoziția chimică a produsului, modul de ambalare și structura stratului de acoperire. În acest context, trebuie menționat faptul că majoritatea proceselor de preparare termică a alimentelor se desfășoară la temperaturi cuprinse între 370°C și 390°C, dar și la temperaturi mai ridicate, de 400–600°C, cum este cazul prăjirii în grăsimi. La temperaturi cuprinse între 400°C și 1000°C, conținutul de Hidrocarburi Aromatice Policiclice (HAP) crește liniar, iar fenolii și acizii grași ating concentrații maxime la aproximativ 600°C. Temperatura de afumare, situată între 20°C și 55°C, nu influențează semnificativ producerea HAP, însă temperatura de 40°C permite obținerea unor proprietăți organoleptice superioare comparativ cu cele de 20°C sau 55°C (*Grimmer, 1983; Guillen și colab., 1997*).

În carnea preparată prin frigere (grătar cu cărbuni, prăjire), HAP se formează în timpul procesului de combustie incompletă sau prin piroliza grăsimilor, atunci când sunt eliberate oxigen și carbon, conducând la formarea compușilor policiclici. Acești compuși sunt transportați de fumul rezultat și se depun pe suprafața cărnii. Concentrația HAP în carnea preparată la o distanță mai mare față de sursa de căldură este mai redusă decât în cazul cărnii aflate în apropierea cărbunilor. Pentru reducerea cantităților de HAP, carnea preparată la grătar nu trebuie să intre în contact direct cu flacăra, procesul termic trebuie realizat lent, iar conținutul de grăsime trebuie să fie cât mai redus (*Food Standards Agency, 2005; IARC, 1973*). Un alt proces generator de HAP este afumarea, metodă utilizată pentru conservarea alimentelor, asociată cu o incidență crescută a cancerului faringian observată la pescarii islandezi, mari consumatori de pește afumat, chiar și în condițiile în care aceste substanțe au fost detectate în concentrații reduse. Acumularea HAP în alimentele afumate depinde de metoda de afumare, natura combustibilului utilizat, temperatura și durata procesului. Calitatea lemnului are un rol important, astfel încât piroliza lemnului de esență tare generează fum cu un conținut mai redus de HAP comparativ cu lemnul de esență moale, bogat în rășini (*Stall și colab., 1998; Tao și colab., 2006*).

Anual, Autoritatea Națională Sanitară Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (ANSVSA) stabilește un plan de prelevare a probelor pentru produse alimentare de origine animală și non-animală, în vederea monitorizării benzo(a)pirenelui din alimente, utilizând metode de screening

și confirmare, pentru prevenirea riscurilor asociate consumului de carne și produse din carne afumate (ANSVSA, 2016).

Prelevarea probelor de carne și produse din carne afumate are drept scop menținerea contaminanților la niveluri acceptabile, în limitele admise, prin aplicarea și respectarea bunelor practici de fabricație. În cazul HAP, protecția eficientă a sănătății consumatorului este asigurată prin eliminarea din consum a produselor neconforme sau a utilizării acestora ca ingrediente în alte produse alimentare.

Scopul acestui studiu a fost investigarea nivelurilor de Benzo(a)pyrene și PAH4 în diverse probe de carne și produse din carne afumate, utilizând metoda de High Performance Liquid Chromatography (HPLC), în 25 de județe din România și în municipiul București.

a) Probe alimentare și metoda de prelevare

Au fost analizate 206 probe (Tabelul 2.39) de carne și produse din carne afumate provenite din 25 de județe și din municipiul București, pentru detectarea HAP. Toate probele au fost prelevate în cadrul programelor oficiale de control și autocontrol (ANSVSA, 2016).

Tabelul 2.39. Județele de origine ale probelor alimentare

Nr. crt	Oraș	Probe
1.	Alba	3
2.	Arad	3
3.	Argeș	12
4.	Botoșani	2
5.	Brașov	12
6.	Brăila	1
7.	Caraș Severin	1
8.	Covasna	20
9.	Cluj	14
10.	Dâmbovița	2
11.	Dolj	2
12.	Harghita	3
13.	Ilfov	10
14.	Maramureș	17
15.	Mureș	3
16.	Neamț	2
17.	Olt	8
18.	Prahova	7
19.	Satu Mare	9
20.	Sibiu	9
21.	Suceava	6

22.	Timiș	2
23.	Tulcea	9
24.	Vaslui	3
25	Vrancea	22
26.	București	24

Prelevarea probelor a fost realizată în conformitate cu prevederile Regulation (EC) No 333/2007 (*European Commission, 2006*). Proba globală a avut o masă de aproximativ 1 kg, cu excepția situațiilor în care acest lucru nu a fost posibil, de exemplu atunci când proba era constituită dintr-un singur ambalaj sau dintr-o unitate individuală.

b) Cromatografia lichidă de înaltă performanță (HPLC)

Metodele de analiză utilizate pentru controlul oficial al nivelurilor de Pb, Cd, Hg, 3-MCPD și HAP din produsele alimentare au fost efectuate în conformitate cu prevederile Regulation (EC) No 333/2007 (*European Commission, 2006*).

Metoda constă în extragerea hidrocarburilor aromatice policiclice (HAP) cu un amestec de acetonitril/acetona, urmată de două etape de purificare: pe cartușe cu fază inversă C18 și pe cartușe cu florisil. După separare, analiza se realizează prin cromatografie lichidă, iar detecția se face prin fluorescență, la diferite lungimi de undă de excitație și emisie, conform metodei de lucru standardizate și optimizate.

Tabelul 2.36. Program de detecție

Componente	Timp (min)	Lungimea de undă de stimulare (nm)	Lungimea de undă de emisie (nm)
Benzo (a)anthracene	12.5	270	385
Chrysene	14.0		
Be nzo (b)fluoranthene	21.8	256	446
Benzo (a)pyrene	31.2	292	410
Dibenzo(a,h) anthracene	44.1		

c) Metodologia analitică (HPLC pentru determinarea HAP)

După cântărirea exactă a unei probe de 2 g, procesul analitic a fost realizat în 5 etape (0–4), urmate de determinarea propriu-zisă (optimizarea aparatului, calibrarea curbei de etalonare, citirea, calculul și exprimarea rezultatelor).

Citirea probelor. După inițializarea sistemului, probele au fost injectate conform programului de citire. Fiecare probă a generat o cromatogramă și un raport de analiză, care a indicat concentrațiile compușilor la timpii de retenție specifici HAP analizați. De asemenea, a fost

analizată o probă îmbogățită la nivelul maxim admis conform legislației (*European Commission, 2006*).

Calcul și interpretare. Rezultatele obținute în urma analizelor de laborator ale cărnii și ale produselor din carne afumată sunt prezentate în Tabelul 2.37.

Tabelul 2.37. Rezultatele obținute în urma analizei probelor de carne afumată și ale produselor din carne afumată

Nr.	Matrice	Probe	Benzo(a)piren μg/kg	Valori	
				Randament de recuperare benzo(a)piren %	AH4 μg
1.	Bacon afumat: tradițional, congelat	4	Nedetectabil*	-	0,72 ± 0,31 – 2,43 ± 1,01
2.	Cârnați afumați: tradiționali, țărănești, roșii, din oaie și vițel, Pleșcoi, semi-afumați extra, pentru grill, pentru grătar, șuncă afumată, bacon, usturoi, de Crăciun, „Carniprod”, „Städler”, „Bătrânu Sas”, „Tătaran”, „Baron”, „Montbeliard”, „Dulvanely”, „Deak”, „Hajdu”	56	Nedetectabil* / Necuantificabil* * – 2,5 ± 1,00	57,1 – 107,4	0,56 ± 0,23 – 11,08 ± 4,60
3.	Ceafă de porc afumată	5	Nedetectabil* – 0,75 ± 0,30	73,6	0,45 ± 0,19 – 8,16 ± 3,39
4.	Șuncă de porc afumată, făcută în casă, cu os, haldbrand	4	Nedetectabil*	73,6	0,70 ± 0,29 – 2,31 ± 0,86
5.	Cârnați de porc afumați: din Cristur, cu piept de pui	2	Nedetectabil* – 0,81 ± 0,32	73,6	3,43 ± 1,62
6.	Coaste de porc afumate	9	Nedetectabil*	85,8	0,57 ± 0,24 – 7,00 ± 2,91
7.	Coaste afumate	2	Nedetectabil* – 0,51 ± 0,32	73,6	3,57 ± 1,40 – 6,85 ± 2,81
8.	Cotlet de porc afumat	4	Nedetectabil* – 0,87 ± 0,35	107,4	5,8932
9.	Jumări de porc	1	1,67 ± 0,67	107,4	11,92 ± 4,95
10.	Ceafă de porc cu ardei iute	1	Nedetectabil*	-	2,75 ± 2
11.	Șuncă de porc cu piept de curcan	3	Nedetectabil* – 1,049 ± 0,349	70,7	0,25 ± 0,10 – 11,23 ± 4,66
12.	Kaiser afumat: piept de porc extra	9	Nedetectabil* – 2,581 ± 0,848	70,7	0,47 ± 0,20 – 10,92
13.	Mușchi de porc afumat	1	Nedetectabil*	-	1,76 ± 0,73
14.	File de porc afumat („Văzuga”, „Vilia” Delikatesa)	16	Necuantificabil* * – 0,97 ± 0,39	67,1 – 107,2	0,73 ± 0,30 – 13,8 ± 5,73
15.	Șuncă de porc afumată	1	Necuantificabil* *	-	1,8859
16.	Pancetta afumată	1	Nedetectabil*	-	1,62 ± 0,67

17.	Pastramă afumată: oaie, porc, Aurora, piept de curcan	17	Nedetectabil* – 3,00 ± 1,20	85,8 – 104,4	0,107 ± 0,04 – 15,65 ± 6,55
18.	Picioare de porc afumate	1	Nedetectabil	-	Nedetectabil
19.	Piept de porc afumat „vânătoresc”	5	Necuantificabil* * – 0,52 ± 0,33	67,1	3,79 ± 1,57 – 7,26 ± 3,01
20.	Pulpa afumată: porc transilvănean	3	Nedetectabil* – 1,22 ± 0,49	70,7 – 95,2	0,90 ± 0,37 – 5,43 ± 2,26
21.	Salam afumat	27	Nedetectabil* / Necuantificabil* *	69,1 – 107,4	Nedetectabil – 0,48 ± 0,20 – 6,37 ± 2,65
22.	Bacon afumat	3	Necuantificabil* *	67,1 – 107,4	0,48 ± 0,20 – 1,7369
23.	Umăr de porc Bega	1	Nedetectabil	-	1,4966 ± 0,6211
24.	File de porc specialitate	1	Nedetectabil	-	1,34 ± 0,56
25.	Șuncă afumată „Pădurea Neagră”	19	Nedetectabil* – 0,84 ± 0,34	85,8 – 99,1	2,31 ± 0,96 – 18,01 ± 7,48
26.	Bacon afumat: tradițional transilvănean	5	Nedetectabil* / Necuantificabil* *	-	0,81 ± 0,34 – 6,58 ± 2,73
TOTAL		206			

*Nedetectabil < LOD (limita de detecție, cea mai mică concentrație măsurată, de la care se poate deduce prezența analitului cu o certitudine statistică rezonabilă).

**Necuantificabil < LOQ (limita de cuantificare, cea mai mică concentrație a analitului care poate fi determinată/măsurată cu o certitudine statistică rezonabilă).

În cazul Benzo(a)pyrene, valoarea maximă înregistrată a fost de 3,00 ± 1,2 µg/kg pentru pastramă afumată, 2,584 ± 0,8448 µg/kg pentru piept de porc afumat și 2,5 ± 1,00 µg/kg pentru cârnați afumați, în condițiile în care valoarea maximă admisă este de 2,0 µg/kg. De asemenea, valori apropiate de limita maximă admisă au fost observate în piept de porc afumat (2,584 ± 0,8448 µg/kg) și mușchi de porc afumat (1,22 ± 0,49 µg/kg). Pentru fracțiunea PAH4, valoarea maximă a fost de 18,01 ± 7,48 µg/kg în șuncă afumată, 15,65 ± 6,5 µg/kg în pastramă afumată și 13,8 ± 5,73 µg/kg în mușchi de porc afumat, toate depășind limita maxim admisă de 12,0 µg/kg. Valori apropiate de limita admisă au fost identificate și în alte produse:

- pigtail afumat (11,92 ± 4,95 µg/kg)
- șuncă afumată (11,23 ± 4,66 µg/kg)
- cârnați afumați (11,08 ± 4,60 µg/kg)
- kaizer afumat (10,92 µg/kg)
- cap de porc afumat (8,16 ± 3,39 µg/kg)

Pentru alte produse alimentare, valorile au fost mai reduse atât pentru Benzo(a)pyrene, cât și pentru PAH4. Cele mai mici concentrații au fost observate în produse precum leber afumat, oase afumate, bacon afumat, cârnați afumați, pulpe afumate, spate de porc și diverse sortimente de salam afumat. Deși aceste valori se încadrează în limitele admise, ele necesită monitorizare și control continuu. Stabilirea unor limite maxime pentru Benzo[a]pyrene în

alimentele susceptibile la contaminare prin afumare este esențială pentru protecția sănătății publice.

Mai multe studii au raportat variații ale concentrațiilor de HAP în funcție de metoda de preparare (grătar pe cărbuni, gaz, cuptor). De exemplu, Farhadian și colaboratorii (2010) au identificat fluoranthen în toate probele analizate, cu valori totale maxime de 132 ng/g în beef satay și minime de 3,51 ng/g în pui preparat la cuptor.

În produsele tradițional afumate, nivelurile de HAP sunt în general mai scăzute, de exemplu:

- bacon afumat: 32,46 µg/kg benzo(a)piren
- cârnați afumați: 15,49 µg/kg benzo(a)piren

Totuși, unele studii arată că produsele afumate tradițional pot avea valori de până la două ori mai mici decât produsele afumate industrial, în funcție de tehnologia utilizată.

În cazul Benzo(a)pyrene, valoarea maximă a fost înregistrată în pastramă afumată, piept de porc afumat și cârnați afumați. Valori apropiate de limita maximă admisă au fost observate în kaizer afumat, piept de porc afumat și pulpă afumată. În cazul fracțiunii PAH₄, valoarea maximă a fost determinată în șuncă afumată, pastramă afumată și mușchiuleț afumat. De asemenea, valori apropiate de limita admisă au fost identificate în pigtail afumat, șuncă afumată, cârnați afumați, kaizer afumat și ceafă de porc afumată. Valorile obținute pentru celelalte produse alimentare au fost mai scăzute pentru ambii parametri analizați. Astfel, pentru Benzo[a]pyrene, cele mai mici concentrații au fost determinate în leber afumat, oase afumate, bacon afumat, cârnați afumați, pulpe afumate, spate de porc, file de porc afumat și anumite sortimente de salam afumat. Chiar dacă valorile obținute se încadrează în limitele de admisibilitate, produsele din carne și preparatele din carne afumată trebuie monitorizate prin analize de laborator, deoarece procesele de afumare pot conduce la niveluri ridicate de contaminare cu hidrocarburi aromatice policiclice, compuși cu potențial carcinogen recunoscut.

1.2.2.3 Utilizarea diferitelor metode de analiză cantitativă și calitativă la produsele din pește gătite prin diferite tehnici

<https://www.mdpi.com/2076-3417/15/8/4417>

Nutriția reprezintă o problemă esențială pentru sustenabilitatea umanității. În contextul schimbărilor sociale și economice recente, survenite în urma pandemiei de SARS-CoV-2, furnizorii de servicii alimentare, inclusiv barurile și restaurantele, și-au diversificat și intensificat serviciile de catering și au extins gama de produse de calitate care răspund nevoilor consumatorilor (*Malinowska și colab., 2022; Brănescu și colab., 2023; Chou și colab., 2024*).

În mod tradițional, în industria ospitalității, în special în gastronomia de tip fine dining, criteriile de gust și cele estetice, precum aspectul exterior și interior al produsului final sau armonia cromatică și intensitatea obținute prin utilizarea unor tehnici sau stiluri specifice de plating, au avut prioritate în raport cu alți indicatori de calitate (*Malinowska și colab., 2022*). Pe lângă alți factori precum prețul, accesibilitatea sau aspectele de siguranță, alegerea consumatorilor pentru astfel de servicii depinde și de tipul preparatelor și de varietatea acestora. De la legume

la carne și pește, există numeroase tipuri de alimente cu valori nutriționale diferite; cu toate acestea, carnea și produsele din carne joacă un rol esențial într-o dietă echilibrată.

În sistemele de catering, istoricul temperaturii și al timpului în timpul preparării și distribuției, adică în sisteme precum cook–chill, cook–freeze sau menținerea la cald (warm-holding), necesită o atenție deosebită în raport cu anumiți nutrienți sensibili, de exemplu vitaminele C și B1 și acidul folic. Dacă sunt luați în considerare principalii parametri și factorii de influență menționați, nu ar trebui să fie dificilă producerea de alimente cu o calitate nutrițională ridicată în cadrul serviciilor de catering.

Pentru a răspunde nevoilor consumatorilor, companiile de catering trebuie să își diversifice tehnicile de procesare a materiilor prime. Procesarea alimentelor este, de regulă, corelată cu modificări ale formei, proprietăților senzoriale și capacității de conservare, diferite tipuri de tratamente termice sau aplicarea unor sisteme moderne de producție în catering modificând structura moleculară, asigurând proprietăți fizico-chimice distincte ale produselor finite și prevenind pierderile de nutrienți (*Scanlon și colab., 2012*). În general, producția în catering implică sisteme de producție care includ gătirea tradițională, respectiv cook–serve (CS), cook–chill (CC) și cook–freeze (CF). Pentru a păstra calitățile nutriționale și senzoriale ale produselor, asigurând în același timp siguranța alimentară, tehnologia sous vide este frecvent utilizată în preparatele culinare (*Misu și colab., 2024*), inclusiv în cazul produselor din pește (*Ahmed și colab., 2020*).

Dincolo de valoarea nutrițională a materiilor prime, pentru industria de catering este important să existe o imagine clară asupra avantajelor nutriționale aduse de diferitele sisteme de producție și tratamente termice. Studiul de față își propune să realizeze caracterizarea produselor de catering pe bază de pește, preparate prin utilizarea unor tehnici diferite (gătire sous vide—cook–serve, gătire convectivă—cook–serve, gătire la microunde—cook–serve, gătire convectivă—cook–chill și gătire convectivă—cook–freeze), din punct de vedere nutrițional/biochimic, precum și din perspectivă senzorială, în contextul asigurării siguranței microbiologice. Pentru a stabili avantajele acestor tehnici, au fost analizate pierderile de procesare, retenția vitaminelor și valorile macronutrienților, corelate cu inocuitatea produsului final și profilul său senzorial.

a) Produsele de pește selectate și tratamentele culinare aplicate

Studiul a vizat cinci produse de catering derivate dintr-un preparat pe bază de pește, fiecare obținut printr-o tehnică de gătire diferită. Diferențierea a constat atât în tratamentul termic, în cadrul căruia au fost analizate comportamentul produselor și transformările asociate coacerii convective (metodă tradițională) și coacerii la microunde (metodă neconvențională), cât și în utilizarea unor sisteme diferite de producție în catering. Comportamentul produselor a fost evaluat comparativ prin aplicarea nu doar a sistemului clasic cook–serve, ci și a sistemelor cook–chill și cook–freeze.

Materiile prime au fost achiziționate în stare refrigerată (2–4 °C), respectând parametrii stabiliți ai lanțului frigorific și specificațiile tehnice ale companiei.

b) Conceptul experimental și eșantionarea

Produsul culinar testat a fost supus ulterior la cinci metode diferite de gătire, așa cum sunt prezentate în Tabelul 2.38, și anume: gătire sous vide—cook—serve, gătire convectivă—cook—serve, gătire la microunde—cook—serve, gătire convectivă—cook—chill și gătire convectivă—cook—freeze.

Tabelul 2.38. Codurile probelor și metodele de gătire aplicate

Tratament aplicat	Cod probă	Descrierea metodei de gătire
Niciun tratament	A0	Fără tratament termic aplicat; proba a fost analizată în stare crudă.
Gătire sous vide — cook—serve (SV-CS)	A1	Produsul a fost introdus într-un ambalaj (Saporoso, Brașov, România), apoi vidat (SAM Cook, Milanówek, Polonia) și gătit la 55 °C timp de 40 min într-un aparat sous vide (Hendi, Ghimbav, România).
Gătire convectivă — cook—serve (CC-CS)	A2	În acest sistem de tip cook—serve, s-a utilizat coacerea convectivă (fără abur) într-un cuptor electric (Rational, Luton, Marea Britanie). Produsul a fost copt la 170 °C timp de 25 min.
Gătire la microunde — cook—serve (Mw-CS)	A3	Produsul a fost gătit într-un cuptor cu microunde (Galanz, Foshan, China), la o putere de 567 W timp de 15 min.
Gătire convectivă — cook—chill (CC-CC)	A4	În acest sistem cook—chill, s-a utilizat coacerea convectivă (fără abur) într-un cuptor electric (Rational, Marea Britanie). Produsul a fost copt la 180 °C timp de 25 min, apoi răcit controlat în două etape: până la 20 °C în 60 min și ulterior până la 4 °C în încă 60 min, utilizând un răcitor rapid cu aer forțat (Afinox, Campo San Martino, Italia).
Gătire convectivă — cook—freeze (CC-CF)	A5	În acest sistem cook—freeze, s-a utilizat coacerea convectivă (fără abur) într-un cuptor electric (Rational, Marea Britanie). Produsul a fost copt la 180 °C timp de 25 min, apoi răcit și congelat controlat în trei etape: până la 20 °C în 60 min, până la 4 °C în 60 min, și până la -18 °C în 60 min, utilizând un răcitor rapid cu aer forțat (Afinox, Campo San Martino, Italia).

Prepararea probelor

Pentru a limita transformările fizice, chimice și microbiologice care ar putea genera pierderi de nutrienți, produsele de catering au fost răcite imediat la o temperatură de +4 °C după regenerarea termică (care coincide, de fapt, cu momentul consumului acestora). Prelevarea probelor a fost realizată cu atenție, eliminând posibilitatea contaminării, iar eșantioanele au fost transportate la laborator în condiții sigure și controlate. Temperatura pe durata transportului probelor a fost menținută la +4 °C.

Înainte de a fi supuse analizelor privind conținutul de nutrienți, produsele finale au fost omogenizate în laborator utilizând un blender VO4006 (Vortex, Cesano Maderno, Italia).

c) Analize fizico-chimice

Pentru realizarea analizei biochimice, probele au fost prelevate din omogenatele corespunzătoare fiecărei metode de gătire. Au fost determinați următorii indicatori: conținutul de substanță uscată, nutrienții majori (glucide, proteine și lipide), conținutul total de azot, azot neproteic, proteine brute degradate cu pepsină în acid clorhidric, conținutul de acizi grași, precum și vitamine hidrosolubile (tiamină, riboflavină și niacină) și liposolubile (retinol, tocoferol și F).

Substanța uscată a fost determinată prin uscare în etuvă sub vid la 102 ± 2 °C, conform ISO 1442:2023 (*International Organization for Standardization, 2023*). Rezultatele sunt exprimate în DM% sau DM (g/100 g produs analizat).

Conținutul de glucide a fost determinat conform specificațiilor AOAC 923.09 (AOAC, 1923). O soluție alcalină de sare cuprică este redusă sub acțiunea căldurii de către zaharurile reducătoare din probă. Excesul de sulfat de cupru este tratat cu iodură de potasiu în mediu acid, iar iodul eliberat este titrat cu soluție de tiosulfat de sodiu. Rezultatul este exprimat în zaharuri reducătoare (%).

Conținutul de lipide a fost determinat prin metoda extracției cu eter și acid clorhidric, conform SR ISO 1443:2008 (*International Organization for Standardization, 2008*). Substanțele proteice și glucidele din probă sunt hidrolizate cu acid clorhidric fierbinte, fracția insolubilă este separată prin filtrare, iar grăsimile sunt extrase cu alcool etilic într-o instalație Soxhlet.

Pentru determinarea conținutului proteic ($P = 6,25(NT - NPN)$), a fost utilizată metoda Kjeldahl, prin evaluarea azotului total (NT) (conform ISO 5983-1:2005 (*International Organization for Standardization, 2005*)).

Conținutul de acizi grași a fost determinat prin cromatografie gazoasă, pe baza separării esterilor metilici ai acizilor grași (conform ISO 12966-4:2015 (*International Organization for Standardization, 2015*)), utilizând un cromatograf gazos Shimadzu GC-17A echipat cu coloană capilară Chrompack de 25 m lungime și 0,25 mm diametru.

Pentru determinarea vitaminei B1, probele au fost tratate termic cu acid sulfuric diluat și supuse hidrolizei enzimatic.

Pentru vitamina B2, extracția a fost realizată prin hidroliză acidă, tratament enzimatic și extracție în acetonă. Cuantificarea se bazează pe detecție spectrofluorimetrică (Cary-50 UV-VIS), conform AOAC 981.15 și AACC 86-70, utilizând fluorescența naturală a riboflavinei (excitație 450 nm, emisie 510 nm).

Determinarea vitaminei B3 s-a realizat prin detecție spectrofluorimetrică (Cary-50 UV-VIS), după extracție inițială în soluție 1:1 acid sulfuric/apă (autoclavare la 121 °C timp de 45 min). Metoda se bazează pe AOAC 975.41 și AACC 86-50A.

Pentru determinarea retinolului, a fost utilizată o metodă RP-HPLC cu detector UV ($\lambda = 325$ nm). Metoda, adaptată din Regulamentul Comisiei Europene 152/2009 (*European Commission, 2009*), se bazează pe extracția vitaminei A în eter de petrol din proba hidrolizată cu soluție alcoolică de hidroxid de potasiu.

Alfa-tocoferolul a fost analizat utilizând un cromatograf lichid Shimadzu seria VP, echipat cu detector de fluorescență FR-10 AXL (Shimadzu, Kyoto, Japonia), pe baza unei metode adaptate din Regulamentul Comisiei Europene 152/2009.

d) Analize microbiologice

Evaluarea calității microbiologice a fost realizată pentru a analiza influența tipului de tratament termic aplicat (sous vide, convecție și microunde) asupra principalilor indicatori. Probele preparate în sistemele de producție cook–chill și cook–freeze au fost monitorizate pe parcursul perioadei minime de valabilitate. În cazul produselor cook–chill, probele au fost prelevate zilnic, pe o perioadă de 5 zile, iar în cazul produselor cook–freeze, la fiecare 10 zile, pe o durată de 50 de zile.

Tabelul 2.39. Indicatori microbiologici

Analize microbiologice	Metode de analiză
Evaluare cantitativă a calității microbiologice	
1. Numărul total de microorganisme aerobe / număr total pe placă (APC)	Metodă clasică, conform ISO 4833:2013
2. Număr total de drojdii și mucegaiuri (TYMC)	Metodă clasică, conform ISO 21527-1:2008
3. Număr total de coliformi	Metodă clasică, conform ISO 4831:200
Evaluare cantitativă a bacteriilor patogene	
4. Număr de <i>Staphylococcus aureus</i>	Metodă rapidă TEMPO (BioMérieux Industry, Franța)
5. Număr de <i>Bacillus cereus</i>	Metodă rapidă TEMPO (BioMérieux Industry, Franța)
6. Număr de <i>Escherichia coli</i>	Metodă rapidă TEMPO (BioMérieux Industry, Franța)
Evaluare calitativă (prezență/absență) a bacteriilor patogene	
7. Detectarea <i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2017
8. Detectarea <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1:2017
Determinările cantitative au fost realizate cu sistemul VITEK 2 Compact (BioMérieux, Craponne, Franța); evaluarea calitativă a fost realizată cu kitul rapid Vidas Next Day (BioMérieux, Craponne, Franța).	

e) Analiza senzorială

Caracteristicile senzoriale ale preparatelor din pește au fost evaluate de un panel format din 30 de evaluatori (60% femei și 40% bărbați, cu vârste cuprinse între 20 și 61 de ani), care au urmat o pregătire profesională în domeniul gastronomiei. Panelul a evaluat atributele de aspect exterior, aspect interior, consistență, miros, gust și acceptabilitate generală, utilizând o scală hedonică liniară de 9 puncte (Chan și colab., 2023).

f) Analiza statistică

Toate experimentele au fost realizate în triplicat, iar rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviație standard (SD). Analiza varianței (ANOVA) și testul Tukey ($p \leq 0,05$) au fost utilizate pentru evaluarea diferențelor în analizele fizico-chimice și microbiologice. Pentru analiza statistică a fost utilizat software-ul JASP Team (2025), versiunea 0.19.3 (Jasp, 2024).

g) Evaluarea conținutului de nutrienți al preparatelor din pește analizate

Procesarea termică a alimentelor poate influența conținutul de macronutrienți, calitatea unor micronutrienți, precum și conținutul de minerale din compoziția acestora. Gătirea și coacerea pot distruge o parte dintre nutrienții valoroși din alimente, cum ar fi acizii grași polinesaturați

(PUFA), proteinele și vitaminele (*Raza și colab., 2025*) Tabelul 2.40 oferă o prezentare generală a conținutului de nutrienți al preparatelor din pește.

h) Evaluarea pierderilor de procesare ale produselor analizate

Pierderile alimentare și risipa, inclusiv pierderile la gătire, reprezintă factori esențiali care influențează sectorul de catering, deoarece pot genera pierderi financiare, în funcție de procesul de gătire ales (*Ellison și colab., 2019*). Pierderea la gătire prezintă un interes deosebit în industria de catering datorită modificărilor de formă, culoare și textură ale produsului (*Lassen și colab., 2002; Roldan și colab., 2013*). Pierderile la gătire se calculează pe baza greutateii probei de pește înainte și după tratamentul termic, deoarece apa este eliminată din produs sub formă de vapori și lichid (*Angel-Rendon și colab., 2020*).

În cazul sistemului de producție cook-serve, cele mai mari pierderi cantitative au fost înregistrate pentru proba A2 (coacere la microunde, $28,55 \pm 1,23\%$) și proba A3 (coacere convectivă, $30,91 \pm 2,01\%$), rezultate care nu sunt semnificativ diferite ($p > 0,05$). Cea mai mică rată a pierderilor la gătire a fost observată în sistemul sous vide ($14,25 \pm 1,57\%$), fiind reprezentată de lichidul extras din produs prin efectul vidului creat în ambalajul special. Acest rezultat a fost semnificativ diferit față de toate celelalte probe ($p < 0,05$).

Tabelul 2.40. Pierderi la gătire și conținutul de macronutrienți și vitamine

	A0	A1	A2	A3	A4	A5
Pierdere de conținut (%)	-	$14,25 \pm 1,57^a$	$30,91 \pm 2,01^b$	$28,55 \pm 1,23^b$	$35,68 \pm 2,32^c$	$40,25 \pm 1,57^d$
Substanță uscată (%)	$30,98 \pm 0,02^a$	$31,84 \pm 0,04^a$	$31,84 \pm 0,04^a$	$31,40 \pm 0,08^a$	$31,40 \pm 0,08^a$	$33,86 \pm 0,04^b$
Proteine (%)	$14,32 \pm 0,02^a$	$15,22 \pm 0,09^a$	$16,66 \pm 0,12^b$	$15,90 \pm 0,16^a$	$16,93 \pm 0,21^c$	$17,36 \pm 0,03^c$
Proteine insolubile (%)	$4,37 \pm 0,01^a$	$1,53 \pm 0,05^b$	$1,53 \pm 0,05^b$	$1,78 \pm 0,02^c$	$2,15 \pm 0,04^c$	$1,58 \pm 0,02^b$
Digestibilitate (%)	$69,51^a$	$89,91$	$89,91 \pm 0,03^c$	$89,31 \pm 0,20^c$	$86,48 \pm 0,11^b$	$90,67 \pm 0,21^c$
Carbohidrați (%)	$0,73 \pm 0,02^a$	$1,10 \pm 0,04^b$	$1,05 \pm 0,04^b$	$1,93 \pm 0,05^c$	$1,23 \pm 0,05^b$	$1,23 \pm 0,05^b$
Lipide (%)	$15,01 \pm 0,09^a$	$14,20 \pm 0,08^b$	$13,64 \pm 0,06^c$	$13,93 \pm 0,05^c$	$14,71 \pm 0,09^b$	$14,81 \pm 0,01^b$
Vitamine hidrosolubile						
Tiamină (mg)	$0,0478 \pm 0,01^a$	$0,0347 \pm 0,01^b$	$0,0256 \pm 0,01^c$	$0,0289 \pm 0,01^c$	$0,0183 \pm 0,01^d$	$0,0159 \pm 0,01^d$
TR (%)	$100 \pm 0,01^a$	$72,51 \pm 0,01^b$	$55,32 \pm 0,01^c$	$63,08 \pm 0,01^c$	$41,49 \pm 0,01^d$	$36,45 \pm 0,01^d$
Riboflavină (mg)	$0,0465 \pm 0,01^a$	$0,0333 \pm 0,01^b$	$0,0257 \pm 0,01^c$	$0,0275 \pm 0,01^c$	$0,0193 \pm 0,02^c$	$0,0200 \pm 0,01^c$
TR (%)	$100 \pm 0,01^a$	$71,67 \pm 0,01^b$	$55,33 \pm 0,01^c$	$59,20 \pm 0,01^c$	$41,57 \pm 0,01^c$	$34,69 \pm 0,01^c$
Niacină (mg)	$5,24 \pm 0,06^a$	$3,22 \pm 0,04^b$	$2,05 \pm 0,04^c$	$2,13 \pm 0,01^c$	$1,23 \pm 0,01^d$	$1,14 \pm 0,05^d$
TR (%)	$100 \pm 0,01^a$	$61,49 \pm 0,04^b$	$39,21 \pm 0,04^c$	$40,74 \pm 0,01^c$	$23,42 \pm 0,01^d$	$23,42 \pm 0,01^d$
Vitamine liposolubile						
Retinol (mg)	$0,3411 \pm 0,02^a$	$0,2123 \pm 0,01^b$	$0,1251 \pm 0,01^c$	$0,1148 \pm 0,01^c$	$0,0941 \pm 0,01^c$	$0,0917 \pm 0,01^c$
TR (%)	$100 \pm 0,01^a$	$62,24 \pm 0,01^b$	$37,89 \pm 0,02^c$	$34,10 \pm 0,01^c$	$29,85 \pm 0,01^c$	$29,40 \pm 0,01^c$

α -tocoferol (mg)	0.62 ± 0.02^a	0.32 ± 0.02^b	0.26 ± 0.03^c	0.22 ± 0.02^c	0.21 ± 0.02^c	0.12 ± 0.04^d
TR (%)	100 ± 0.01^a	51.61 ± 0.02^b	43.33 ± 0.01^c	35.95 ± 0.01^c	36.65 ± 0.01^c	21.17 ± 0.01^d

Valorile pentru substanță uscată, digestibilitate și pierdere de conținut sunt exprimate ca procent din total. Literele diferite (a–d) indică diferențe semnificative statistic între probe.

Prin apa eliminată din produs, în stare lichidă, se pierd cantități semnificative de lipide și compuși liposolubili, proteine solubile, vitamine, minerale etc., existând posibilitatea reintegrării acestui subprodus în alte preparate culinare. Pierderile de umiditate individualizează randamentele de producție și consumul specific de materii prime, cu impact direct asupra eficienței economice. Sistemele de producție cook–chill, dar în special cele cook–freeze, sunt consumatoare atât de resurse materiale, cât și energetice, astfel încât pentru obținerea rezultatelor economice așteptate este necesară o gestionare eficientă a costurilor, care să coreleze cheltuielile de producție cu comenzile și vânzările.

i) Evaluarea conținutului de macronutrienți

Conform protocolului de lucru, au fost efectuate trei determinări, cu un coeficient de variație al reproductibilității de 3,85 ($VCr\% = 3,85$) și o incertitudine de măsurare de 7,35 ($M\% = 7,35$). Preparatul selectat pentru evaluare în raport cu diferitele tipuri de tratament termic sau procesare este un produs cu conținut ridicat de proteine, de aproximativ $14,32 \pm 0,02\%$. Pornind de la o digestibilitate proteică de 69,51% în proba A0 (crud), cel mai eficient tip de tratament termic a fost sous vide, unde digestibilitatea a crescut la 89,91%. De asemenea, raportându-se la valoarea inițială din A0 (69,51%), cea mai scăzută digestibilitate pentru toate preparatele a fost determinată în cazul probei A3 (Mw-CS, 86,91%), rezultatele fiind semnificativ diferite ($p < 0,05$). Rezultatele nu au fost semnificativ diferite ($p > 0,05$) pentru probele A1 (SV-CS, 89,91%), A2 (CC-CS, 89,31%) și A4 (CC-CC, 90,67%). De asemenea, s-a observat că digestibilitatea probei A5 (CC-CF) a fost de 91,74%, rezultat semnificativ diferit față de celelalte probe ($p < 0,05$).

Autorii unui studiu similar (*Bhat și colab., 2021*) au concluzionat că procesele termice precum sous vide pot induce modificări favorabile, cum ar fi desfășurarea parțială sau expunerea situsurilor de clivaj în proteinele musculare, îmbunătățind digestibilitatea acestora, în timp ce procese precum fierberea înăbușită sau prăjirea pot induce modificări nefavorabile, precum agregarea proteinelor, oxidare severă, legături încrucișate sau creșterea conținutului de legături disulfidice (S–S), reducând susceptibilitatea proteinelor la digestia gastrointestinală.

Conținutul de glucide nu a suferit modificări majore în timpul tratamentelor aplicate, diferențele observate fiind sub 1%. Proba A0 a avut un conținut de zaharuri de 0,73% (g/g). A1 (sous vide) a avut 1,1% (g/g), A2 (convectiv) 1,05% (g/g), iar A3 (microunde) 1,93% (g/g). Sistemul CC-CC (A4) a avut 1,23% (g/g), iar sistemul CC-CF (A5) 1,25% (g/g). Preparatul crud (A0) nu a avut un conținut ridicat de glucide (0,73% g/g). Diferențele dintre probe au fost determinate de solubilitatea compușilor în lichidul colectat în recipientele de coacere. Conținutul de glucide nu a fost semnificativ diferit pentru probele A1, A2, A4 și A5 ($p > 0,05$). În

schimb, proba A3 (Mw-CS, 1,90% g/g) a prezentat o diferență semnificativă ($p < 0,05$), datorită încălzirii rapide și evaporării apei.

Preparatele culinare bogate în grăsimi saturate și mononesaturate sunt relativ stabile la acțiunea temperaturii. În probele analizate, pierderea conținutului lipidic a variat între 6% și 9%, în funcție de sistemul de gătit aplicat (Tabelul 2.40 prezintă conținutul lipidic al tuturor probelor analizate).

Cel mai protector sistem a fost cel sous vide (A1), cu o pierdere de 6%, în timp ce pentru proba A3 s-a determinat o pierdere de 9%. Lipidele și alimentele bogate în lipide sunt deosebit de sensibile la încălzirea cu microunde, deoarece căldura specifică a lipidelor este redusă, ceea ce duce la încălzirea rapidă a acestora. Încălzirea cu microunde favorizează în principal oxidarea lipidică, dar poate determina și lipoliză și polimerizare.

Această metodă de gătit poate avea un impact diferit asupra oxidării lipidelor, în funcție de condițiile de procesare utilizate (putere, temperatură și timp). Analiza oferă o imagine de ansamblu asupra principalelor efecte de degradare ale încălzirii cu microunde asupra uleiurilor vegetale și alimentelor care conțin lipide, cu accent pe oxidarea acizilor grași și a colesterolului (*Inchingolo și colab., 2013*).

În cazul probei martor (A0), conținutul de acizi grași saturați (SFA, 30,42%) a fost mai scăzut decât cel al acizilor grași mononesaturați (MUFA, 34,46%), dar mai ridicat decât cel al acizilor grași polinesaturați (PUFA, 12,57%), ceea ce indică un conținut ridicat de acizi grași nesaturați (Tabelul 2.41). Acest aspect determină un grad crescut de risc în ceea ce privește transformările negative cauzate de oxidare. Tehnicile culinare aplicate în gastronomia de tip fine dining pentru această categorie de preparate implică operații preliminare cu expunere la variații de temperatură, precum felierea, porționarea și formarea produsului, ceea ce presupune prezența luminii și a oxigenului. Acești factori influențează direct stabilitatea PUFA și MUFA, alături de alți factori precum pH-ul, conținutul natural de antioxidanți, prospețimea materiei prime, precum și condițiile și durata de depozitare după tratamentul termic (CC–CC și CC–CF).

În proba martor (A0), acidul undecanoic (C11:0), acidul tridecanoic (C13:0), cis-10-pentadecanoic (C15:2) și cis-10-heptadecenoic (C17:1) nu au fost detectați. Dintre acizii grași mononesaturați (MUFA), acidul oleic (C18:1) a reprezentat 25,56% din totalul acizilor grași, iar izomerul său C18:1-iso a fost prezent în proporție de 2,17%. Acidul palmitoleic a fost determinat în proporție de 3,85%, iar acidul cis-11-eicosenoic a avut o valoare de 2,63%.

Tabelul 2.41 Conținutul de acizi grași

Acizi grași (%)	A0	A1	A2	A3
C6:0; caproic	7,59 ± 0,01 ^a	2,18 ± 0,01 ^b	2,29 ± 0,01 ^b	0,42 ± 0,01 ^c
C8:0; caprilic	0,20 ± 0,04 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,03 ^b
C10:0; capric	0,23 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,01 ^b
C11:0; undecanoic	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C12:0; lauric	2,12 ± 0,04 ^a	2,24 ± 0,02 ^b	2,49 ± 0,01 ^c	3,49 ± 0,02 ^d

C13:0; tridecanoic	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C14:0; miristic	3,18 ± 0,02 ^a	3,10 ± 0,03 ^a	3,05 ± 0,01 ^b	3,14 ± 0,02 ^a
C14:1; miristoleic	0,16 ± 0,01	n.d.	n.d.	n.d.
C15:0;	0,22 ± 0,02 ^a	0,18 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^b
pentadecanoic				
C15:1, cis-10	n.d.	0,07 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a	n.d.
C16:0; palmitic	12,50 ± 0,87 ^a	13,12 ± 0,01 ^b	14,18 ± 0,02 ^c	14,08 ± 0,02 ^c
C16:1; palmitoleic	3,85 ± 0,09 ^a	4,08 ± 0,01 ^b	4,19 ± 0,01 ^b	4,01 ± 0,01 ^{ab}
C17:0;	0,23 ± 0,01 ^a	n.d.	n.d.	n.d.
heptadecanoic				
C18:0; stearic	3,93 ± 0,01 ^a	4,64 ± 0,01 ^b	4,88 ± 0,02 ^b	5,48 ± 0,02 ^c
C18:1, cis-9; oleic	25,65 ± 0,09 ^a	28,82 ± 0,02 ^b	30,05 ± 0,02 ^c	29,10 ± 0,09 ^b
C18:1 trans-9; elaidic	2,17 ± 0,01 ^a	2,18 ± 0,01 ^a	2,21 ± 0,01 ^b	2,18 ± 0,01 ^a
C18:2, n-6; linoleic	8,27 ± 0,01 ^a	9,04 ± 0,01 ^b	9,11 ± 0,01 ^c	8,70 ± 0,02 ^b
C18:3, n-3; linolenic	2,14 ± 0,01 ^a	1,96 ± 0,01 ^a	2,02 ± 0,01 ^a	1,76 ± 0,01 ^b
C20:0; arachidic	0,22 ± 0,01 ^a	4,10 ± 0,01 ^b	6,62 ± 0,03 ^c	4,27 ± 0,03 ^b
C20:1; eicosenoic	2,63 ± 0,01 ^a	2,86 ± 0,01 ^a	2,76 ± 0,02 ^a	2,24 ± 0,01 ^b
C20:2; eicosadienoic	2,16 ± 0,01 ^a	3,21 ± 0,01 ^b	3,07 ± 0,02 ^b	3,22 ± 0,03 ^b
(n-6)				
SFA (%)	30,42 ± 0,77 ^a	29,99 ± 0,05 ^a	34,13 ± 0,05 ^b	31,73 ± 0,03 ^a
SFA (%)	34,46 ± 0,16 ^a	37,94 ± 0,03 ^b	39,21 ± 0,02 ^c	37,53 ± 0,08 ^b
PUFA (%)	12,57 ± 0,02 ^a	14,21 ± 0,02 ^b	14,20 ± 0,03 ^b	13,68 ± 0,16 ^c
UFA/SFA	1,55 ± 0,03 ^a	1,74 ± 0,01 ^b	1,56 ± 0,01 ^a	1,61 ± 0,01 ^a
PUFA/SFA	0,41 ± 0,01 ^a	0,47 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,01 ^a
n-6/n-3	4,87 ± 0,01 ^a	6,25 ± 0,01 ^b	6,03 ± 0,01 ^b	6,77 ± 0,11 ^c

SFA = acizi grași saturați; MUFA = acizi grași mononesaturați; PUFA = acizi grași polinesaturați; UFA = acizi grași nesaturați, Valorile sunt exprimate ca procent din conținutul total de acizi grași. n.d. = nedetectat. Literele diferite indică diferențe semnificative statistic (test Tukey, $p \leq 0,05$).

Cei mai reprezentativi acizi grași polinesaturați (PUFA) din produsul A0 au fost: acidul linoleic (8,27%), acidul linolenic (2,14%) și acidul cis-11,13-eicosadienoic (2,16%). Acizii grași caproic (7,59%), caprilic (0,2%) și capric (0,23%) detectați în preparatele din pește provin din smântâna utilizată ca materie primă, conform standardului produsului. Acești acizi grași saturați cu lanț scurt sunt specifici produselor lactate.

Dintre toate tratamentele termice aplicate, metoda sous vide a protejat cel mai bine conținutul de PUFA, fiind cea mai echilibrată preparare din punctul de vedere al raportului PUFA/SFA (0,47), respectiv al raportului n-6/n-3 (6,25). Lipsa oxigenului și menținerea vidului în interiorul ambalajului în timpul tratamentului termic au contribuit la conservarea conținutului de acizi grași esențiali în proba A1. Din categoria acizilor grași ω -3, probele analizate conțin doar acid linolenic, determinând un conținut cuprins între 0,19–0,61 g/porție.

j) Evaluarea conținutului de vitamine hidrosolubile și liposolubile

Contrar opiniilor larg răspândite (*Leskova și colab., 2006*), care au condus totuși la o adevărată „tendință” în nutriția dietetică — „alimente fără foc” — majoritatea vitaminelor nu sunt foarte sensibile la acțiunea temperaturii (*Lee și colab., 2018*). Conținutul vitaminic al unui preparat culinar poate fi asigurat prin asocierea eficientă a materiilor prime, dar și optimizat prin alegerea corectă a tehnicilor culinare și a sistemelor de producție care conduc la o retenție

vitaminică superioară. Tratamentul termic aplicat produselor culinare reprezintă un factor decisiv în conservarea potențialului vitaminic nativ.

Din analiza datelor rezultă că sistemul de producție cel mai protector pentru riboflavină, utilizat în obținerea produselor fine dining din pește, este sous vide ($A1 - TR = 71,67\%$) și gătitura la microunde ($A3 - TR = 59,20\%$). Pierderile de riboflavină sunt influențate de procesele de răcire rapidă/congelare și de durata de depozitare. După gătitura convectivă, în proba A2 s-a determinat o pierdere de 45% din conținutul de vitamina B2, iar după 72 de ore în condiții de refrigerare și regenerare termică pierderea a fost de 58,5%. În cazul produselor congelate și regenerate, după 20 de zile, pierderea este de aproximativ 65,3%.

Astfel, pentru produsele realizate în sistemul SV, retenția reală a vitaminei PP raportată la conținutul inițial este de 61,49%, comparativ cu 40,74% în cazul microundelor și 39,21% în cazul coacerii convective. În sistemele cook–chill și cook–freeze, retențiile reale sunt de aproximativ 20%.

Temperatura, lumina și contactul cu oxigenul influențează negativ retenția retinolului. Vitamina A suferă degradare oxidativă sub acțiunea luminii, prin ruperea legăturilor duble din ciclu și deschiderea nucleului β -iononic. Nu doar retinolul este afectat, ci și carotenoizii, care suferă izomerizare din forma trans în forma cis, cu reducerea activității vitaminice. Din rezultate reiese că tratamentul la microunde este cel mai puțin protector pentru vitamina A ($A3 - TR = 30,20\%$). În cazul sous vide, retenția este de 62,24%, iar în sistemul CC-CS de 37,89%. În sistemele cook–chill și cook–freeze, retențiile reale sunt de aproximativ 30%.

Pentru α -tocoferol s-au evidențiat pierderi semnificative comparativ cu proba martor (A0). Cel mai protector sistem este sous vide ($A1 - TR = 51,61\%$), urmat de CC-CS ($A2 - TR = 43,33\%$) și Mw-CS ($A3 - TR = 35,95\%$). În cazul CC-CF, influențat și de durata de depozitare (20 zile), retenția reală este de aproximativ 20%. S-a observat că retenția de α -tocoferol este influențată semnificativ de tipul tratamentului termic ($p < 0,05$), sous vide fiind cel mai eficient sistem. Nu au fost diferențe semnificative ($p > 0,05$) între probele A2, A3 și A4, însă proba A5 (CC-CF) a fost semnificativ diferită, fiind influențată de durata lungă de depozitare ($p < 0,05$).

Un studiu similar realizat de Kumar & Aalbersberg (*Kumar și colab., 2025*) arată o retenție de 91% a retinolului în produse preparate la microunde și doar 20% în produse gătit tradițional în vase de lut, precum și o retenție de niacină de 95% în microunde și 63% în metode tradiționale. Alte studii (*Gentry și colab., 2006; Roberts și colab., 2004*) susțin, de asemenea, o retenție mai ridicată a micronutrienților în preparatele realizate la microunde comparativ cu metodele convenționale.

k) Analiza microbiologică

Dezvoltarea microorganismelor în produsele de catering este influențată de compoziția chimică a produsului, tipul de procesare în catering, parametrii tehnologici, în special cei ai tratamentului termic, precum și de relațiile biologice și interacțiunile dintre diferite microorganisme.

Toate probele au fost analizate din punct de vedere al inocuității, prin determinarea încărcăturii microbiologice.

În probele testate, bacteriile patogene *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella spp.* și *L. monocytogenes* au fost absente în toate cazurile analizate.

- **Număr total de germeni aerobi (Aerobic Plate Count – APC)**

În proba crudă (A0), APC a fost de 4,02 log CFU/g, valoare de aproximativ 10 ori mai mică decât limita maximă permisă de legislația în vigoare în România (5 log CFU/g, corespunzător 10^5 CFU/g). Malak și colab. (Malak și colab., 2025) au comparat încărcătura microbiană a cinci specii de pește și au determinat că crapul comun și crapul ierbivor au prezentat cele mai ridicate valori ale APC (5,44 log CFU/g și, respectiv, 5,51 log CFU/g). Analiza prezentului studiu a evidențiat valori mai scăzute ale APC, chiar dacă proba A0 conținea fileuri din două specii de pește și alte ingrediente. De asemenea, aceștia au raportat valori ale bacteriilor coliforme de 1,66 log CFU/g și 1,93 log CFU/g, respectiv, mai ridicate decât rezultatele obținute în acest studiu.

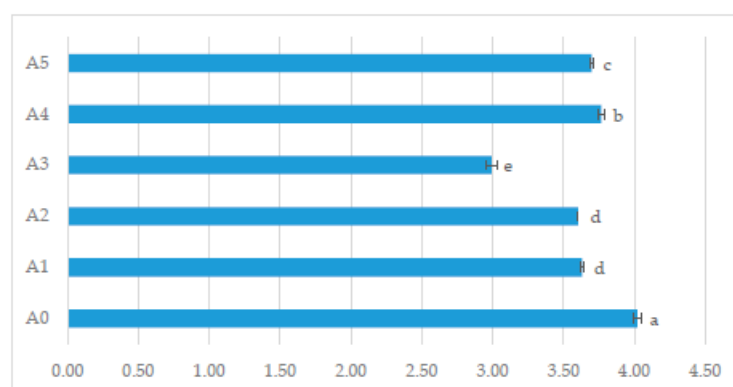


Figura 2.30. Numărul total de bacterii aerobe mezofile (log₁₀ UFC/g) în diferitele preparate din pește destinate cateringului, obținute prin tehnici diferite de gătire (A0 — martor; A1 — sous vide cook-serve; A2 — gătire convectivă cook-serve; A3 — gătire la microunde cook-serve; A4 — gătire convectivă cook-chill; A5 — gătire convectivă cook-freeze). Rezultatele sunt exprimate ca media a trei determinări ± deviația standard (SD); literele diferite indică diferențe semnificative statistic (test Tukey, $p \leq 0,05$).

Producția preparatului din pește în sistemul cook-chill (CC-CC, cuptor cu convecție urmat de răcire rapidă în două etape până la temperatura de refrigerare) a determinat un nivel de contaminare bacteriană cu 45% mai ridicat decât în cazul produsului preparat în sistem cook-serve. Produsele realizate în sistem cook-freeze (CC-CF, cuptor cu convecție urmat de răcire rapidă în două etape până la temperatura de congelare) au prezentat o încărcătură cu 24,2% mai mare comparativ cu același produs realizat în sistem cook-serve.

Stabilitatea microbiologică a produselor de catering a fost monitorizată pe durata termenului de valabilitate prevăzut de standardul produsului, în ceea ce privește evoluția microorganismelor aerobe mezofile. Termenul de valabilitate este estimat la 5 zile pentru preparatele realizate în sistem cook-chill (CC-CC), păstrate la 4 °C, și la 50 de zile pentru preparatele realizate în sistem cook-freeze (CC-CF), păstrate la -18 °C. În urma analizelor microbiologice efectuate pe probele depozitate timp de 5 zile (A4-e), respectiv 50 de zile (A5-e),

a fost posibilă estimarea și declararea termenului de valabilitate al produselor de catering. Probele au fost prelevate și analizate zilnic din produsele refrigerate codificate A4a–e pe întreaga durată a termenului de valabilitate.

- **Numărul total de drojdii și mucegaiuri (TYMC)**

Toate probele analizate au prezentat un număr total de fungi mai mic decât jumătate din valoarea APC, cu excepția probei A3. Proba A0, reprezentând proba crudă, a avut un TYMC de 2,43 log CFU/g, valoare care depășește încărcătura inițială de fungi acceptată de Regulamentul CE.

- **Numărul de coliformi**

Numărul inițial de coliformi în proba crudă a fost de 1,41 log CFU/g, sub limita stabilită de Regulamentul Comisiei Europene. După aplicarea tratamentelor termice, valorile au scăzut în sistemele cook–serve astfel: 1,22 log CFU/g în sous vide, 1,04 log CFU/g în convecție și 0,48 log CFU/g în cazul microundelor.

- **Determinarea *E. coli***

Proba crudă a prezentat 0,85 log CFU/g de *E. coli*. Acest nivel a scăzut cu 33% (0,67 log CFU/g) după gătitul sous vide, cu 57% (0,48 log CFU/g) după tratamentul convectiv și a fost redus complet (nedetectabil) în toate celelalte probe. Toate probele testate au menținut un conținut de *E. coli* sub limitele acceptate.

- **Evaluarea calității senzoriale**

Caracteristicile senzoriale ale preparatelor din pește au fost identificate ca fiind factorii principali care influențează decizia de achiziție a consumatorilor. Aceste caracteristici sunt, de asemenea, considerate determinanți esențiali ai calității acestor preparate. Diferite atribute senzoriale pot fi utilizate pentru clasificarea preparatelor din pește în funcție de aceste standarde (*Malak și colab., 2025*).

Setul de date al preparatelor din pește (Tabelul 2.43) cuprinde rezultatele evaluării senzoriale ale probelor de preparate din pește: A1: gătit sous vide—cook—serve (SV—CS), A2: gătit convectiv—cook—serve (CC—CS), A3: gătit la microunde—cook—serve (Mw—CS), A4: gătit convectiv—cook—chill (CC—CC), A5: gătit convectiv—cook—freeze (CC—CF), OA1: probă îmbunătățită sous vide—cook—serve (SV—CS), OA2: probă îmbunătățită gătit convectiv—cook—serve (CC—CS) și OA3: probă îmbunătățită gătit la microunde—cook—serve (Mw—CS). Au fost analizate opt tipuri de preparate din pește, corespunzătoare unui total de 24 de probe (8 probe analizate în triplicat), fiind înregistrate rezultatele pentru șase parametri senzoriali pentru fiecare probă. Variabilele evaluate au fost: aspect exterior, aspect interior, consistență, miros, gust și acceptabilitate generală.

Scopul identificării celui mai distinctiv atribut dintre preparatele din pește a fost realizat prin aplicarea algoritmului Random Forest. Modelul de tip Random Forest pentru clustering a fost optimizat în mod specific în raport cu valoarea criteriului informațional bayesian (BIC), vizibil în diagrama „Elbow Curve” (Figura 2.30). Diagrama „elbow” evidențiază punctul de inflexiune al curbei, respectiv momentul în care adăugarea unui nou cluster nu mai aduce o îmbunătățire semnificativă a modelului. Metrica optimizată a modelului, și anume cea mai mică valoare BIC, este indicată prin punctul roșu.

După cum reiese din Tabelul 2.43 și Figura 2.31, variantele preferate de paneliști sunt reprezentate de proba A2, preparată prin gătire convectivă în sistem cook-serve (CC-CS), precum și de proba OA2, care reprezintă varianta îmbunătățită a aceleiași metode. Cele două probe au fost grupate în același cluster (Cluster 2).

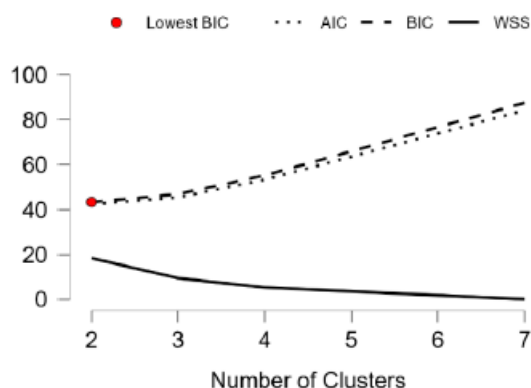


Figura 2.30. Determinarea clusterelor optimizată în conformitate cu Criteriul Informațional Bayesian (BIC) pentru cele opt probe de preparate din pește: A1: gătire sous-vidé – cook-serve (SV-CS), A2: gătire convectivă – cook-serve (CC-CS), A3: gătire cu microunde – cook-serve (Mw-CS), A4: gătire convectivă – cook-chill (CC-CC), A5: gătire convectivă – cook-freeze (CC-CF), OA1: probă îmbunătățită prin gătire sous-vidé – cook-serve (SV-CS), OA2: probă îmbunătățită prin gătire convectivă – cook-serve (CC-CS) și OA3: probă îmbunătățită prin gătire cu microunde – cook-serve (Mw-CS). Criteriul Informațional Akaike (AIC); suma pătratelor în interiorul clusterelor (WSS – within sum of squares).



Figura 2.31. Reprezentare bidimensională t-SNE care ilustrează gruparea clusterelor pentru cele opt probe de preparate din pește: A1: gătire sous-vidé – cook-serve (SV-CS), A2: gătire convectivă – cook-serve (CC-CS), A3: gătire cu microunde – cook-serve (Mw-CS), A4: gătire convectivă – cook-chill (CC-CC), A5: gătire convectivă – cook-freeze (CC-CF), OA1: probă îmbunătățită prin gătire sous-vidé – cook-serve (SV-CS), OA2: probă îmbunătățită prin gătire convectivă – cook-serve (CC-CS) și OA3: probă îmbunătățită prin gătire cu microunde – cook-serve (Mw-CS).

Gătirea convectivă a fost tratamentul termic care a generat cele mai apreciate caracteristici senzoriale în probele analizate A2 (CC-CS) și OA2 (CC-CS), obținând scoruri medii de 8,41, respectiv 8,47 puncte. Toate celelalte probe, indiferent de tratamentul aplicat, au fost grupate

într-un alt cluster (Cluster 1), ceea ce sugerează că paneliștii au acordat evaluări similare acestor mostre, fără diferențe semnificative între scorurile obținute.

Analiza de cluster a evidențiat, de asemenea, ierarhizarea caracteristicilor senzoriale în funcție de importanța lor în gruparea probelor. Cea mai importantă variabilă a fost mirosul (indice 1,383), urmat de gust (1,343), aspectul exterior (1,282), acceptabilitatea generală (1,254), aspectul interior (1,201) și, în final, consistența (0,933).

În ceea ce privește propunerea de optimizare, s-a observat că probele sous vide (SV) optimizate (OA1 — 7,93 puncte) nu au înregistrat un rezultat pozitiv, fiind subevaluate în comparație cu probele inițiale (A1 — 8,15 puncte). În acest caz, propunerea de optimizare tehnică nu a îmbunătățit calitatea senzorială, acest lucru fiind evidențiat de contracția ambalajului datorată vidului intern, care a afectat mecanic integritatea produsului. Aspectul interior și exterior al probelor a fost influențat de consistența produselor netratate termic, precum și de acțiunile mecanice aplicate în timpul preparării, formării și tratamentului termic. De asemenea, s-a observat că probele supuse coacerii convective (OA2) și coacerii la microunde (OA3) au înregistrat scoruri mai mari în comparație cu probele inițiale (A2 și, respectiv, A3).

Rezultatele obținute în acest studiu privind prepararea culinară a peștelui în sistemele cook-serve, cook-chill și cook-freeze, alternând cu tratamente termice precum sous vide, coacere convectivă și microunde, diferă în ceea ce privește randamentul de producție, potențialul nutritiv, siguranța și valoarea senzorială. Cea mai mică pierdere cantitativă a fost determinată în cazul preparatului de pește gătit sub vid (A1, $14,25 \pm 1,57\%$), comparativ cu preparatele tratate termic prin coacere convectivă și microunde, unde pierderile au fost de aproximativ 30%. Sistemele care asigură o durabilitate minimă semnificativ îmbunătățită prin răcire controlată la temperatura de refrigerare (A4) și congelare (A5) au determinat pierderi cantitative de aproximativ 40%.

Sistemele deschise—coacerea convectivă și la microunde—au înregistrat pierderi mai mari de gătire decât sistemul sous vide, în principal din cauza pierderii de umiditate. Cea mai mică pierdere cantitativă a fost determinată în cazul preparatului sous vide (A1, $14,25 \pm 1,57\%$), comparativ cu cele tratate termic prin convecție și microunde, unde pierderile au fost de aproximativ 30%. Sistemele care asigură o durabilitate minimă îmbunătățită prin răcire controlată la 4 °C (A4) și congelare (A5) au determinat pierderi de aproximativ 40%.

Conținutul de macronutrienți a prezentat variații reduse între sistemele utilizate. Conținutul proteic a fost similar în toate preparatele, cu o valoare medie de 16,06%. Digestibilitatea a fost, de asemenea, apropiată, cu variații foarte mici între cele cinci tehnici de gătire, dar a crescut ușor în sistemele cook-chill și cook-freeze, comparativ cu sistemul cook-serve (CC-CS). Profilul acizilor grași a evidențiat cele mai ridicate conținuturi de SFA, MUFA și PUFA în preparatul gătit la convecție. Retenția vitaminei PP a fost maximă în preparatul sous vide și minimă în gătitul convectiv. Cele mai mari cantități de vitamine hidrosolubile au fost menținute în preparatele sous vide, în timp ce sistemul convectiv CC-CS a determinat cea mai mare scădere a conținutului de riboflavină și niacină. În ceea ce privește vitaminele liposolubile, respectiv retinolul și α -tocoferolul, sous vide a păstrat cea mai mare parte din conținut, iar microundele

au determinat reducerea acestora la cele mai scăzute valori. În termeni de retenție reală a vitaminelor, sous vide și gătită convectivă s-au dovedit a fi mai protective.

Din punct de vedere microbiologic, APC a fost cel mai ridicat în preparatul sous vide și cel mai scăzut în cel gătit la microunde, însă ambele au fost în limitele acceptate. Numărul de fungi a fost, de asemenea, sub limite, cu valoarea cea mai mare în preparatul sous vide și cea mai mică după gătită la microunde. Numărul de coliformi a fost foarte redus, iar *E. coli* a fost sub limite, ajungând chiar la absență în preparatul la microunde. *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* și *Salmonella spp.* au fost nedetectate în toate probele, ceea ce confirmă faptul că preparatele au fost obținute în condiții de siguranță și igienă maximă. Sistemele cook–chill și cook–freeze oferă o durată de conservare mai mare și un control riguros al principalilor indicatori de siguranță.

Gătirea convectivă în sistem cook–serve (CC–CS) a fost identificată ca tratamentul termic care a generat cele mai apreciate caracteristici senzoriale în probele analizate, în special A2 și OA2, care au obținut cele mai mari scoruri. Sistemul CC–CS s-a dovedit a fi cel mai eficient, deoarece asigură un echilibru între calitatea tehnologică, calitatea nutrițională, siguranță și calitatea senzorială. Prin acest sistem de producție se poate asigura diversificarea în gastronomia de fine dining, oferind versatilitate valorilor de calitate ale produselor culinare. Tratamentele sous vide și microunde, precum și probele preparate în sistemele cook–chill și cook–freeze, au fost considerate mai puțin atractive din punct de vedere senzorial.

I.3 Recunoașterea și impactul activității

Activitatea profesională, în special cea de cercetare, au condus la atingerea unor indicatori respectabili din punctul de vedere al recunoașterii.

Activitatea profesională, în special cea de cercetare, au condus la atingerea unor indicatori respectabili din punctul de vedere al recunoașterii.

Referitor la **indicii Hirsch**, conform WoS/Clarivate indicele Hirsch este 5 (Fig.3.1), în Scopus este 5 (Fig.3.2), iar în Google Scholars este 9 (Fig.3.3), conform print-screen-urilor din imaginile de mai jos.

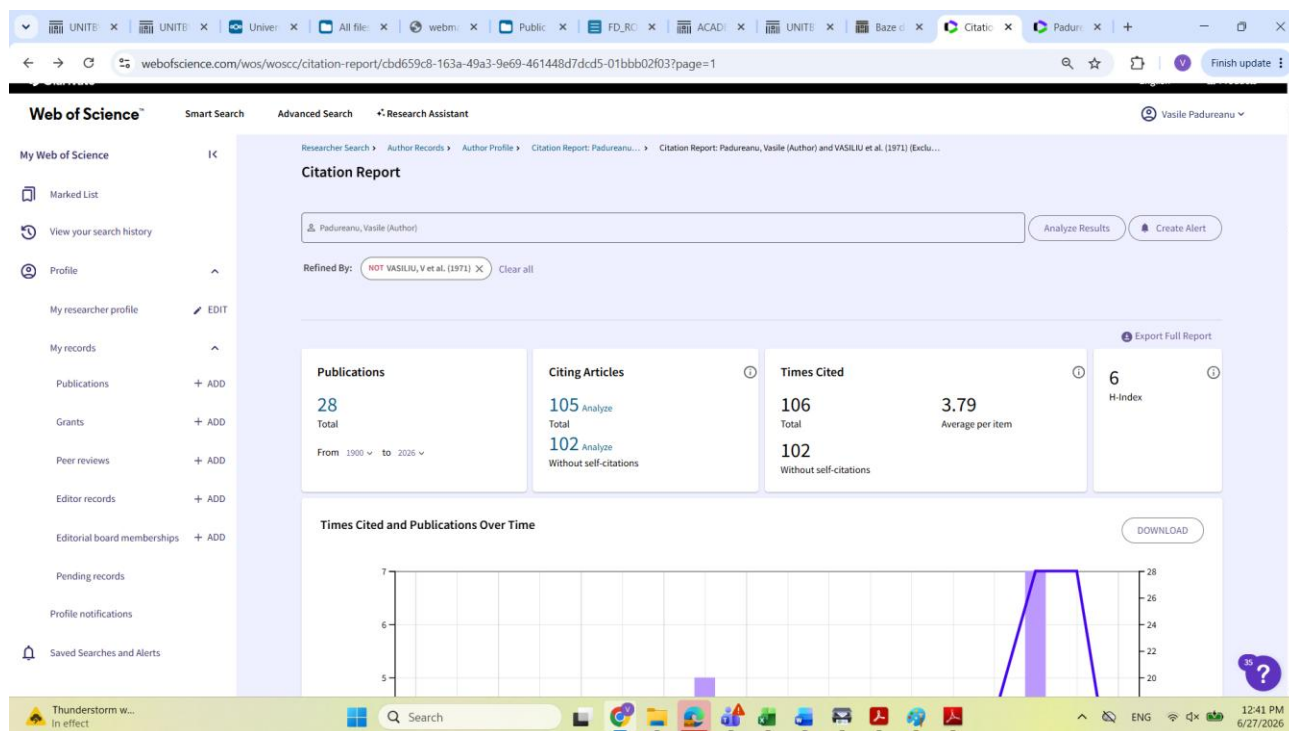
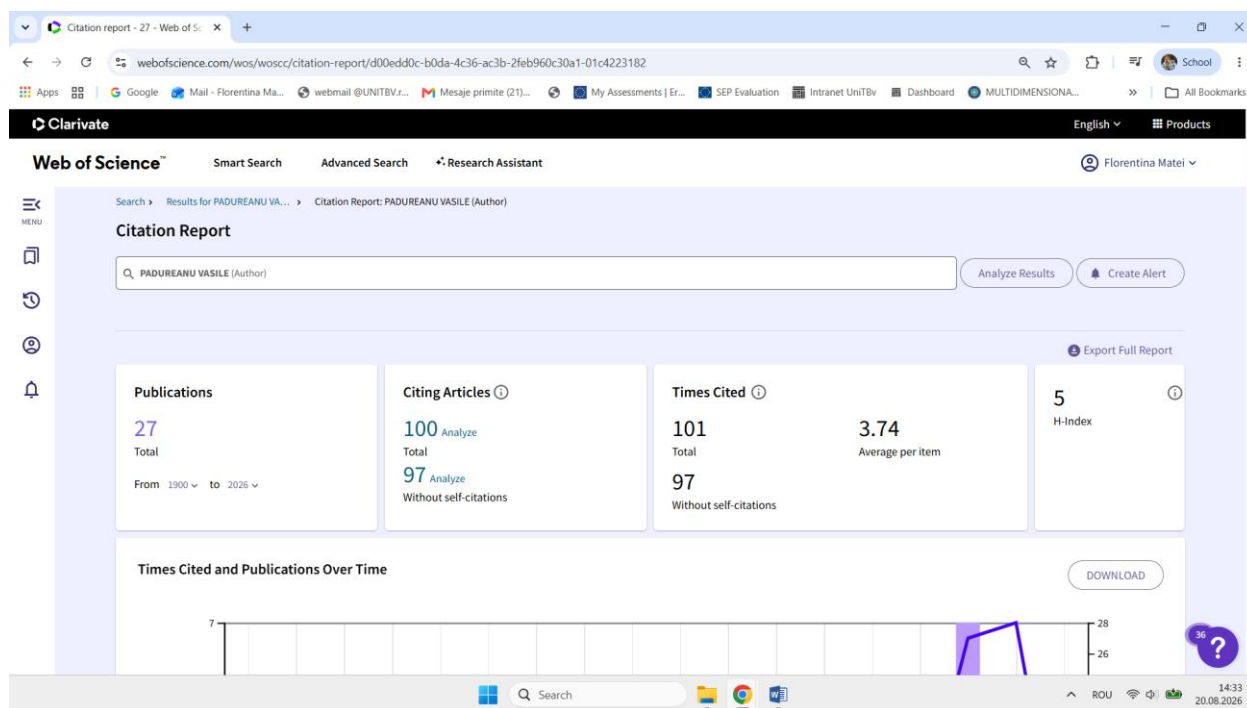


Figura 3.1 Indice Hirsch in WoS la data de 09.06.2026



Conform WoS/Clarivate publicațiile (28) la care sunt autor au acumulat un total de 102 de citări.

Fig.3.2.Indice Hirsch in Scopus la data de 09.01.2025

Conform bazei de date Scopus publicațiile indexate (49) la care sunt autor au acumulat un total de 602 de citări.



Padureanu V

Universitatea Transilvania Brasov

Adresă de e-mail confirmată pe unitbv.ro

URMĂRIȚI

Citat de

AFIȘAȚI-LE PE TOATE

	Toate	Din 2021
Referințe bibliografice	259	210
h-index	9	8
i10-index	9	7

B.II PLANUL DE EVOLUȚIE ȘI DEZVOLTARE A CARIEREI PROFESIONALE, ȘTIINȚIFICE ȘI ACADEMICE

Obiectivul fundamental al carierei mele a fost, este și va rămâne perfecționarea continuă din punct de vedere profesional, în vederea desfășurării activităților didactice și de cercetare la cele mai înalte standarde de calitate. Prin această preocupare constantă urmăresc să respect atât propriile valori și principii profesionale, cât și standardele de calitate promovate prin Carta Universității Transilvania din Brașov.

În vederea atingerii acestor obiective, îmi propun să îmi dezvolt activitatea în mai multe direcții strategice, după cum urmează: dezvoltarea activității didactice și educaționale, consolidarea activității de cercetare științifică și intensificarea procesului de internaționalizare.

II. 1. Dezvoltare pe plan didactic

Conținuturile disciplinelor vor fi actualizate periodic, prin integrarea noutăților din domeniul tehnologiilor alimentare fermentative, analizei instrumentale, controlului calității și siguranței alimentare. Voi urmări dezvoltarea competențelor practice ale studenților și familiarizarea acestora cu tehnologiile moderne, metodele avansate de analiză și cerințele actuale ale industriei alimentare.

De asemenea, îmi propun dezvoltarea și diversificarea resurselor didactice prin elaborarea de cursuri, ghiduri de laborator, materiale digitale și lucrări de specialitate destinate procesului educațional, inclusiv publicarea unei cărți dedicate analizei instrumentale utilizate în industria alimentară.

Pe termen lung, voi urmări integrarea în activitatea didactică a unor domenii emergente, precum digitalizarea, automatizarea, inteligența artificială și sustenabilitatea, contribuind astfel la formarea unor absolvenți bine pregătiți, adaptabili și competitivi pe piața muncii.

II. 2 Dezvoltare pe planul cercetării-dezvoltării

Activitatea de cercetare va fi strâns corelată cu strategia de cercetare a Școlii Doctorale Interdisciplinare din cadrul Universității Transilvania din Brașov, în special cu domeniile de cercetare de interes din domeniul Ingineria Produselor Alimentare, respectiv:

- Chimia și procesarea alimentelor: înțelegerea compoziției, îmbunătățirii, conservării și noilor tehnologii de procesare a alimentelor.
- Microbiologia și siguranța alimentară: asigurarea siguranței alimentare și a calității și dezvoltarea de măsuri de control.
- Nutriție și sănătate: conectarea științei alimentare la sănătatea umană, dietă și prevenirea bolilor legate de dietă.
Sustenabilitate: dezvoltarea de sisteme rezistente, reducerea risipei alimentare și valorificarea subproduselor.

Principalele teme de cercetare pe care le preconizez să le abordez în domeniul *Ingineria Produselor Alimentare* sunt următoarele:

- Obținerea de biomasă proteică cu drojdii neconvenționale
- Obținerea unor oțeturi funcționale pe bază de Kombucha
- Aplicații ale ultrasunetelor în extracția de compuși biologic activi ca ingrediente alimentare
- Dezvoltarea unor tehnologii inovative de obținere a unor vinuri din fructe cu valoare adăugată

În ceea ce privește activitatea de **practică de cercetare**, voi atrage în proiectele în care sunt implicat atât studenți din anii terminali (min 2/ an), cât și tineri cercetători-doctoranzi (min 1/an). Principalele domenii abordate vor fi legate de tehnologii fermentative, alimente funcționale și nutraceutice, bioeconomie circulară.

În termeni de **publicații**, bazându-mă pe activitatea doctoranzilor și a colaborărilor cu alți parteneri, îmi propun ca anual să elaborăm minimum două articole indexate și cotate WoS/Clarivate, unul Scopus și trei de tip BDI.

Referințe bibliografice

1. Adams, J.B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyanidin. I. In acidified aqueous solution at 100 °C. J. Sci. Food Agric. 1973, 24, 747–762.
2. Ahmmed, M.K.; Ahmmed, F.; Tian, H.S.; Carne, A.; Bekhit, A.E.A. Marine Omega-3 (n-3) Phospholipids: A Comprehensive Review of Their Properties, Sources, Bioavailability, and Relation to Brain Health. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2020, 19, 64–123.
3. Alencar NMM, Cazarin CBB, Corrêa LC, Maróstica Junior MR, Biasoto ACT, Behrens JH. Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. J Food Biochem. 2018 Apr;42(2):e12471.
4. Alencar, N. M. M., Cazarin, C. B. B., Corrêa, L. C., Maróstica Junior, M. R., Biasoto, A. C. T., & Behrens, J. H. (2018). Influence of maceration time on phenolic compounds and antioxidant activity of the Syrah must and wine. Journal of Food Biochemistry, 42(2), e12471. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12471>
5. Alfaifi, B.M.; Ah-Ghamdi, S.; Othman, M.B.; Hobani, A.I.; Suliman, G.M. Advanced Red Meat Cooking Technologies and Their Effect on Engineering and Quality Properties: A Review. Foods 2023, 12, 2564.

6. Angel-Rendon, S.V.; Filomena-Ambrosio, A.; Hernandez-Carrion, M.; Llorca, E.; Hernando, I.; Quiles, A.; Sotelo-Diaz, I. Pork Meat Prepared by Different Cooking Methods. A Microstructural, Sensorial and Physicochemical Approach. *Meat Sci.* 2020, 163,108089.
7. ANSVSA, (2016), Ordinul ANSVSA nr. 35/2016 - Methodological Norms for the Application of the Action Program for the Control, Prevention, Control and Eradication of Animal Diseases, of those communicable from animals to humans, animal protection and environmental protection, identification and registration of cattle, swine, sheep, goats and equidae, as well as of the Methodological Norms for the application of the Food Safety Supervision and Control Program (in Romanian). Monitorul Oficial al României, Partea I, nr. 303, Bucharest, Romania
8. AOAC 923.09-1923; Invert Sugar in Sugars and Syrups. Lane-Eynon General Volumetric Method. Association of Official Analytical Chemists: Rockville, MD, USA, 1923.
9. AOAC. Vitamin C (ascorbic acid) in vitamin preparations and juices. In *Official Methods of Analysis*, 15th ed.; Helrich, K., Ed.; AOAC, Inc: Arlington, VA, USA, 2000; p. 1058.
10. Arvaniti, O.A.; Mirsonis, P., Sirokos, I., Dermishaj, E., & Samaras, Y. (2019). The physicochemical properties and antioxidant capacities of commercial and homemade Greek vinegars. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 18(3): 225-234.
11. Banc R, Loghin F, Miere D, Ranga F, Socaci C. Phenolic composition and antioxidant activity of red, rosé and white wines originating from Romanian grape cultivars. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca.* 2020;48(2):716–34.
12. Banc, R.; Socaci, C.; Miere, D.; Filip, L.; Cozma, A.; Stanciu, O.; Loghin, F. Benefits of Wine Polyphenols on Human Health: A Review. *Bull. UASVM Food Sci. Technol.* 2014, 71, 79–87.
13. Bautista-Ortín AB, Jiménez-Martínez MD, Jurado R, Iniesta JA, Terrades S, Andrés A, Gómez-Plaza E. Application of high-power ultrasounds during red wine vinification. *Int J Food Sci Technol.* 2017;1–10.
14. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70–6.
15. Bhat, R.; Shuaidda, N.; Min-Tze, L.; Karim, A.A. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason. Sonochem.* 2011, 18, 1295–1300.
16. Bhat, S.; Sharma, H.K. Combined effect of blanching and sonication on quality parameters of bottle gourd (*Lagenaria siceraria*) juice. *Ultrason. Sonochem.* 2016, 33, 182–189.
17. Bhat, Z.F.; Morton, J.D.; Bekhit, A.E.A.; Kumar, S.; Bhat, H.F. Effect of Processing Technologies on the Digestibility of Egg Proteins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, 20, 4703–4738.
18. Bhat, Z.F.; Morton, J.D.; Bekhit, A.E.A.; Kumar, S.; Bhat, H.F. Thermal Processing Implications on the Digestibility of Meat, Fish and Seafood Proteins. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021, 20, 4511–4548.
19. Bohm, V.; Kuhnert, S.; Rohm, H.; Scholze, G. Improving the Nutritional Quality of Microwave-Vacuum Dried Strawberries: Preliminary Study. *Food Sci. Technol. Int.* 2006, 12, 67–75.

20. Bosiljkov, T.; Dujmić, F.; Bubalo, M.C.; Hribar, J.; Vidrih, R.; Brnčić, M.; Zlatic, E.; Redovniković, I.R.; Jokić, S. Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food Bioprod. Process.* 2017, 102, 195–203.
21. Brănescu, G.; Măzărel, A.; Moja, A.; Lupu, M. Management of Combating Food Fraud in the Field of Public Catering. *Ann. Univ. Craiova Agric. Mont. Cadastre Ser.* 2023, 53, 31–36.
22. Brezan, B., Badarau, C., & Woinaroschy A. (2020). Effects of Blueberry and Black Carrot Extracts Addition on Antioxidant Properties and Protein-Precipitating Capacity of Ultrasound-Treated Cider. *Processes*, 8(7), 812–832.
23. Cacace, J.E.; Mazza, G. Optimisation of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J. Food Sci.* 2006, 68, 240–248.
24. Cao, X.; Cai, C.; Wang, Y.; Zheng, X. Effects of ultrasound processing on physicochemical parameters, antioxidants, and color quality of bayberry juice. *J. Food Qual.* 2019, 1, 1–12.
25. Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Di Minno G, Ritieni A. Red wine consumption and cardiovascular health. *Molecules.* 2019 Oct 8;24(19):3626.
26. Cetinkaya, T.; Ceylan, Z.; Meral, R.; Kilicer, A.; Altay, F. A Novel Strategy for Au in Food Science: Nanoformulation in Dielectric, Sensory Properties, and Microbiological Quality of Fish Meat. *Food Biosci.* 2021, 41, 101024.
27. Chan, S.S.; Iversen, S.G.; Skuland, A.V.; Rotabakk, B.T.; Lerfall, J.; Rognsa, G.H.; Roth, B. Using Renowned Chefs for VeriTaste™ as a Sensory Method Analysis in Food Products—A Comparison of Atlantic Salmon Stored in Refrigerated Seawater and on Ice. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 2023, 31, 100635.
28. Chemat, F.; Rombaut, N.; Meullemiestre, A.; Turk, M.; Perino, S.; Fabiano-Tixier, A.S.; Abert-Vian, M. Review of Green Food Processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, 41, 357–377.
29. Choe, E.; Huang, R.; Min, D.B. Chemical Reactions and Stability of Riboflavin in Foods. *J. Food Sci.* 2006, 70, R28–R36.
30. Chou, S.F.; Horng, J.S.; Liu, C.H.; Yu, T.Y.; Huang, Y.C.; La, Q.P.; Ng, Y. Comparison of Hotel Fine Dining and Chain Restaurant Consumer Perceived Service Quality and Satisfaction Predictions. *J. Hosp. Tour. Insights* 2024. ahead of print.
31. Clodoveo, M.L.; Dipalmo, T.; Rizzello, C.G.; Corbo, F.; Crupi, P. Emerging technology to develop novel red winemaking practices: An overview. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016, 38, 41–56.
32. Commission Regulation (EC) 2073/2005 of 15 November 2005 regarding microbiological criteria for food products, p. 6.
33. Constantin OE, Istrati DI. Extraction , Quantification and Characterization Techniques for Anthocyanin Compounds in Various Food Matrices — A Review. 2022;
34. Dalagnol, L. M. G., Dal Magro, L., Silveira, V. C. C., Rodrigues, E., Manfroí, V., & Rodrigues, R. C. (2017). Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring: A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds. *Food and Bioprocess Processing*, 105, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.009>

35. Demir, K.; Tezcan, E.E.; Kesik, S.; Ugur, H.; Yaman, M.; Catak, J. Riboflavin Cooking Losses and Bioaccessibility in Red Meats. *J. Culin. Sci. Technol.* 2023, 1–15.
36. Dogaru I.A., (2014), Research on the significance of PAH presence in different foods and the results of their detection (in Romanian). Dissertation - Transilvania University of Brasov, Romania
37. Dolatowski, Z.J.; Stadnik, J.; Stasiak, D. Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 2007, 6, 88–99.
38. Drosou, C.; Kyriakopoulou, K.; Bimpilas, A.; Tsimogiannis, D.; Krokida, M. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Ind. Crops Prod.* 2015, 75, 141–149
39. Dzah, C.S.; Duan, Y.; Zhang, H.; Wen, C.; Zhang, J. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. *Food Biosci.* 2020, 35, 100547.
40. Ellison, B.; Muth, M.K.; Golan, E. Opportunities and Challenges in Conducting Economic Research on Food Loss and Waste. *Appl. Econ. Perspect. Policy* 2019, 41, 1–19.
41. European Commission, (2006), Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (consolidated version). Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32006R1881>
42. Farhadian A., Jinap S., Faridah A., Sakar Z.I., (2010), Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21(5): 606-610
43. Fernández-Pachón, M.S.; Villaño, D.; García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Anal. Chim. Acta* 2004, 513, 113–118.
44. Ferraretto P, Cacciola V, Ferran Batllo I, Celotti E. Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Ital J Food Sci.* 2013;25:160–8.
45. Gambacorta, G., Trani, A., Punzi, R., Fasciano, C., Leo, R., Fracchiolla, G., & Faccia, M. (2017). Impact of ultrasounds on the extraction of polyphenols during winemaking of red grapes cultivars from southern Italy. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.07.029>
46. Hajhashemi, V.; Vaseghi, G.; Pourfarzam, M.; Abdollahi, A. Are antioxidants helpful for disease prevention? *Res. Pharm. Sci.* 2010, 5, 1–8.
47. Hasan, M.M.; Yun, H.-K.; Kwak, E.-J.; Baek, K.-H. Preparation of resveratrol-enriched grape juice from ultrasonication treated grape fruits. *Ultrason. Sonochem.* 2014, 21, 729–734.
48. Havlikova, L.; Mikova, K. Heat Stability of Anthocyanins. *Z. Leb. Forsch.* 1985, 181, 427–432.
49. Heinmaa, L.; Moor, U.; Pöldma, P.; Raudsepp, P.; Kidmose, U.; Lo Scalzo, R. Content of health-beneficial compounds and sensory properties of organic apple juice as affected by processing technology. *LWT—Food Sci. Technol.* 2017, 85(Part B), 372–379.
50. Huang, G.; Chen, S.; Dai, C.; Sun, L.; Sun, W.; Tang, Y.; Xiong, F.; He, R.; Ma, H. Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity. *Ultrason. Sonochem.* 2017, 37, 144–149.

51. Hussain M, Gantumur MA, Manzoor MF, Hussain K, Xu J, Aadil RM, Qayum A, Ahmad I, Zhong H, Guan R. Sustainable emerging high-intensity sonication processing to enhance the protein bioactivity and bioavailability: An updated review. *Ultrason Sonochem.* 2023 Jul; 97:106464.
52. Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011, 126, 1821–1835.
53. Inchingolo, R.; Cardenia, V.; Rodriguez-Estrada, M.T. The Effects of Microwave Heating on Edible Oils and Lipid-containing Food. *Lipid Technol.* 2013, 25, 59–61.
54. International Organisation of Vine and Wine. International Code of Oenological Practices, 2022, no. 2022 Issue. Paris, France. Available online: <https://www.oiv.int/public/medias/8672/code-2022-en.pdf> (accessed on 10 December 2022).
55. ISO 1442:2023; Meat and Meat Products. Determination of moisture content. Reference method. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2023.
56. ISO 6579-1:2017; Microbiology of the Food Chain. Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2017.
57. ISO 8968-4:2016; Milk and Milk Products. Determination of Nitrogen Content. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2016.
58. Jambrack, A.R., Šimunek, M., Petrovic, M., Bedic, H., Herceg, Z., & Juretic, H. (2017). Aromatic profile and sensory characterisation of ultrasound treated cranberry juice and nectar. *Ultrason. Sonochem.*, 38, 783–793.
59. Jamshaid, S.; Ahmed, D. Optimization of ultrasound-assisted extraction of valuable compounds from fruit of *Melia azedarach* with glycerol-choline chloride deep eutectic solvent. *Sustain. Chem. Pharm.* 2022, 29, 100827.
60. Kalita, D.; Jayanty, S.S. Comparison of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Colored Potato Tubers, Pomegranate and Blueberries. *J. Food Process Technol.* 2014, 5, 358–364.
61. Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresour. Technol.* 2001, 77, 215–227.
62. Kataoka, H. New trends in sample preparation for analysis of plant-derived medicines. *Curr. Org. Chem.* 2010, 14, 1698–1713.
63. Kumaran, A.; & Joel Karunakaran, R. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 97, 109–114.
64. Lassen, A.; Kall, M.; Hansen, K.; Ovesen, L. A Comparison of the Retention of Vitamins B1, B2 and B6, and Cooking Yield in Pork Loin with Conventional and Enhanced Meal-Service Systems. *Eur. Food Res. Technol.* 2002, 215, 194–199.
65. Lieu, L.N.; Le, V.V.M. Application of ultrasound in grape mash treatment in juice processing. *Ultrason. Sonochem.* 2010, 17, 273–279.

66. Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chemistry*, 208, 228–238. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.009>
67. Lukić K, Brnčić M, Ćurko N, Tomašević M, Valinger D, Denoya GI, Barba FJ, Ganić KK.. Effects of high power ultrasound treatments on the phenolic, chromatic and aroma composition of young and aged red wine. *Ultrason Sonochem.* 2019 Dec; 59:104725.
68. Lupu, M.; Puchianu, G.; Padureanu, V.; Canja, C.; Maier, A. The influence of ultrasound and pasteurisation on microbiological properties of grape juice. In *Proceedings of the 18th International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, Albena, Bulgaria, 30 June–9 July 2018*; pp. 7234–7728.
69. Maier A, Padureanu V, Lupu MI, Canja CM, Badarau C, Padureanu C, Alexa E, Poiana MA. Optimization of A Procedure to Improve the Extraction Rate of Biologically Active Compounds in Red Grape Must Using High-Power Ultrasound. *Sustainability (Switzerland)*. 2023 Apr 1;15(8).
70. Malak, N.M.L.; Abdel-Naeem, H.H.S.; Abdelsalam, A.A.; Ezzat, G.A. A Comparative Study Concerning the Sensory, Physicochemical, Bacteriological, Nutritional Quality, Heavy Metal Content, and Health Risk Assessment of Some Low-Cost Fish Species. *Food Control* 2025, 169, 111023.
71. Malinowska, E.; Tarczyńska, A.S.; Urbanowicz, A. Factors Determining the Quality of Catering Services in the Opinion of Consumers and Catering Staff. In *Quality Challenges*; Dziadkowiec Joanna, M., Niewczas-Dobrowolska, M., Eds.; WydawnictwoRys: Dałbrowka, Poland, 2022; pp. 171–197. ISBN 978-83-67287-33-3.
72. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727–747.
73. Mandal P.K., A.K. Biswas, K. Choi And U.K. Pal. Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *American Journal of Food Technology*, vol. 6 (2): 87-102 (2011).
74. Margean, A., Lupu, M. I., Alexa, E., Padureanu, V., Canja, C. M., Cocan, I., Negrea, M., Calefariu, G., & Poiana, M.-A. (2020). An overview of effects induced by pasteurization and high-power ultrasound treatment on the quality of red grape juice. *Molecules*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/molecules25071669>
75. Martín, J.; Kuskoski, E.M.; Navas, M.J.; Asuero, A.G. Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. In *Flavonoids—From Biosynthesis to Human Health*; Justino, G.C., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 205–255.
76. Martin, J.F.G.; Sun, D.W. Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends Food Sci. Technol.* 2013, 33, 40–53.
77. Martínez-Ramos, T.; Benedito-Fort, J.; Watson, N.J.; Ruiz-López, I.I.; Che-Galicia, G.; Corona-Jiménez, E. Effect of solvent composition and its interaction with ultrasonic energy on the ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Bioprod. Process.* 2020, 122, 41–54.
78. Mason TJ, Lorimer JP. *Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. 1st Editio. Wiley VCH; 2002.

79. Mason, T. J., & Lorimer, J. P. (2002). *Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing* (1st Editio). Wiley VCH,.
80. Mason, T.J.; Lorimer, J.P. *Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; pp. 15–43.
81. Misu, G.A.; Canja, C.M.; Lupu, M.; Matei, F. Advances and Drawbacks of Sous-Vide Technique—A Critical Review. *Foods* 2024,13, 2217.
82. Mogos, T.V. *Alimentația în bolile de Nutriție și Metabolism*; Editura Didactică și Pedagogică: București, Romania, 1997; Volume 1, ISBN 973-30-5888-2.
83. Mojzer, E.B.; Hrnčić, M.K.; Škerget, M.; Knez, Ž.; Bren, U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules* 2016, 21, 901.
84. Mol, S.; Ozurtan, S.; Cosansu, S. Determination of the Quality and Shelf Life of Sous Vide Packaged Bonito (*Sarda sarda*, Bloch, 1793) Stored at 4 and 12 C. *J. Food Qual.* 2011, 35, 137–143.
85. Molino A, Mehariya S, Di Sanzo G, Larocca V, Martino M, Leone GP, et al. Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization.* 2020 Feb;36:196–209.
86. Molino, A., Mehariya, S., Di Sanzo, G., Larocca, V., Martino, M., Leone, G. P., Marino, T., Chianese, S., Balducchi, R., & Musmarra, D. (2020). Recent developments in supercritical fluid extraction of bioactive compounds from microalgae: Role of key parameters, technological achievements and challenges. *Journal of CO2 Utilization*, 36, 196–209. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.11.014>
87. Morata, A. *Red Wine Technology*, 1st ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 210–248.
88. Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; p. 437.
89. Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C. Phenolic Compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*;
90. Moreno-Montoro, M.; Olalla-Herrera, M.; Gimenez-Martinez, R.; Navarro-Alarcon, M.; Rufian-Henares, J.A. Phenolic compounds and antioxidant activity of Spanish commercial grape juices. *J. Food Compos. Anal.* 2015, 38, 19–26.
91. Mukhtar K, Nabi BG, Arshad RN, Roobab U, Yaseen B, Ranjha MM, Aadil RM, Ibrahim SA. Potential impact of ultrasound, pulsed electric field, high-pressure processing and microfluidization against thermal treatments preservation regarding sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). *Ultrason Sonochem.* 2022 Nov;90:106194.
92. Mukhtar, K., Nabi, B. G., Arshad, R. N., Roobab, U., Yaseen, B., Ranjha, M. M. A. N., Aadil, R. M., & Ibrahim, S. A. (2022). Potential impact of ultrasound, pulsed electric field, high-pressure processing and microfluidization against thermal treatments preservation regarding sugarcane juice (*Saccharum officinarum*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 90, 106194. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106194>

93. Nadeem, M.; Ubaid, N.; Qureshi, M.T.; Munir, M.; Mehmood, A. Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrason.Sonochem.* 2018, 45, 1–6.
94. Naghiu A., Laslo R., Simedru D., Laslo C., (2012), The present of PAH's in meat products found on the Cluj-Napoca market. *Agricultura, agricultural practice and science journal*, 79(1-2):105-111
95. Nardini, M. (2022). Phenolic Compounds in Food: Characterization and Health Benefits. *Molecules*, 27(3), 783. <https://doi.org/10.3390/molecules27030783>
96. Natolino, A., & Celotti, E. (2022). Ultrasound treatment of red wine: Effect on polyphenols, mathematical modeling, and scale-up considerations. *Lwt*, 154, 112843. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112843>
97. Natolino, A.; Celotti, E. Ultrasound treatment of red wine: Effect on polyphenols, mathematical modeling, and scale-up considerations. *LWT* 2022, 154, 112843.
98. Natrella G, Noviello M, Trani A, Faccia M, Gambacorta G. The Effect of Ultrasound Treatment in Winemaking on the Volatile Compounds of Aglianico, Nero di Troia, and Primitivo Red Wines. *Foods*. 2023 Feb 1;12(3).
99. Negro, C.; Aprile, A.; Luvis, A.I.; De Bellis, L.; Miceli, A. Antioxidant activity and polyphenols characterization of four monovarietal grape pomaces from salento (Apulia, Italy). *Antioxidants* 2021, 10, 1406.
100. Nemati M, Hamidi A, Maleki Dizaj S, Javaherzadeh V, Lotfipour F. An Overview on Novel Microbial Determination Methods in Pharmaceutical and Food Quality Control. *Adv Pharm Bull.* 6(3):301-308 (2016 Sep).
101. Nemzer B, Kalita D, Yashin AY, Yashin YI. Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. *Beverages*. 2021 Dec 28;8(1):1.
102. Nemzer, B., Kalita, D., Yashin, A. Y., & Yashin, Y. I. (2021). Chemical Composition and Polyphenolic Compounds of Red Wines: Their Antioxidant Activities and Effects on Human Health—A Review. *Beverages*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.3390/beverages8010001>
103. Nguvava, J.P. Effects of Post Harvest Handling on Quality and Sensory Attributes of Sardines: A Case Study of Musoma District. Master's Thesis, Sokoine University of Agriculture, Morogoro, Tanzania, 2013.
104. Nguyen, L.; Gao, Z.; Anderson, J.L. Perception Shifts in Seafood Consumption in the United States. *Mar. Policy* 2023, 148, 105438.
105. Nguyen, L.; Gao, Z.; Anderson, J.L. Regulating Menu Information: What Do Consumers Care and Not Care about at Casual and Fine Dining Restaurants for Seafood Consumption? *Food Policy* 2022, 110, 102272.
106. Nicolas, J.J.; Richard-Forget, F.C.; Goupy, P.M.; Amiot, M.-J.; Aubert, S.Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple production, *Critical Reviews. Food Sci. Nutr.* 1994, 34, 109–157.
107. Nie, V.; Chen, D.; Ye, J.; Lu, Y.; Dai, Z. Optimization and kinetic modeling of ultrasonic-assisted extraction of fucoxanthin from edible brown algae *Sargassum fusiforme* using green solvents. *Ultrason. Sonochem.* 2021, 77, 105671

- 108.Noranizan M, Pean LF, Li JW, Aadil RM, Ahmad T, Rosli SZ, Yong YY, Kim DO. Impact of juice extraction method on the physicochemical, functional, and sensory properties of Sabah snake grass (*Clinacanthus nutans*) juice mix. *Int Food Res J.* 2020;27(5):835–45.
- 109.Noranizan, M. ;, Pean, L. F. ;, Li, J. W. ;, Aadil, R. M., Ahmad, T. ;, Rosli, S. Z. ;, Yong, Y. Y. ;, & Kim, D.- O. (2020). Impact of juice extraction method on the physicochemical, functional, and sensory properties of Sabah snake grass (*Clinacanthus nutans*) juice mix. *International Food Research Journal*, 27(5), 835–845.
- 110.Ntuli, R.G.; Saltman, Y.; Ponangi, R.; Jeffery, D.W.; Bindon, K.; Wilkinson, K.L. Impact of skin contact time, oak and tannin addition on the chemical composition, color stability and sensory profile of Merlot wines made from flash détente treatment. *FoodChem.* 2023, 405, 134849.
111. OIV (International organisation of vine and wine). (2021). *Compendium of international methods of wine and must analysis (Vol. 1)*. OIV - 35 Rue de Monceau, 75008 Paris.
- 112.OIV O. *Compendium of international methods of wine and must analysis*. International Organisation of Vine and Wine: Paris, France. 2009:154-96.
- 113.OIV. *Methods of analysis of wines and musts*. In *Compendium of international methods of wine and must analysis*; OIV: Paris, France, 2019; Volume 1, pp. 62–83, 366–368.
- 114.OIV. *World Wine Production Outlook—OIV First Estimates*. no. November. International Organisation of Vine and Wine, 2022; p. Available online: <https://www.oiv.int/public/medias/8553/en-oiv-2021-world-wine-production-first-estimates-to-update.pdf> (accessed on 14 January 2023).
- 115.Olabemiwo O.M., (2013), Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Grilled/Roasted Maize and Plantain Sold in Ogbomoso, Nigeria. *International Journal of Basic & Applied Sciences*, 13(3):87-93
- 116.Oyane, I.; Takeda, T.; Oda, Y.; Sakata, T.; Furuta, M.; Okitsu, K.; Maeda, Y.; Nishimura, R. Comparison between the effects of ultrasound and γ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Analyses of cell membrane permeability and DNA or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultrason. Sonochem.* 2009, 16, 532–536.
- 117.Palma, M.; Barroso, C.G. Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Anal. Chim. Acta* 2002, 458, 119–130.
- 118.Paniwnyk, L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrason. Sonochem.* 2017, 38, 794–806.
- 119.Patist A, Bates D. *Industrial Applications of High Power Ultrasonics*. In: *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing Food Engineering Series*. Springer, New York, NY; 2011. p. 599–616.
- 120.Patrinou George P., Wilhelm Ansorge, Phillip B. Danielson. *Molecular Diagnostics*, 3rd ed., Kindle Edition, pp. 21-30 (2016).
- 121.Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., Jurado, R., & Gómez-Plaza, E. (2021). Using high-power ultrasounds in red winemaking: Effect of operating conditions on wine physico-

- chemical and chromatic characteristics. LWT, 138. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110645>
122. Picouet, P.A.; Cofan-Carbo, S.; Vilaseca, H.; Carbone Ballbe, L.; Castells, P. Stability of Sous-Vide Cooked Salmon Loins Processed by High Pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2011, 12, 26–31
 123. Plaza EG, Jurado R, Iniesta JA, Bautista-Ortín AB. High power ultrasounds: A powerful, non-thermal and green technique for improving the phenolic extraction from grapes to must during red wine vinification. In *BIO Web of Conferences 2019* (Vol. 12, p. 02001). EDP Sciences.
 124. Ranjha MM, Amjad S, Ashraf S, Khawar L, Safdar MN, Jabbar S, Nadeem M, Mahmood S, Murtaza MA. Extraction of Polyphenols from Apple and Pomegranate Peels Employing Different Extraction Techniques for the Development of Functional Date Bars. *International Journal of Fruit Science*. 2020 Sep 21;20(sup3):S1201–21.
 125. Raza, M.L.; Hassan, S.T.; Jamil, S.; Fatima, W.; Fatima, M. Nutritional Interventions in Depression: The Role of Vitamin D and Omega-3 Fatty Acids in Neuropsychiatric Health. *Clin. Nutr.* 2025, 45, 270–280.
 126. Reche, C.; Rosselló, C.; Dalmau, E.; Eim, V.; Simal, S. Quantification of microstructural changes in artichoke by-products by image analysis after high-power ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds. *LWT* 2022, 171, 114127
 127. Rickman, J.C.; Barrett, D.M.; Bruhn, C.M. Nutritional Comparison of Fresh, Frozen and Canned Fruits and Vegetables. Part 1. Vitamins C and B and Phenolic Compounds. *J. Sci. Food Agric.* 2007, 87, 930–944.
 128. Rivero-Pérez, M.D.; Muñiz, P.; González-Sanjosé, M.L. Antioxidant Profile of Red Wines Evaluated by Total Antioxidant Capacity, Scavenger Activity, and Biomarkers of Oxidative Stress Methodologies. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 5476–5483.
 129. RM, Zeng XA, Wang MS, Liu ZW, Han Z, Zhang ZH, Hong J, Jabbar S. A A potential of ultrasound on minerals, micro-organisms, phenolic compounds and colouring pigments of grapefruit juice. *Int J Food Sci Technol.* 2015 May 22;50(5):1144–50.
 130. Roberts, J.; Walker, L.T.; Anderson, J.C. Assessment of Microwave Blanching as a Preparatory Tool for Home Freezing of Yellow Squash (*Cucurbita pepo*); Institute of Food Technologists Annual Meeting: Las Vegas, NV, USA, 2004; p. 67C-32.
 131. Rodrigues, M.; Rosa, A.; Almeida, A.; Martins, R.; Ribeiro, T.; Pintado, M.; Goncalves, R.F.S.; Pinheiro, A.C.; Fonseca, A.J.M.; Maia, M.R.G.; et al. Omega-3 Fatty Acids from Fish by-Products: Innovative Extraction and Application in Food and Feed. *Food Bioprod. Process.* 2024, 145, 32–41.
 132. Roldan, M.; Antequera, T.; Martin, A.; Mayoral, A.I.; Ruiz, J. Effect of Different Temperature–Time Combinations on Physicochemical, Microbiological, Textural and Structural Features of Sous-Vide Cooked Lamb Loins. *Meat Sci.* 2013, 93, 572–578.
 133. Roman, T.; Tonidandel, L.; Nicolini, G.; Bellantuono, E.; Barp, L.; Larcher, R.; Celotti, E. Evidence of the possible interaction between ultrasound and thiol precursors. *Foods* 2020, 9, 104.

- 134.Romero-Díez R, Matos M, Rodrigues L, Bronze MR, Rodríguez-Rojo S, Cocero MJ, Matias AA. Microwave and ultrasound pre-treatments to enhance anthocyanins extraction from different wine lees. *Food Chem.* 2019 Jan; 272:258–66.
- 135.Ronald G. Labbé, Santos García. *Guide to Foodborne Pathogens*, Second Edition, pp. 45-75 (2001).
- 136.Ross, C.F.; Hoyer, C., Jr.; Fernandez-Plotka, V.C. Influence of heating on the polyphenolic content and antioxidant activity of grape seed flour. *J. Food. Sci.* 2011, 76, 884–890.
- 137.Rotaru, G.; Sava, N.; Borda, D.; Stanciu, S. Food Quality and Safety Management Systems: A Brief Analysis of the Individual and Integrated Approaches. *Sci. Res. Agroaliment. Process. Technol.* 2005, XI, 229–236.
- 138.Salleh-Mack, S.Z.; Roberts, J.S. Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrason. Sonochem.* 2007, 14, 323–329.
- 139.Scanlon, N.L. *Catering Management*, 4th ed.; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2012; ISBN 1-118-09149-3.
- 140.Schmid, A.; Walther, B. Natural Vitamin D Content in Animal Products. *Adv. Nutr.* 2013, 4, 453–462.
- 141.Sebastia, C.; Soriano, J.M.; Iranzo, M.; Rico, H. Microbiological Quality of Sous Vide Cook-Chill Preserved Food at Different Shelf Life. *J. Food Process. Preserv.* 2010, 34, 964–974.
- 142.Setford PC, Jeffery DW, Grbin PR, Muhlack RA. Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science & Technology.* 2017 Nov 1;69:106-17.
- 143.Shaping The Future Of Food Safety, Together, Proceedings of the 2nd EFSA Scientific Conference, Milan, Italy, 14-16 October 2015, pp. 22-26.
- 144.Sharma, K.; Ko, E.Y.; Assefa, A.D.; Ha, S.; Nile, S.H.; Lee, E.T.; Park, S.W. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *J. Food Drug Anal.* 2015, 23, 243–252.
- 145.Simancas, R.O.; Díaz-Maroto, M.C.; Alañón Pardo, M.E.; Pérez Porras, P.; Bautista-Ortín, A.B.; Gómez-Plaza, E.; Pérez-Coello, M.S. Effect of power ultrasound treatment on free and glycosidically-bound volatile compounds and the sensorial profile of red wines. *Molecules* 2021, 26, 1193.
- 146.Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methodods in Enzymology* 299: 152-178
- 147.Spinelli, F.R.; Dutra, S.V.; Carnieli, G.; Leonardelli, S.; Drehmer, A.P.; Vanderlinde, R. Detection of addition of apple juice in purple grape juice. *Food Control* 2016, 69, 1–4.
- 148.SR ISO 1443:2008; Meat and Meat Products. Determination of total fat content. ASRO—Romanian Standards Association: Bucharest, Romania, 2008.
- 149.Sridhar A, Ponnuchamy M, Kumar PS, Kapoor A, Vo DVN, Prabhakar S. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environ Chem Lett.* 2021 Aug 17;19(4):3409–43.

- 150.Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Vo, D.-V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3409–3443. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01217-8> Stat-Ease Inc. (2020). DESIGN-EXPERT® VERSION 12 SOFTWARE TRIAL.
- 151.Stall W., Eisendrand G., (1988), Determination of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Nitrosamines. HPLC in Food Analysis, Academic Press, New York, USA Stat-Ease Inc. DESIGN-EXPERT® VERSION 12 SOFTWARE TRIAL. Minneapolis, MN 55413-2561; 2020.
- 152.Suárez-Jacobo, A.; Rüfer, C.E.; Gervilla, R.; Guamis, B.; Roig-Sagués, A.X.; Saldo, J. Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chem.* 2011, 127, 447–454.
- 153.Şaramet I., Rădulescu V., (2006), Bazele teoretice ale chimiei organice, Vol. I, Ed. Tehnoplast Company, Bucharest, Romania, 201-202
- 154.Tan, K.; Huang, L.; Tan, K.; Lim, L.; Peng, Y.; Cheong, K.L. Effects of Culinary Treatments on the Lipid Nutritional Quality of Fish and Shellfish. *Food Chem. X* 2023, 19, 100856.
- 155.Tan, K.; Lim, L.; Cheong, K.L. Effects of Food Processing on the Lipid Nutritional Quality of Commercially Important Fish and Shellfish. *Food Chem. X* 2023, 20, 101034
- 156.Tao S., Li X., Yang Y., Coveney R.M. Jr, Lu X., Chen H., Shen W., (2006), Dispersion modeling of Polycyclic aromatic Hydrocarbons from combustion of biomass and fossil fuels and production of coke in Tianjin. *Environ Sci Technol*, 40 (15):4586-4591.
- 157.Tao, Y.; Han, Y.; Liu, W.; Peng, L.; Wang, Y.; Kadam, S.; Show, P.L.; Ye, X. Parametric and phenomenological studies about ultrasound-enhanced biosorption of phenolics from fruit pomace extract by waste yeast. *Ultrason. Sonochem.* 2019, 52, 193–204.
- 158.Tarhon, M.C. (2006). Tehnologia fabricării oțetului. Galați, Editura Fundației Universitare Dunărea de Jos
- 159.Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 669–675.
- 160.Tibshirani, R.; Walther, G.; Hastie, T. Estimating the Number of Clusters in a Data Set via the Gap Statistic. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 2001, 63, 411–423.
- 161.Tiwari, B.K.; Patras, A.; Brunton, N.; Cullen, P.J.; Donnell, C.P.O. Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrason. Sonochem.* 2010, 17, 598–604.
- 162.Van Der Zee H, Huis In't Veld Jh. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. *J AOAC Int.* 80(4):934-40. Review (1997 Jul-Aug).
- 163.Van Der Zee H. Conventional methods for the detection and isolation of *Salmonella enteritidis*. *Int J Food Microbiol.* 21(1-2):41-6. Review (1994 jan).
- 164.Vaquero, M.J.R.; Alberto, M.R.; Nadra, M.C.M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007, 18, 93–101.
- 165.Vasyliiev, G.S.; Vorobyova, V.I.; Linyucheva, O.V. Evaluation of reducing ability and antioxidant activity of fruit pomace extracts by spectrophotometric and electrochemical methods. *J. Anal. Methods Chem.* 2020, 2020, 1–16.

- 166.Vatavali, K.; Karakosta, L.; Nathanailides, C.; Georgantelis, D.; Kontominas, M.G. Combined Effect of Chitosan and Oregano Essential Oil Dip on the Microbiological, Chemical, and Sensory Attributes of Red Porgy (*Pagrus pagrus*) Stored in Ice. *Food Bioprocess Technol.* 2013, 6, 3510–3521.
- 167.Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason.Sonochem.* 2001, 8, 303–313.
- 168.Wang, H., Guo, X., Hu, X., Li T., Fu, X., & Liu R. H. (2017). Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food Chem.*, 217, 773–781.
- 169.Webster, D. pH—principles and measurement. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed.; Caballero, B., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 2003; pp. 4501–4507.
- 170.Wen, C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Dzah, C.S.; Zandile, M.; Duan, Y.; Ma, H.; Luo, X. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash, crops—A review. *Ultrason. Sonochem.* 2018, 48, 538–549.
- 171.Xia, E.Q.; Deng, G.F.; Guo, Y.J.; Bin Li, H. Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 622–646.
- 172.Xu, F., Wang, B., Hong, C., Telebielaigen, S., Nsor-Atindana, J., Duan, Y., & Zhong, F. (2019). Optimization of spiral continuous flow-through pulse light sterilization for *Escherichia coli* in red grape juice by response surface methodology. *Food Control* 105, 8–12.
- 173.Xu, J., Yang, H., Zhang, C., & Liu, C. (2022). Optimised preparation and characterisation of lotus root starch oxidised with sodium hypochlorite (NaOCl) using response surface methodology. *Czech J. Food Sci.*, 40, 61–68
- 174.Yıkırmış S., Aksu F., Altunatmaz S. S., & Çöl B. G. (2021). Ultrasound processing of vinegar: Modelling the impact on bioactives and other quality factors. *Foods*, 10.
- 175.Yıkırmış, S. (2019). Optimization of Uruset Apple Vinegar Production Using Response Surface Methodology for the Enhanced Extraction of Bioactive Substances. *Foods*, 8.
- 176.Yıkırmış, S., Bozgeyik, E., & Şimşek, M. A. (2020). Ultrasound processing of verjuice (unripe grape juice) vinegar: effect on bioactive compounds, sensory properties, microbiological quality and anticarcinogenic activity. *J. Food Sci. Technol.*, 57, 3445–3456.
- 177.Ying, Z.; Han, X.; Li, J. Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chem.* 2011, 127, 1273–1279.
- 178.Yusoff IM, Mat Taher Z, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*. 2022;157(February):111268. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>
- 179.Yusoff, I. M., Mat Taher, Z., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157(February), 111268. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111268>

- 180.Yusoff, I.M.; Mat Taher, Z.; Rahmat, Z.; Chua, L.S. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Res. Int.* 2022, 157, 111268.
- 181.Zafra-Rojas, Q.Y.; Cruz-Cansino, N.; Ramírez-Moreno, E.; Delgado-Olivares, L.; Villanueva-Sánchez, J.; Alanís-García, E. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrason.Sonochem.* 2013, 20, 1283–1288.
- 182.Zainol, M.K.; Mohd Subri, I.; Zamri, A.I.; Mohd Zin, Z.; Fisal, A.; Mamat, H. Antioxidative properties and proximate analysis of spent coffee ground (SCG) extracted using ultrasonic-methanol assisted technique as a potential functional food ingredient. *FoodRes.* 2020, 4, 636–644.
- 183.Zhang QA, Zheng H, Lin J, Nie G, Fan X, García-Martín JF. The state-of-the-art research of the application of ultrasound to winemaking: A critical review. Vol. 95, *Ultrasonics Sonochemistry*. Elsevier B.V.; 2023.
- 184.Zhang, L.; Fan, G.; Khan, M.A.; Yan, Z.; Beta, T. Ultrasonic-assisted enzymatic extraction and identification of anthocyanin components from mulberry wine residues. *Food Chem.* 2020, 323, 126714.
- 185.Zhang, Q. A., Zheng, H., Lin, J., Nie, G., Fan, X., & García-Martín, J. F. (2023). The state-of-the-art research of the application of ultrasound to winemaking: A critical review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 95). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106384>
- 186.Zhang, Q., & Wang, T. (2017a). Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chemistry*, 234, 372–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.022>
- 187.Zhang, Q., & Wang, T. (2017b). Effect of ultrasound irradiation on the evolution of Effect of ultrasoun irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chemistry*, 234, 372–380.
- 188.Zhang, Q.; Shen, Y.; Fan, X.H.; Martin, J.F.G. Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA J. Food* 2015, 14, 55–64.
- 189.Zhang, Q.; Wang, T. Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chem.* 2017, 234, 372–380.
- 190.Zhang, X., Zuo, Z., Yu, P., Li, T., Guang, M., Chen, Z., & Wang, L. (2021). Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade Pickering stabilizer prepared by ultrasonication: Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties. *Food Chem.*, 343, 128545.
- 191.Zhang, X.; Zuo, Z.; Yu, P.; Li, T.; Guang, M.; Chen, Z.; Wang, L. Rice peptide nanoparticle as a bifunctional food-grade Pickering stabilizer prepared by ultrasonication: Structural characteristics, antioxidant activity, and emulsifying properties. *Food Chem.* 2021, 343, 128545.
- 192.Zhang, Y.; Li, Q.; Li, D.; Liu, X.; Luo, Y. Changes in the Microbial Communities of Air-Packaged and Vacuum-Packaged Common Carp (*Cyprinus carpio*) Stored at 4 °C. *Food Microbiol.* 2015, 52, 197–204.

- 193.Zhang, Y.; Zhuang, P.; Mao, L.; Chen, X.; Wang, J.; Cheng, L.; Ding, G.; Jiao, J. Current Level of Fish and Omega-3 Fatty Acid Intakes and Risk of Type 2 Diabetes in China. *J. Nutr. Biochem.* 2019, 74, 108249.
- 194.Zhou, Y.; He, A.; Xu, B. Natural Resources, Quantification, Microbial Bioconversion, and Bioactivities of Vitamin B12 for Vegetarian Diet. *Food Chem.* 2025, 463, 140849.
195. Zia S, Khan MR, Shabbir MA, Aslam Maan A, Khan MK, Nadeem M, Khalil AA, Din A, Aadil RM. An Inclusive Overview of Advanced Thermal and Nonthermal Extraction Techniques for Bioactive Compounds in Food and Food-related Matrices. *Food Reviews International.* 2022 Aug 18;38(6):1166–96.