
TEZĂ DE DOCTORAT

Cercetări biotehnologice privind diversificarea profilului cidrului de mere

(REZUMATUL TEZEI DOCTORALE)

Doctorand **Paul Cristian Călugăr**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Elena Mudura**



REZUMAT

Cidrul de mere este definit ca fiind băutura alcoolică cu un conținut de alcool cuprins între 1,2% și 8,5%, obținută prin fermentarea parțială sau completă a sucului de mere. În producția de cidru, pe lângă procesul de fermentație alcoolică, poate fi implicată și fermentația malolactică, datorită activității bacteriilor lactice. Aceste culturi microbiologice (drojdii și bacterii lactice) joacă un rol crucial în fermentarea băuturilor din fructe prin producerea compușilor de aromă.

Producția globală de cidru este în continuă creștere, cu o mică scădere după 2020 și o revenire în 2022. Cele mai importante zone de consum de cidru la nivel mondial sunt Europa de Vest (48,1%), Africa (19,1%), America de Nord (9,7%) și Europa de Est (8,6%). Cele mai recente date plasează România pe locul 3 în topul piețelor mici de cidru, cu un consum anual de 165 mii hl.

Cidrul este consumat din diverse motive. Unii consumatori preferă gustul răcoritor, care poate varia de la dulce la sec, în funcție de tipul de mere folosite și de procesul de fermentație. Alții apreciază conținutul său mai mic de alcool în comparație cu multe alte băuturi alcoolice, ceea ce îl face o opțiune potrivită în cadrul diverselor întâlniri, pentru consumul ocazional sau pentru a fi servit ca o alternativă la bere și vin. În plus, cidrul este adesea asociat cu tradiția și meșteșugul, în special în regiunile cu o istorie puternică în ceea ce privește fabricarea cidrului, cum ar fi Anglia, Franța și unele părți ale Statelor Unite.

Varietatea de mere, procesul de fermentare și tulpinile de drojdie influențează în mod semnificativ compoziția chimică a cidrului de mere. Compușii volatili sunt esențiali pentru calitatea cidrului și influențează direct caracteristicile senzoriale și deciziile de cumpărare ale consumatorilor. Esterii, formați prin reacția alcoolilor superiori cu acizii, contribuie la parfumul și tipicitatea cidrului, chiar și în cantități mici, conferind arome fructate (măr verde, măr galben, căpșuni, banana) și arome de caramel. Compușii fenolici sunt, de asemenea, esențiali pentru calitatea cidrului, influențând culoarea, astringența și gustul amar al acestuia, iar echilibrul lor definește profilul general al băuturii. Un alt grup de compuși care afectează aroma cidrului este format din acizi organici, care contribuie în mod constant la gustul acru. Acești acizi joacă un rol crucial în determinarea acidității, gustului amar și astringenței cidrului. Compoziția lor se modifică în timpul fermentației, sau pot duce la formarea altor compuși.

Recent, cercetătorii care s-au concentrat pe identificarea și selectarea tulpinilor de drojdie cu caracteristici ideale pentru producția de cidru au obținut rezultate încurajatoare. *Saccharomyces cerevisiae* și *Saccharomyces bayanus* sunt recomandate drept culturi starter pentru fabricarea cidrului. În plus, diverse specii de drojdii non-*Saccharomyces* au fost recunoscute pentru efectele lor benefice asupra proprietăților senzoriale, cum ar fi creșterea complexității aromelor și a compușilor volatili atât în cofermentații, cât și în culturi pure.

Scopul și obiectivele principale ale acestei teze de doctorat au fost:

Teza a avut ca scop optimizarea proceselor de fermentație alcoolică și malolactică prin obținerea de sortimente de cidru din soiuri locale de mere. De asemenea, având în vedere varietatea de drojdii și bacterii lactice implicate în procesele de fermentare, au fost utilizate atât drojdii *Saccharomyces*, cât și drojdii non-*Saccharomyces*, dar și bacterii lactice, în monoculturi și co-culturi. Aspectul inovator al prezentului studiu constă atât în concepția sa, cât și în metodele de cercetare utilizate. Astfel, au fost identificate profilurile zaharurilor, polifenolilor, compușilor volatili, acizilor organici și aminoacizilor din suc de mere și a fost urmărită trasabilitatea acestora în timpul fermentației alcoolice și malolactice. În timpul fermentației malolactice, a fost monitorizată, de asemenea, influența nutrienților asupra compoziției chimice a cidrului și a caracteristicilor senzoriale.

Având în vedere aceste aspecte, studiul de față a implicat o analiză complexă a probelor de cidru obținute, pentru a identifica și cuantifica compușii chimici de interes, precum și o analiză senzorială efectuată de un grup de experți instruiți, pentru a corela compoziția chimică cu profilul senzorial.

Pentru atingerea scopului acestei teze, au fost investigate următoarele aspecte, concretizate în patru obiective:

0.1. Influența co-inoculării drojdiilor *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* asupra compoziției chimice a cidrului

0.2. Studiul impactului adaosului de nutrienți asupra eficienței fermentației malolactice

0.3. Îmbunătățirea dinamicii fermentației și reducerea timpului operațional al procesului prin sinergia dintre drojdii și bacterii lactice

0.4. Evaluarea cidrului spumant obținut prin metoda tradițională cu ajutorul drojdiilor încapsulate

Activitatea preliminară pentru atingerea obiectivelor a fost selectarea soiurilor de mere a căror compoziție chimică este potrivită pentru producția de cidru. De asemenea, a fost selectată o gamă largă de drojdii (șapte tulpini de drojdii *Saccharomyces* și non-*Saccharomyces* de la diferiți producători) și bacterii lactice (două tulpini de *O. oeni* și una de *L. plantarum*). În conformitate cu studiile actuale, dar și cu scopul de a inova, a fost definit planul de lucru, prin stabilirea compatibilității dintre microorganisme, stabilirea condițiilor de fermentare, monitorizarea proceselor de fermentare și efectuarea de analize fizico-chimice și senzoriale.

Rezultatele acestei teze au fost publicate într-un articol de tip review (revistă indexată ISI cu IF 3,5 - în Jurnalul *Processes*) și trei articole original research (unul într-o revistă indexată ISI cu IF 5,2 - în Jurnalul *Food Bioscience*; două articole într-o revistă indexată ISI cu IF 3,7 - în Jurnalul *Agronomy*).

Studiile și experimentele descrise în această teză au fost realizate în cadrul Facultății de Știința și Tehnologia Alimentelor din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară din Cluj-Napoca, în cadrul Facultății de Farmacie a Universității de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” și în cadrul Facultății de Chimie și Inginerie Chimică a Universității Babeș-Bolyai, sub coordonarea doamnei prof. dr. Elena Mudura și sub supravegherea și îndrumarea coautorilor enumerați în publicații.

Teza de doctorat este structurată în două părți principale: Stadiul actual al cunoașterii care conține un articol review a literaturii de specialitate (Capitolul 1) și cercetarea originală care conține ipoteza de lucru/obiectivele (Capitolul 2) și metodologiile generale (Capitolul 3), urmate de articolele de cercetare proprii (Capitolele 4-6), concluzii generale și recomandări (Capitolul 7), respectiv originalitatea și contribuțiile inovatoare ale tezei (Capitolul 8).

În ceea ce privește **prima parte** (articolul review al literaturii), studiul a fost realizat prin consultarea publicațiilor în platforme precum PubMed, Web of Science Core Collection, Scopus și Google Scholar. În urma analizei bibliografice prezentate în capitolul privind stadiul actual al cunoașterii în domeniul screening-ului calității cidrului, s-a constatat că principalele clase de compuși care influențează calitatea cidrului și profilul senzorial sunt: polifenolii, compușii volatili, acizii organici și zaharurile.

În ceea ce privește **partea a doua**, experimentele au inclus procese complexe de fermentație alcoolică, fermentație malolactică și fermentație secundară, toate desfășurate în condiții controlate. Condițiile de fermentare și de inoculare a drojdiilor și a bacteriilor lactice au fost stabilite și optimizate în conformitate cu literatura de specialitate. Materia primă (suc de mere) a fost oferită de către un producător local din Cluj-Napoca, care dispune de toate echipamentele moderne pentru prelucrarea fructelor în vederea obținerii sucului. Drojdiile și nutrienții utilizați în experimentele din capitolul 4 au fost achiziționate din fondurile universității, iar drojdiile și bacteriile lactice utilizate în capitolele 5 și 6 au fost furnizate de Bevitech (România) și Chr. Hansen (România). Analizele și determinările au fost efectuate în triplicat, pentru fiecare studiu și analiză.

Pentru a identifica compușii fenolici, probele de cidru au fost filtrate printr-un filtru de nailon Chromafil Xtra de 0,45 μm, iar 20 μL au fost injectați în sistemul HPLC și s-a comparat timpul de retenție, absorbția UV-Vis și spectrele de masă cu cele ale compușilor standard și cu datele din literatura de specialitate. Pentru compușii volatili, în procedura de extracție s-a utilizat extracția cu ultrasunete în locul agitatorului magnetic. Separarea și identificarea compușilor volatili au fost realizate prin analiză gaz-cromatografică. Aminoacizii (AA) extrași din 100 μL de probă au fost analizați prin gaz-cromatografie cu ajutorul kitului Phenomenex EZ: Faast™. Manipularea și prelucrarea datelor au fost realizate cu ajutorul software-ului Empower 2 (Walters, Milford, MA, SUA). Pentru separarea și cuantificarea zaharurilor, a acizilor lactic și acetic, s-a utilizat sistemul HPLC Agilent 1200, echipat cu o pompă cuaternară, degazor de solvent, injector manual cuplat cu un detector de indice de refracție (RID). Pentru determinarea acizilor malic, piruvic, succinic și citric, s-a folosit un sistem HPLC Agilent 1200 echipat cu o

pompă cuaternară, degazare a solventului, injector manual și detector UV-Vis (VWD). Compușii au fost identificați prin compararea timpilor de retenție ai standardelor cu cei ai picurilor din probele de suc și cidru de mere.

Analizele statistice au fost efectuate cu ajutorul programului SPSS 19.0 (IBM, New York, NY, SUA) și a testului Tukey (HSD) cu un interval de încredere de 95%. Corelația Pearson a fost calculată pentru toate datele (Excel, Microsoft 365). Analiza componentelor principale (PCA) și analiza Heat Maps (HMA) au fost efectuate pentru a observa corelația dintre probe și compușii identificați (zaharuri, acizi organici, polifenoli, aminoacizi, substanțe volatile și atribute senzoriale) cu ajutorul Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, SUA) și XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, 414 SUA).

Analiza senzorială a fost efectuată în cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca, laboratorul de analiză senzorială a alimentelor. Participanții instruiți au avut vârste cuprinse între 26 și 47 de ani. Printre membrii s-au numărat două persoane care lucrează în controlul calității băuturilor alcoolice și un somelier. Criteriul de selecție minim 2 ani de experiență în analiza senzorială a băuturilor. Analiza senzorială a respectat normele etice ale laboratorului.

Capitolul 4 prezintă evaluarea fizico-chimică și senzorială a varietăților de cidru obținute prin fermentație cu o singură tulpină de drojdie, cofermentare și fermentație malolactică (cu sau fără adaos de nutrienți). Fermentația malolactică a prezentat un rol benefic în ceea ce privește profilul senzorial în obținerea cidrului și, de asemenea, cofermentarea între drojdiile *Saccharomyces* și *Torulaspora* poate duce la formarea unui profil volatil specific.

Capitolul 5 prezintă eficiența fermentației malolactice, în tandem cu fermentația alcoolică, ceea ce reprezintă un mare avantaj din punct de vedere economic, reducând astfel durata proceselor tehnologice de fermentare. De asemenea, a fost studiată eficiența cofermentării drojdiei *Saccharomyces* cu drojdia *Pichia*, aceasta din urmă fiind recent mai mult studiată și recunoscută pentru avantajele pe care le oferă băuturilor fermentate.

Capitolul 6 prezintă avantajele utilizării drojdiei încapsulate în producția de cidru spumant prin metoda tradițională, atât din punct de vedere tehnologic, cât și din punct de vedere al caracteristicilor fizico-chimice și senzoriale ale produsului. Fermentația secundară și producerea cidrului spumant au ca rezultat formarea sau degradarea unor compuși. Acești compuși sunt strâns legați de compoziția chimică a sucului de mere, respectiv a cidrului de bază, dar studiul a arătat că fermentația secundară a dus la o creștere semnificativă a polifenolilor, dar, în schimb, cantitatea de esteri a scăzut.

Concluziile generale au fost următoarele:

1. Perspective tehnologice:
 - Pentru a obține arome echilibrate pentru cidru, este esențial să se înțeleagă compoziția și aroma diversificată a soiurilor autohtone de mere. Amestecul sucului de mere obținut din diferite soiuri, împreună

cu optimizarea tehnologică și selecția microorganismelor reprezintă cheia pentru a produce băuturi naturale de înaltă calitate.

- Fermentația alcoolică concomitent cu fermentația malolactică, sub acțiunea drojdiei *Saccharomyces* și a LAB *L. plantarum* și *O. oeni* au ca efect tehnologic reducerea timpului de fermentare și au facilitat formarea acidului lactic, ceea ce a dus la creșterea complexității profilului senzorial.
- Utilizarea drojdiilor încapsulate în producția de cidru spumant prezintă numeroase avantaje tehnologice: densitate celulară ridicată, îmbunătățirea randamentului produsului, reducerea riscului de contaminare microbiană, un control tehnologic mai bun și o mai bună reproductibilitate a proceselor, o separare mai ușoară a biomasei și potențiale reduceri de costuri.

2. Perspective privind profilul senzorial:

- Fermentația malolactică sub acțiunea *O. oeni* a facilitat creșterea acidului lactic, în unele cazuri chiar de trei ori mai mare (de la 2,27 g/L în AF3 la 6,96 în MF3A și 7,15 g/L în MF3B), având un impact semnificativ asupra caracteristicilor senzoriale.
- Cidrul obținut prin co-culturi cu *T. delbrueckii* și *S. cerevisiae* a înregistrat concentrații semnificativ mai mari de compuși volatili și, în plus, aroma de măr a fost percepută cel mai intens în aceste probe.
- Conținutul de esteri a crescut în urma fermentației alcoolice, atât în cazul utilizării unei singure tulpini, cât și în cazul cofermentării, comparativ cu suc de mere și, chiar și în concentrație scăzută, aceștia oferă note fructate, florale și de caramel în cidru.
- Cidrul de mere obținut prin cofermentarea cu *Pichia* și *Saccharomyces* s-a remarcat prin gustul său dulce, aroma puternică de măr și notele fructate, datorită avantajului drojdiei *Pichia* de a crește varietatea de esteri.
- Cidrul fermentat cu o singură tulpină *S. cerevisiae*, obținut din suc de mere „Topaz” și „Red topaz”, a avut cea mai mare cantitate de compuși fenolici (522,99 mg/L) și a fost caracterizat printr-un gust amar puternic.
- Obținerea cidrului folosind diferite tipuri de drojdii și bacterii lactice în co-fermentații are ca rezultat un profil senzorial îmbunătățit, formând compuși care contribuie la complexitatea aromei și a gustului.

3. Îmbunătățirea profilului bioactiv:

- La sfârșitul fermentației secundare a cidrului spumant, cantitatea de polifenoli a fost mai mare în toate probele în comparație cu cidrul de bază. Mai mult, la una dintre probe, aceasta s-a dublat. Pe lângă calitățile organoleptice pe care le conferă, polifenolii ar putea contribui la îmbunătățirea profilului bioactiv, datorită proprietăților antioxidante, antiinflamatorii și de eliminare a radicalilor liberi.

- Clasele de polifenoli cunoscute pentru efectele lor antiinflamatorii și antiplachetare puternice, alături de cele antioxidante și de chelare a metalelor, sunt acidul benzoic și acizii hidroxicinamici, care contribuie, de asemenea, la aroma cidrului, iar procianidinele sunt responsabile de gustul amar și astringența sucurilor de mere și a cidrului.

Perspective:

1. Pot fi efectuate analize suplimentare pentru a observa influența depozitării cidrului asupra compușilor chimici sau pentru a identifica și studia alți compuși cu efect asupra gustului și aromei cidrului.

2. Studiile viitoare pot investiga multe alte numeroase levuri *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces* și bacterii lactice, luând în considerare mai multe variante de coinoculare sau diferite condiții de fermentare, deoarece fiecare dintre acești factori are un impact asupra profilului senzorial și a conținutului fizico-chimic al cidrului.

3. Studiile care utilizează drojdii încapsulate pot include alte metode, mai eficiente din punct de vedere economic, de obținere a cidrului spumant, precum și obținerea cidrului cu zahăr rezidual.

4. Cercetările viitoare ar putea investiga mai multe specii locale de soiuri de mere pentru obținerea cidrului, ceea ce ar ajuta atât producătorii de cidru, cât și cultivatorii de mere.

Originalitate și contribuții personale

Rezultatele prezentate în această teză pot fi considerate utile pentru comunitatea științifică din domeniul alimentar și al biotehnologiei. Studiile prezentate pot fi considerate cuprinzătoare în ceea ce privește valorificarea merelor în industria băuturilor fermentate prin procese biotehnologice cu scopul final de a fi integrate în producția de cidru la scară largă.

Prin identificarea și utilizarea culturilor selecționate de drojdii și bacterii lactice (monoculturi și co-culturi) în vederea obținerii băuturilor din mere fermentate, pot crește caracteristicile de aromă și gust. Culturile selecționate reprezintă o posibilitate de a crea un amestec de fermentație specific pentru a obține compuși țintă (esteri, alcooli superiori, acizi) care să contribuie la aplicații viitoare. De asemenea, această teză reprezintă un raport cuprinzător legat de analiza sucului de mere și a cidrului înainte și după procesele de fermentare și maturare.

Abordarea inovatoare a prezentului studiu constă atât în designul, cât și în metodele aplicate în cercetare. Au fost utilizate sucuri de mere obținute din 3 soiuri cultivate local, iar variabilitatea drojdiilor, bacteriilor lactice, prezența sau absența nutrienților a condus la un studiu complex. Compararea cidrului obținut atât prin fermentație cu o singură tulpină, cât și prin cofermentare, impactul fermentației malolactice și al fermentației secundare a condus la o mai bună înțelegere a proceselor biochimice și a trasabilității compușilor biochimici de interes.

Au fost cercetați biocompuși care au cea mai mare influență asupra calității cidrului, conform literaturii de specialitate analizate (zaharuri, acizi organici, polifenoli,

compuși volatili și aminoacizi), iar rezultatele pot fi de interes atât pentru comunitatea științifică, cât și pentru inginerii și tehnologii din industria băuturilor alcoolice, având în vedere impactul acestor compuși asupra calității produsului finit.

Propunerea de obținere a cidrului din punct de vedere al variabilității microorganismelor utilizate este un aspect original care nu a fost observat în studiile anterioare.