

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

GIULIANE SVIERCOSKI

OBTENÇÃO DE EXTRATO NITROGENADO A PARTIR DE BIOMASSA
RESIDUAL DE LEVEDURA UTILIZANDO ULTRASSOM PARA USO EM
PROCESSOS FERMENTATIVOS

PONTA GROSSA
2019

GIULIANE SVIERCOSKI

OBTENÇÃO DE EXTRATO NITROGENADO A PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL
DE LEVEDURA UTILIZANDO ULTRASSOM PARA USO EM PROCESSOS
FERMENTATIVOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pertencente ao Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Alberti

PONTA GROSSA

2019

S969 Sviercoski, Giuliane
Obtenção de extrato nitrogenado a partir de biomassa residual de levedura utilizando ultrassom para uso em processos fermentativos / Giuliane Sviercoski. Ponta Grossa, 2019.
94 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Alberti.

1. Borra de levedura. 2. Saccharomyces. 3. Sidra. 4. Resíduo. 5. Box-behnken. I. Alberti, Aline. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 641

TERMO DE APROVAÇÃO

GIULIANE SVIERCOSKI



OBTENÇÃO DE EXTRATO NITROGENADO A PARTIR DE BIOMASSA RESIDUAL DE LEVEDURA UTILIZANDO ULTRASSOM PARA USO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Prof.ª. Dr.ª. Aline Alberti - UEPG - PR

Prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski - UFSC - SC

Prof. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG - PR

Ponta Grossa, 12 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A toda a minha família, especialmente meu pais, José Celso Sviercoski e Dalila Sviercoski, pelo apoio, amor e carinho a mim concedidos;

Ao Eduardo Rauta por me apoiar e me ajudar durante todo esse projeto;

À minha professora orientadora Dr.^a Aline Alberti, por toda paciência, apoio e conhecimentos transmitidos e sobretudo, por sua amizade;

Ao professor Dr. Alessandro Nogueira por todos os anos que contribuiu com seus conhecimentos, e pelo apoio e sugestões que auxiliaram na concretização deste trabalho;

À Amanda Alves Prestes e Rafaela Gomes da Silva pela amizade, companheirismo e auxílio durante todo este percurso;

À Isabela Sola, estagiária de iniciação científica, que me auxiliou nas análises;
À Denise Mendes, pela a sua ajuda em muitos momentos;

Aos colegas do Grupo de Trabalho sobre Maçãs (GTM) e da Escola Tecnológica de Leite e Queijos dos Campos Gerais (ETLQueijos), pelo apoio e incentivo;

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela infraestrutura;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

RESUMO

A biomassa de levedura é um subproduto gerado nas cervejarias em grandes quantidades. A utilização deste subproduto é pequena sendo empregada principalmente na alimentação de animais. A borra de levedura apresenta elevado teor de proteína podendo ser utilizada como fonte de nutrientes de baixo custo em processos biotecnológicos. O objetivo deste trabalho foi obter um extrato rico em compostos nitrogenados de levedura de cervejaria por meio da otimização através do tratamento com dispositivo ultrassônico e aplicá-lo em processos fermentativos. Nos ensaios de extração foram avaliados os efeitos da amplitude de onda do dispositivo ultrassônico, razão levedura/água e tempo de extração no rendimento de nitrogênio dos extratos. Através da metodologia de superfície de resposta e a função de desejabilidade definiu-se o melhor tratamento sendo este o tempo de extração de 30 minutos, razão levedura/água 55:45, e amplitude de onda do dispositivo ultrassônico de 70%. O extrato obtido nas condições ótimas de extração foi liofilizado para melhor praticidade no seu uso, sendo posteriormente avaliado na fermentação alcoólica de mosto contendo água e glicose (120g/L), mosto artificial e natural de maçã. Neste último, foram inoculadas três diferentes cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Bouquet, Aromatic, Reims Champagne) isoladamente. O processo fermentativo foi monitorado por meio da cinética através da liberação de gás carbônico e amostragens foram retiradas após 1, 3, 6, 10 e 15 dias de fermentação para contagem de células e análises físico-químicas. De um modo geral, a adição do extrato resultou em um aumento da eficiência de fermentação, atingindo uma maior velocidade de fermentação nos primeiros dias, além de maior liberação de gás carbônico comparado as amostras controle, as quais não foram adicionadas de extrato. Também é possível observar que quanto maior foi a adição de extrato maior foi a eficiência na cinética de fermentação. As sidras fermentadas com as diferentes leveduras foram avaliadas sensorialmente quanto a sua qualidade de odor, intensidade de odor e qualidade da bebida e foi verificada que não houve alteração nas características sensoriais da bebida, sendo a qualidade da bebida não prejudicada.

Palavras chave: Borra de Levedura. *Saccharomyces*. Sidra. Resíduo. Box-Behnken.

ABSTRACT

Yeast sludge is a byproduct generated in breweries in large quantities. The use of this by-product is small and is mainly used in animal feed. Yeast sludge has a high protein content and can be used as a source of low cost nutrients in biotechnological processes. The objective of this work was to obtain an extract rich in nitrogenous compounds of brewery yeast by optimizing through treatment with ultrasonic device and applying it in fermentative processes. In the extraction tests, the effects of ultrasonic wave amplitude, yeast / water ratio and extraction time on the nitrogen yield of the extracts were evaluated. Through the response surface methodology and the desirability function, the best treatment was defined as the extraction time 30 minutes, yeast / water ratio 55:45, and ultrasonic device wave amplitude of 70%. The extract obtained in the optimum extraction conditions was lyophilized for better practicality in its use. It was subsequently used in the alcoholic fermentation of water and glucose (120g / L), artificial and natural apple must. In the latter, three different strains of *Saccharomyces cerevisiae* (Bouquet, Aromatic, Reims Champagne) were isolated. The fermentation process was monitored by kinetics through the release of carbon dioxide, samples were taken after 1, 3, 6, 10, and 15 days of fermentation for cell counting and physicochemical analysis. In general, the addition of the extract resulted in an increase in the fermentation efficiency, reaching a higher fermentation speed in the first days, and a higher carbon dioxide release compared to the control samples, which were not added to the extract. It is also possible to observe that the higher the extract addition, the greater the efficiency in the fermentation kinetics. The ciders fermented with the different yeasts were sensorially evaluated for their odor quality, odor intensity and drink quality and it was verified that there was no alteration in the sensory characteristics of the drink, being the quality of the drink not harmed.

Keywords: Yeast Blur. *Saccharomyces*. Cider. Residue. Box-Behnken.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Colapso de bolha de cavitação	25
Figura 1.2- Sistemas ultrassônicos comumente utilizados	26
Figura 1.3- Via metabólica de Ehrlich	33
Figura 2.1- Dispositivo ultrassônico	38
Figura 2.2- Superfície de resposta das variáveis independentes da extração de compostos nitrogenados.....	45
Figura 2.3- Fluxograma do processo de extração de nitrogênio em borra de levedura de cervejaria	46
Figura 2.4- Extrato de levedura liofilizada	47
Figura 2.5- Micrografia de MEV da borra de levedura antes do tratamento com o dispositivo ultrassônico e após o tratamento com o dispositivo ultrassônico	48
Figura 3.1- Fermentadores de bancada com mosto de glicose 120g/L. a) Fermentadores de bancada com sistema de batoque; b) Foto do experimento do mosto de glicose 120g/L	54
Figura 3.2- Fermentadores de bancada com mosto artificial de maçã. a) Fermentadores de bancada com sistema de batoque; b) Foto do experimento do mosto artificial de maçã	55
Figura 3.3- Fermentadores de bancada com mosto sintético de maçã adicionado de extrato com diferentes concentrações de nitrogênio (50, 100 e 150 mg/L)	56
Figura 3.4- Fermentadores de bancada na ausência e presença de extrato nitrogenado para fermentação de sidra utilizando três diferentes cepas de levedura	57
Figura 3.5- Fermentador de bancada com sistema de batoque.....	58
Figura 3.6- Liberação de gás carbônico do mosto sintético de maçã com adição do extrato nitrogenado nas concentrações de 50,100 e 150 mg/L.....	67
Figura 3.7- Liberação de gás carbônico e consumo de nitrogênio de sidras produzidas de diferentes cepas de leveduras na presença e ausência de extrato	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1- Principais aplicações da biomassa de levedura residual de cervejaria.....	22
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1- Composição da levedura após a fermentação alcoólica da cerveja.....	21
Tabela 2.1- Planejamento experimental com os valores reais e codificados.....	39
Tabela 2.2- Teor de nitrogênio total Kjeldahl dos extratos nitrogenados, obtidos a partir da borra de levedura, dos 15 experimentos de extração conforme determinado pelo planejamento Box Behnken.....	42
Tabela 3.1- Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto de glicose 120g/L (18 dias de fermentação)	62
Tabela 3.2- Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto sintético de maçã (18 dias de fermentação)	65
Tabela 3.3- Valores referentes aos parâmetros cinéticos de fermentação do mosto sintético adicionado de extrato com 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio....	68
Tabela 3.4- Parâmetros físico-químicos do mosto sintético de maçã adicionado de extrato com concentração de 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio (15 dias de fermentação)	69
Tabela 3.5- Valores referentes aos parâmetros cinéticos de fermentação das sidras na ausência e presença de extrato (100 mg/L de nitrogênio), utilizando 3 diferentes cepas de leveduras	73
Tabela 3.6- Valores referentes as análises físico-químicas das sidras na ausência e presença de extrato nitrogenado (15 dias de fermentação)	74
Tabela 3.7- Análise sensorial de sidras com diferentes cepas de levedura	77

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS.....	11
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1 LEVEDURA.....	13
1.1.1 Morfologia e estrutura das leveduras	13
1.1.2 Reprodução das leveduras	14
1.1.3 Fisiologia das leveduras.....	15
1.1.4 Metabolismo fermentativo da <i>Saccharomyces</i> sp	16
1.1.5 Importância do nitrogênio no processo fermentativo	17
1.2 BIOMASSA DE LEVEDURA CERVEJEIRA	17
1.2.1 Processamento de cerveja.....	18
1.2.2 Subprodutos da indústria cervejeira	20
1.1.3 Composição da borra de levedura	21
1.1.4 Possíveis aplicações da borra.....	21
1.3 AUTÓLISE DA LEVEDURA	22
1.3.1 Métodos para promover a autólise celular	23
1.3.1.1 <i>Temperatura</i>	23
1.3.1.2 <i>Plasmolizantes</i>	23
1.3.1.3 <i>Moinhos/Homogeneizadores</i>	23
1.3.1.4 <i>Ultrassom</i>	24
1.3.2 <i>Liofilização</i>	26
1.4 SIDRA	27
1.4.1 Processamento da sidra.....	29
1.4.2 O processo fermentativo	30
1.4.3 Formação de compostos aromáticos em sidra.....	31
1.4.4 Importância dos aminoácidos na formação de aromas	32
CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS DA BORRA DE LEVEDURA POR ULTRASSOM.....	35
2.1 INTRODUÇÃO	35
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.2.1 Materiais	36
2.2.2 Métodos	37
2.2.2.1 <i>Obtenção do extrato nitrogenado</i>	37
2.2.2.2 <i>Otimização da extração</i>	39
2.2.2.3 <i>Análises físico-químicas</i>	40
2.2.2.4 <i>Análise microscópica</i>	41
2.2.2.5 <i>Análise Estatística</i>	41

2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.3.1	Otimização da extração de compostos nitrogenados da borra de levedura de cervejaria	41
2.3.2	Análise microscópica	47
2.4	CONCLUSÃO.....	49

CAPÍTULO 3: EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO NITROGENADO NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO EM MOSTO SINTÉTICO E MOSTO DE MAÇÃ..... 50

3.1	INTRODUÇÃO.....	50
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.2.1	Materiais.....	52
3.2.2	Métodos.....	53
3.2.2.1	<i>Avaliação do extrato na solução de glicose</i>	<i>53</i>
3.2.2.2	<i>Avaliação do extrato em mosto sintético de maçã.....</i>	<i>54</i>
3.2.2.3	<i>Avaliação do extrato em mosto de maçã.....</i>	<i>56</i>
3.2.2.4	<i>Cinética de fermentação.....</i>	<i>58</i>
3.2.2.5	<i>Análises físico-químicas</i>	<i>58</i>
3.2.2.6	<i>Contagem de leveduras.....</i>	<i>58</i>
3.2.2.7	<i>Análise sensorial.....</i>	<i>59</i>
3.2.2.8	<i>Estatística.....</i>	<i>59</i>
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
3.3.1	Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em solução de Glucose.....	60
3.3.2	Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em mosto sintético de maçã.....	64
3.3.3	Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em mosto natural de maçã.....	71
3.3.4	Avaliação sensorial.....	76
3.4	CONCLUSÃO.....	78

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....79

REFERÊNCIAS.....80

APÊNDICE A – FICHAS SENSORIAS DE FERMENTADO DE MAÇÃ PARA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE E QUALIDADE DE ODOR E QUALIDADE DA BEBIDA 94

INTRODUÇÃO

As leveduras têm um papel fundamental na indústria de bebidas alcoólicas e na produção de biocombustível. Leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* sp. são as mais importantes do ponto de vista econômico, sendo utilizadas na fermentação alcoólica de vinhos, cervejas, panificação, fermento-destilados e etanol combustível.

Na produção de cerveja, as leveduras são inoculadas para realizar a fermentação do mosto cervejeiro, metabolizando os açúcares fermentescíveis para produzir álcool, gás carbônico, energia na forma de ATP e calor, além de ésteres que irão adicionar aroma ao produto.

As cervejarias podem reutilizar a levedura do processo (batelada) cerca de 4 a 6 vezes. Esta borra de levedura consiste no segundo resíduo sólido gerado em maior quantidade, sendo o primeiro, o resíduo de malte oriundo do processo de brassagem. Geralmente, na produção de cerveja do tipo *Lager*, são produzidos cerca de 1,7 a 2,3 kg de borra de levedura com 85 a 90 % de umidade, para cada 1000 L de cerveja produzida. Porém, o aproveitamento da borra de leveduras é pequeno, sendo empregada principalmente na alimentação de ruminantes e suínos após tratamento para eliminar as leveduras viáveis. Este subproduto apresenta elevado teor de proteína, o qual poderia ser utilizado como fonte de nutrientes em processos biotecnológicos. Além de representar uma alternativa para problemas ambientais como, por exemplo, descargas descontroladas, visto que muitas vezes esse resíduo é descartado sem um tratamento térmico para inativação das células.

Estudar possibilidades de reutilização da borra de leveduras de forma sustentável torna-se importante. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo obter um extrato nitrogenado a partir da borra de leveduras da indústria cervejeira, como uma possível fonte de aminoácidos com potencial aplicação em processos biotecnológicos, como na elaboração da sidra.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- *Obter* um extrato nitrogenado a partir de biomassa residual de levedura de cervejaria utilizando ultrassom e avaliar o efeito de sua adição em processos fermentativos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Avaliar* o uso do dispositivo ultrassônico na autólise celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para obtenção do extrato nitrogenado;
- *Otimizar* a extração de compostos nitrogenados a partir da borra de levedura através do delineamento de experimentos;
- *Avaliar* o efeito da aplicação do extrato nitrogenado na cinética de fermentação em mosto artificial e em mosto natural de maçã;
- *Avaliar* o efeito da adição do extrato nitrogenado na qualidade sensorial de sidras (intensidade e qualidade de odor);

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 LEVEDURA

As leveduras pertencem ao reino *Fungi*, tendo algumas características específicas dos fungos como presença de parede celular rígida, célula eucariótica, aclorofilados, nutrição heterotrófica, e ausência de motilidade (KURTZMAN; FELL, 2011). Como as bactérias, os fungos estão espalhados pela natureza, apesar de se desenvolverem geralmente no solo e em regiões de umidade relativa mais baixa que as bactérias (COPERSUCAR, 1987). As leveduras do gênero *Saccharomyces* são as que apresentam maior valor industrial e comercial (VILELA et al., 2000). São responsáveis pela manufatura de milhares de toneladas de alimentos, bebidas e combustíveis anualmente. Este gênero não apresenta toxidade e pode atuar em meio aeróbio ou anaeróbio (SOUZA et al., 1995).

1.1.1 Morfologia e estrutura das leveduras

As leveduras são seres unicelulares, com parede celular definida, que contém membrana plasmática, invaginação da membrana, cicatriz de brotamento, citoplasma, núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, sistema de Golgi, vesículas secretoras (FELDMANN, 2005). A composição da parede celular contém basicamente de polissacarídeos de glicose, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glucanas (48-60%), manoproteínas (20-23%) e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina (0,6-2,7%). A parede celular contém duas principais camadas: uma externa, composta de manoproteínas e uma interna, de glicose. Sendo que a camada externa de manoproteínas tem a principal função de proteger a célula contra fatores externos sendo responsável pela porosidade da parede celular, já a camada interna de glicose é responsável pela estrutura da parede celular contra choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos (FLEURI et al., 2005).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam células oval ou elipsoidal com uma parede espessa, podendo ter variações em seus tamanhos. Podem ter um tamanho celular com valores médios de diâmetro de 5-10 micrômetros no diâmetro maior e de 1-7 micrômetros no diâmetro menor. As células de cepas industriais geralmente são maiores do que as cepas de laboratório, sendo que a média do seu

tamanho celular aumenta com a idade. A média de volume celular é de 29 ou 55 μm^3 para uma célula haploide e diploide, respectivamente (COPERSUCAR, 1987; KREGER-VAN RIJ, 1987). Os representantes dessa espécie são habitantes de frutos. A *S. cerevisiae* possui mais de 20 tipos de manoproteínas que atuam na construção, preservação, modificação da estrutura e interações intercelulares durante a aglutinação ou floculação. A parede celular é rígida, definindo sua forma e sua resistência ao movimento. Em questão de peso, a parede celular pode ter cerca de 30% do peso seco da célula. Algumas enzimas importantes podem ser encontradas na parede celular, como a invertase, a fosfatase, a amino-peptidase e a glucoamilase. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem cerca de 6 a 8% do peso em proteína, a maior parte na forma das enzimas citadas. A porcentagem de lipídeos varia de 8,5 a 13,5% e de quitina 1 a 2% no caso da *Saccharomyces cerevisiae* (COPERSUCAR, 1987).

1.1.2 Reprodução das leveduras

As células de *S. cerevisiae* geralmente apresentam dois mecanismos de reprodução, assexuada por brotamento ou sexuada por fusão de células (BENTO; ALMEIDA, 2006; LODDER, 1971). A célula vegetativa divide-se geralmente por gemação, também chamado de brotamento ou gemulação, onde, ocorre o crescimento de uma célula-filha a partir de uma célula-mãe, seguido da divisão do núcleo, formação da parede celular e, por fim, ocorre a separação das células. Normalmente cada célula-mãe forma entre 20 a 30 gemas, sendo que a sua idade pode ser determinada pelo número de cicatrizes presentes na parede celular (SCHNEITER, 2004). A cicatriz formada é permanente e se forma na célula-mãe logo após a separação, não podendo haver outra gemação no local. Na célula-filha também forma-se uma cicatriz, porém, não é permanente. Estas cicatrizes podem ser vistas utilizando técnicas de microscopia. Após a formação da parede celular, nem sempre as células filhas se separam da célula-mãe, podendo haver a formação de mais brotos na célula-mãe ou até mesmo na célula-filha (COPERSUCAR, 1987). A reprodução sexuada ocorre pelo fusionalamento de células haploides de tipos sexuais opostos. A célula diploide pode se reproduzir vegetativamente ou em condições de restrição de nutrientes, induzidas a sofrer meiose e esporulação, formando quatro esporos haploides, dois de cada tipo sexual (FOWELL, 1969; NEVOIGT, 2008).

1.1.3 Fisiologia das leveduras

As leveduras são um grupo de microrganismos amplo e diversificado, podendo encontrar uma variedade de reações fisiológicas, assim como diferentes morfologias e processo de reprodução. Porém, há algumas generalizações em relação a sua fisiologia (PELCZAR; REID; CHAN, 1980):

a) Oxigênio: as células de leveduras foram os primeiros microrganismos capazes de crescer em ausência de oxigênio. Em anaerobiose, ausência de oxigênio, o açúcar é convertido principalmente em álcool e dióxido de carbono, ao passo que em aerobiose, presença de oxigênio, os produtos formados são dióxido de carbono e água. A multiplicação das leveduras acontece mais rápido com mais células sob condições de aerobiose (COPERSUCAR, 1987).

b) Necessidades nutricionais: as leveduras exigem uma fonte de carbono elaborada como glicose ou outro açúcar para que forneça energia química e o esqueleto de carbono de suas estruturas celulares (HARRISON, 1971). Fontes de carbono, nitrogênio e fósforo são importantes à fermentação, além deles, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos são importantes (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

c) Fatores de crescimento: as leveduras precisam de alguns nutrientes para seu crescimento em pequenas concentrações, como as vitaminas. Uma levedura que não cresce na ausência de biotina, por exemplo, pode crescer quando a concentração de biotina for de 1 ppm. A biotina é primordial para o metabolismo do nitrogênio (COPERSUCAR, 1987).

d) pH: Segundo Menezes (1980), a faixa de pH mais favorável para as leveduras está entre 4,0 e 5,0. Além de favorecer seu crescimento esta faixa de pH reduz a formação de carga microbiana contaminante, pois, a maioria das bactérias contaminantes possuem características neutrófilas. Além disso, nesta faixa as enzimas invertases da levedura atingem estabilidade e máxima atividade na inversão da sacarose liberando glicose e frutose (ZABED et al., 2014; SHANKAR et al., 2014).

e) Temperatura: a faixa de temperatura recomendada para o crescimento e obtenção das leveduras é entre 25 e 26 °C, temperaturas menores retardam o seu crescimento e temperaturas maiores podem favorecer o aparecimento de contaminações (MENEZES, 1980), mas vale lembrar que para o processo cervejeiro são utilizadas temperaturas menores.

1.1.4 Metabolismo fermentativo da *Saccharomyces* sp.

A levedura caracteriza-se por ser um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, apresenta capacidade de desenvolver o metabolismo aeróbio oxidativo, ou fermentativo dependendo das condições de aerobiose ou de anaerobiose (RAVANELI, 2010). Em condições aeróbias, com a presença de oxigênio no meio e em baixa concentração de glicose, a levedura metaboliza os carboidratos para produção de energia na forma de ATP à levedura, para que esta possa realizar as reações metabólicas necessárias para sua sobrevivência, crescimento e multiplicação. Neste processo uma molécula de glicose produz cerca de 38 ATPs e 47g de biomassa. Sob condições anaeróbias, induzidas pela ausência de oxigênio, e em elevadas concentrações de açúcares no mosto, a levedura metaboliza a molécula de glicose até a formação de etanol (WHITING, 1976; HERRERO, 1999). A glicose é metabolizada no início da respiração celular da levedura, na qual os substratos de carbono passam pelas etapas de glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, formando gliceraldeído-3-fosfato que é convertido em piruvato. Posteriormente, em processo de anaerobiose, o piruvato é descarboxilado em aldeído pela enzima piruvato descarboxilase e, em seguida, reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase, formando NAD^+ . No final desse processo são formadas duas moléculas de ATP, duas de etanol e duas de gás carbônico por molécula de glicose e baixa produção de biomassa (WALKER, 1998). O ciclo de Krebs também é utilizado pelas leveduras para sintetizar aminoácidos e lipídeos que são necessários ao seu crescimento. A *S. cerevisiae* obtém aminoácidos por meio da incorporação de compostos nitrogenados presentes no meio e realiza a transaminação entre aminoácidos e ácidos α -cetônicos (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

No metabolismo das leveduras, os açúcares simples, frutose e glicose, são levados ao interior do citoplasma, através de difusão facilitada, que nada mais é do que o transporte de substâncias para o interior da célula pela membrana com auxílio de um transportador acelerado de natureza proteica. Já a sacarose para ser absorvida é necessário que haja sua hidrólise por uma enzima invertase no exterior da levedura. A água, dióxido de carbono e oxigênio são absorvidos e secretados por difusão simples (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012).

1.1.5 Importância do nitrogênio no processo fermentativo

Para a produção de bebidas alcoólicas é necessário realizar uma suplementação de nutrientes no mosto. Praticamente em todos os processos industriais que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* participa, os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, carbono, sais minerais e vitaminas (COOPER, 1982). O nitrogênio é um composto fundamental aos organismos vivos, sendo que as leveduras podem utilizar uma grande diversidade de compostos nitrogenados, tais como: amônio, aminoácidos e peptídeos (TER SCHURE et al., 2000) que podem constituir uma fonte favorável para a multiplicação e o crescimento da levedura, aumentando a eficiência, o rendimento e a produtividade do processo fermentativo.

Durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é rapidamente assimilado, pois fornece precursores para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, dando suporte a altas taxas de crescimento e produção de biomassa, e estimulando a atividade fermentativa (HENSCHKE; JIRANEK, 1993). O transporte de açúcares é regulado pela presença de nitrogênio assimilável no meio e pela síntese proteica das células (WALKER, 1998). Se a síntese de proteínas diminuir ocorre uma diminuição do sistema de transporte celular, assim como a redução do transporte de açúcares para dentro da célula. Esta diminuição da atividade metabólica celular, pode ainda ser maior quando há ausência ou carência de nitrogênio no meio (SALMON; MAURICIO, 1994). Porém, se a adição de nitrogênio não for tardia, pode restaurar a atividade metabólica da levedura e consequentemente a atividade fermentativa (BELY et al., 1994). Entretanto, se a suplementação for inadequada ou em excesso, o processo de enriquecimento nitrogenado pode prejudicar a qualidade do produto final, pois pode ocorrer a produção de diversos compostos secundários, como propanol, por exemplo que em elevada quantidade torna a bebida de baixa qualidade (JERONIMO, 2004).

1.2 BIOMASSA DE LEVEDURA CERVEJEIRA

Neste tópico será abordado o processamento de cerveja industrial, a levedura como um subproduto da indústria cervejeira, sua composição e possíveis aplicações do subproduto.

1.2.1 Processamento de cerveja

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) define a cerveja como sendo: “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. O malte pode ser substituído em partes por outros cereais como arroz, milho, trigo, aveia, centeio ou sorgo. Porém, a quantidade de malte de cevada deve ser maior ou igual a 55% em peso, sobre o extrato inicial como fonte de açúcares para que a bebida possa ser classificada como cerveja. Sendo as matérias primas essenciais para a fabricação da cerveja água, malte, levedura e lúpulo. Outros componentes, denominados adjuntos, podem ser utilizados para substituição parcial do malte (BRASIL, 1997; SIQUEIRA et al., 2009).

O processo de fabricação da cerveja inicia-se com a maltagem, que envolve o controle do umedecimento do malte e posterior germinação com condições controladas de temperatura para que ocorra a formação das enzimas necessárias para a hidrólise dos polissacarídeos e do amido presentes no grão. Dentro da fábrica de cerveja o processo de produção envolve a moagem do malte, mosturação, fervura, fermentação e maturação (FERREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2008).

Na etapa de mosturação ocorrem as transformações das matérias primas em mosto cervejeiro. Esta etapa tem por finalidade realizar a hidrólise do amido a açúcares fermentescíveis, maltose, glicose e maltotrioses, juntamente com dextrinas de cadeias curtas ou longas. São extraídos aproximadamente 65 % dos sólidos totais do malte. O mosto cervejeiro é formado por substâncias solúveis em água (BAXTER, 1981).

Posteriormente o mosto é separado por meio de filtragem dos resíduos sólidos. Então, inicia-se a etapa de fervura do mosto juntamente com o lúpulo a aproximadamente 100 °C. Esta etapa confere ao mosto estabilidade biológica, bioquímica e coloidal. Também ocorre a reação de Maillard, a qual confere o desenvolvimento de cor, aroma e sabor, e ainda aumenta a concentração de extrato. Ainda acontece a reação de isomerização dos α -ácidos presentes no lúpulo que são responsáveis pela transferência dos compostos amargos e aromáticos do lúpulo. Nesta etapa é possível remover, por evaporação, compostos voláteis

indesejáveis, como o dimetil sulfito (SIQUEIRA et al., 2009; FERREIRA; JORGE; NOGUEIRA; SILVA; TRUGO, 2005).

Após as etapas de clarificação e resfriamento do mosto ocorre a etapa de fermentação. No processo de fermentação, a levedura é adicionada no mosto aerado, e se reproduz rapidamente devido à alta quantidade de O_2 dissolvido no meio, oxidando o piruvato até CO_2 e água. Depois que todo oxigênio é consumido, as células de levedura passam a utilizar o açúcar de forma anaeróbica, transformando açúcares em etanol e CO_2 (SIQUEIRA et al., 2009). Para a indústria cervejeira, as duas vias metabólicas são de grande importância. Pois, a via respiratória, energeticamente mais eficiente, é utilizada no início do processo de fermentação, para promover o crescimento das leveduras de fermentação. A via fermentativa promove a transformação do mosto em cerveja. Nesta etapa, além de etanol e dióxido de carbono, outros compostos como álcoois superiores, ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos de enxofre são produzidos e desempenham um papel fundamental no perfil sensorial da cerveja (PINHO; FERREIRA; SANTOS; 2006; SIQUEIRA et al., 2009).

Após a fermentação principal, o mosto também chamado de cerveja verde, segue para a etapa de maturação. A maturação consiste de uma fermentação secundária que melhora o odor e sabor da cerveja e contribui para a clarificação. Esta etapa do processo é realizada normalmente a temperaturas de 0 a 3 °C (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006). Ao finalizar a etapa de maturação a cerveja passa por tratamentos como padronização da cor, carbonatação, clarificação, estabilização (FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010).

A cerveja pode ser dividida em dois grupos: as do tipo *Ale* ou fermentação alta, e as do tipo *Lager* ou fermentação baixa (AQUARONE et al., 2001). Na alta fermentação, utiliza-se levedura “ale” como agente fermentativo. As cervejas do tipo *Ale* são, em geral, de cor clara, com sabor pronunciado de lúpulo, ligeiramente ácidas, e seu teor alcoólico varia de 4 a 8%. Nas últimas horas de fermentação, a atividade fermentativa é baixa, e as leveduras tendem a subir a superfície do mosto, ou seja, na superfície do tanque. Neste momento, elas são sugadas ou mecanicamente separadas, sendo em seguida armazenadas a baixas temperaturas (FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010). O processo de fermentação ocorre entre a temperatura de 20 e 25 °C, com duração de 2 a 5 dias e a maturação entre 4,5 e 8 °C. A baixa fermentação é realizada em fermentadores de aço inoxidável que possuem

uma forma cilíndrica com o fundo cônico e o topo fechado. Utiliza-se a levedura “*lager*”. No final da fermentação, reduz-se a temperatura do mosto, a espuma desaparece e a levedura sedimenta para a base cônica do fermentador (FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010). Tendo em vista a maturação, o cervejeiro finaliza a fermentação ainda com algum extrato fermentescível presente no mosto fermentado, denominado de cerveja verde (AQUARONE et al., 2001). As cervejas do tipo *Lager* são as mais comuns e mais consumidas. É caracterizada por ter sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4 a 5%. As cervejas deste grupo são fabricadas por meio de processo lento, geralmente em torno de 5 dias com temperaturas entre 8 a 15 °C (FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010; SIQUEIRA et al., 2009).

1.2.2 Subprodutos da indústria cervejeira

Na fabricação de cerveja são gerados muitos resíduos e subprodutos, os quais são produzidos em grandes quantidades anualmente, devido ao aumento do volume de produção de cerveja. Estes resíduos e subprodutos estão sendo direcionados cada vez mais para a reutilização como produtos agroindustriais, de modo que se obtenha uma melhoria do ponto de vista econômico e ambiental (FILLAUDEAU; BLANPAIN-AVET; DAUFIN; 2006; MUSSATTO, 2009).

Um dos principais subprodutos procedentes do processamento de cerveja é a borra de levedura. Suas aplicações têm sido estudadas, devido ao seu alto valor nutricional e por ser gerado em grandes quantidades (MUSSATTO, 2006). Em processos de batelada, as leveduras podem ser reutilizadas até 6 vezes no processo de fermentação. Apesar de serem reutilizadas no processamento de cerveja *Lager* a borra de levedura gerada é em média 2 Kg, com 85 a 90 % de umidade, para cada 1000 L do produto final produzido (FERREIRA et. al., 2010).

A utilização da borra de levedura ainda é pequena sendo empregada principalmente na alimentação animal. Muitas tentativas de reutilização em processos biotecnológicos foram realizadas, como por exemplo em processos fermentativos para a produção de compostos de valor agregado tais como etanol, como substrato para cultivo de microrganismos, ou como matéria-prima para extração de compostos (FERREIRA et al., 2010).

1.2.3 Composição da borra de levedura

A borra de levedura apresenta proteínas e hidratos de carbono em abundância na sua composição. As proteínas existentes na borra contêm inúmeros aminoácidos, especificamente, arginina, cisteína, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e tirosina (MUSSATTO, 2009). Segundo Mussatto (2009), além da borra de levedura ser rica em proteína, contém vitaminas como, biotina, niacina, tiamina, vitamina B6, riboflavina entre outras. Já a quantidade de minerais presentes na borra, é por volta de 5 a 10 % do peso celular. Sendo o potássio e o fósforo presentes em maior quantidade. Costa e Castro-Gomez (2012) em seu estudo sobre obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria, encontrou a composição para a borra de levedura, representada na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 Composição da levedura após a fermentação alcoólica da cerveja, expressa em base seca.

Levedura residual (g/100g)	
Proteínas	54,48 ± 0,69
Cinzas	6,88 ± 0,11
Lipídeos	6,27 ± 2,23
Carboidratos	32,36 ± 2,82

FONTE: Costa e Castro-Gomez, 2012.

1.2.4 Possíveis aplicações da borra

O maior destino da levedura residual cervejeira é para formulação de ração animal. Recentemente, novos destinos têm sido explorados, como a obtenção de produtos de elevado valor nutricional para a aplicação na indústria farmacêutica e na dieta humana, como suplementos alimentares, devido à sua rica composição e por ser geralmente reconhecida como “segura” (*GRAS - generally recognized as safe*) (IN, KIM; CHAE, 2005). No entanto, para a alimentação humana a sua utilização é limitada, pois, a levedura contém elevada quantidade de ácidos nucleicos, como RNA, que em humanos é metabolizado em ácido úrico, o que pode causar problemas de saúde, como a gota (FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010). Além das aplicações em alimentos, este resíduo ou seus derivados, como os extratos a partir dele obtidos,

podem ser utilizados em processos biotecnológicos em geral, para obtenção de enzimas, principalmente a invertase, presente em sua parede celular (HOUGH, 1985), ou para suplementação de meios de cultivo, manutenção e de fermentação (FERREIRA et al., 2010).

No quadro 1.1 abaixo pode-se observar as principais aplicações da borra de levedura:

Quadro 1.1 Principais aplicações da biomassa de levedura residual de cervejaria.

PRINCIPAIS APLICAÇÕES DO RESÍDUO DE LEVEDURA		
Aplicação	Descrição	Referências
Alimentação animal	Na alimentação de ruminantes, ovinos, suínos, aves, cães, e peixes devido ao seu alto valor nutricional e como fontes de aminoácidos essenciais.	FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010; LAMOOLPHAK et al., 2006;
Alimentação humana	-Como fonte de antioxidantes naturais em alimentos com elevado conteúdo de gorduras animais, produtos cárneos, assim como na produção de pães, bolos; -Intensificador de sabor em vários alimentos, como sopas; -Em alimentação vegetariana como fonte de aminoácidos; -Em alimentos para crianças, até 3%, devido as suas propriedades nutricionais.	FERREIRA; PINHO; VIEIRA; TAVARELA, 2010; MATA-GÓMEZ et al., 2014; WICHUK; BRYNJÓLFSSON; FU, 2014;
Adsorvente	-Na remoção de metais em águas residuárias, como adsorvente de íons metálicos. -Na proteção de compostos bioativos.	MUSSATTO, 2009;
Biотecnologia	-Como substrato para o crescimento de microrganismos; -Na extração ou produção de enzimas ou outros compostos de interesse. As células de leveduras contêm vários compostos de interesse que podem ser extraídos e ou isolados, como proteínas, vitaminas, aminoácidos, RNA, DNA e enzimas.	MUSSATTO, 2009; PRIEST; STEWART, 2006;

1.3 AUTÓLISE DA LEVEDURA

A hidrólise total ou parcial de compostos intracelulares ocasionado pela ação de enzimas da própria célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, é conhecido como autólise. Trata-se de um fenômeno irreversível, que resulta na morte celular (BABAYAN et al., 1981; BABAYAN; BEZRUKOV, 1985). Este processo envolve enzimas hidrolíticas que liberam para o meio peptídeos, ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos e manoproteínas da parede celular (ALEXANDRE; GUILLOUX-BENATIER, 2006). A autólise celular pode ser induzida ou ocorrer de forma natural.

Na forma induzida geralmente ocorre em processos químicos, físicos e ou enzimáticos induzidos, os quais favorecem a autólise celular. Já na forma natural ocorre de forma lenta, quando as células sofrem algum tipo de estresse, as membranas perdem sua capacidade de retenção e dessa forma, o material intracelular se torna solúvel e extravasa pela parede celular, resultando em morte celular (TODD et al., 2000).

1.3.1 Métodos para promover a autólise celular

A autólise da levedura pode ser induzida por fatores como temperatura, adição de plasmolizantes, intervenção mecânica e outros procedimentos que facilitem o rompimento da membrana citoplasmática e ativem as enzimas intracelulares (BABAYAN et al., 1991).

1.3.1.1 *Temperatura*

A temperatura auxilia no processo de autólise, sob condição de que se trabalhe com a faixa de melhor atividade das enzimas intracelulares que irão auxiliar no rompimento da parede celular. Esta temperatura está entre 40 a 55 °C (LEE, 1996).

1.3.1.2 *Plasmolizantes*

Os agentes plasmolizantes (etanol e cloreto de sódio) auxiliam no processo de autólise desde que não alterem a atividade das enzimas intracelulares. O uso do álcool etílico como plasmolizante permite um rendimento de autólise consideravelmente alto, sendo que o maior rendimento obtido foi quando se utilizou a concentração de 5% p/p, em relação ao total de biomassa mais água e 1% de cloreto de sódio p/p (KOLLAR et al., 1992).

1.3.1.3 *Moinhos/Homogeneizadores*

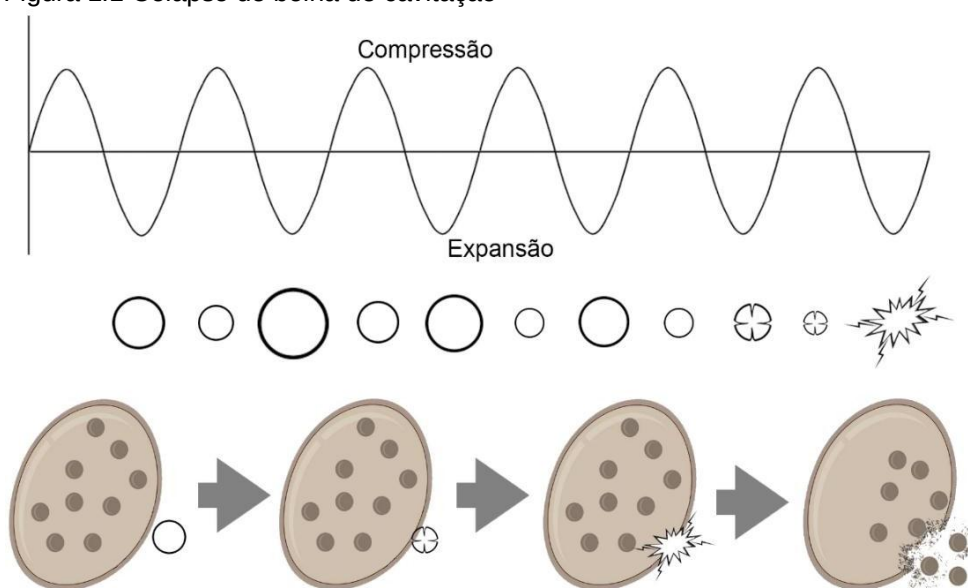
O rompimento celular com partículas abrasivas, pérolas de vidro, pode ser realizado com homogeneizadores horizontal ou vertical (CURRIE et al., 1972; GUZMÁN-JUÀREZ; HUDSON, 1978). O processo envolve a agitação de uma suspensão de células por uma rosca sem fim ou outro tipo de agitador, sendo atritada

contra pérolas de vidro colocadas no moinho ou homogeneizador. A desintegração celular dependerá de alguns fatores como o número e tamanho das partículas abrasivas, da concentração da suspensão de células, da vazão, do formato e da velocidade do agitador e ou moinho (EDEBO; MAGNUSSON, 1973).

1.3.1.4 Ultrassom

Ultrassons são definidos como ondas mecânicas com frequência acima do que o ouvido possa responder (20 KHz), que se propagam por qualquer meio líquido (fluidos). Os ultrassons apresentam uma região no espectro acústico, que se divide em três grupos: a faixa do infrassom ($U < 20$ kHz), a faixa sons ($20 \text{ Hz} < U < 20$ kHz), e a faixa dos ultrassons ($U > 20$ kHz). Os ultrassons ainda se dividem em duas faixas: baixa frequência ($20 \text{ kHz} < U < 1 \text{ MHz}$) e de alta frequência ($U > 1 \text{ MHz}$). As faixas de ondas de baixa frequência são aquelas que podem apresentar alta potência, enquanto que as ondas ultrassônicas de alta frequência têm baixa potência, podendo ser aplicadas principalmente para fins de diagnóstico na medicina assim como na engenharia (KORN et al., 2005; AWAD et al., 2012). Ondas de ultrassom quando aplicado em água, gera ondas de pressão que se propagam através da água, formando bolhas de gás e vapor que crescem e sofrem um colapso em alta velocidade de forma drástica. Esse acontecimento é chamado de cavitação acústica (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986; PETRIER et al., 1998; CHEMAT et al. 2011). A cavitação pode ser dividida em dois tipos, cavitação transiente e a cavitação estável. A cavitação transiente ocorre quando as bolhas de cavitação preenchidas de gás ou vapor sofrem oscilações irregulares até que ocorre a implosão das mesmas (Figura 1.1). Isso gera altas temperaturas locais e pressões que causam a desintegração das células ou desnaturação de enzimas. A implosão da bolha também gera forças de cisalhamento e jatos líquidos do solvente usado que podem danificar fisicamente a parede ou a membrana celular das células. Na cavitação estável, as bolhas oscilam de forma regular para muitos ciclos acústicos. As bolhas formam micro correntes do líquido circundante que também pode induzir espécies microbiológicas ao estresse (LEE et al., 2009; CHANDRAPALA et al., 2012).

Figura 1.1 Colapso de bolha de cavitação



Fonte: Autora.

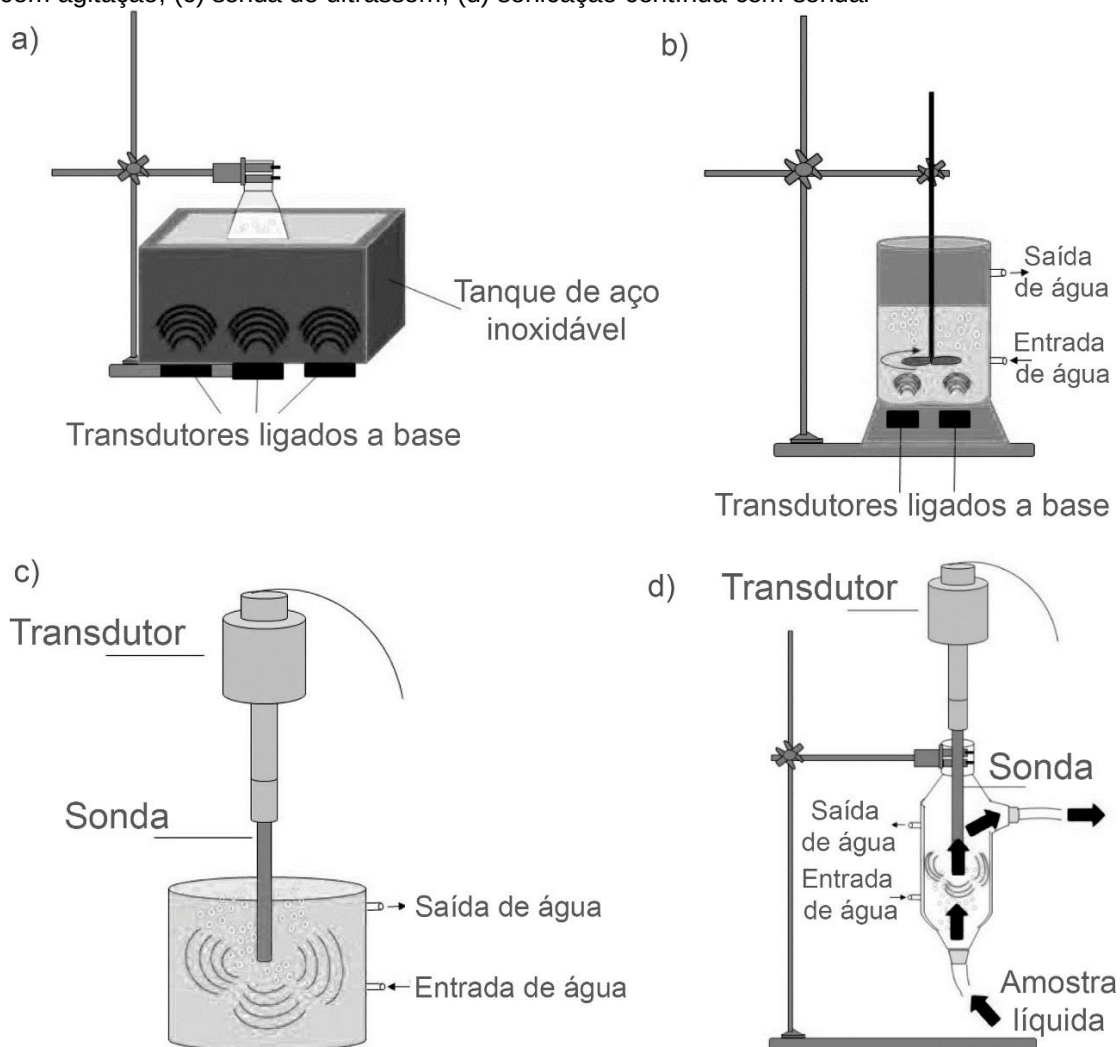
Nota: Uma bolha de cavitação é gerada perto da superfície celular, então durante um ciclo de compressão ocorre o colapso da bolha. A alta pressão e a temperatura envolvidas neste processo destruirão as paredes celulares e seu conteúdo intracelular é liberado para o meio.

O efeito de inativação microbiológica causado pelo ultrassom também está associado a geração de cavitação intracelular, os quais por meio de choques mecânicos podem causar danos a componentes estruturais da célula, e consequentemente a sua ruptura (RIESZ et al., 1985; CHEMAT et al. 2011). O rompimento ultrassônico em células tem sido utilizado em processos de separação e extração, seja na forma de um pré tratamento ou como um processo integral (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008).

O ultrassom é uma tecnologia assistida de grande potencial que pode acelerar a transferência de calor e massa (LUQUE-GARCIA et al., 2003). O ultrassom tem sido muito utilizado na transferência de massa para diferentes produtos e processos, além de ser utilizado na remoção de contaminantes como na salmoura de carne e queijo, no processo de secagem do arroz, cenouras ou cebolas, na desidratação osmótica de maçãs e vários processos de extração, podendo este equipamento ser escalonado (DEM'YANUSHKO et al. 2017; MUSIELAK; MIERZWA; KROEHNKE; 2016; MULET et al., 2003). Os sistemas ultrassônicos (FIGURA 1.2) são equipamentos considerados de tecnologia verde, sem impacto ambiental, que evita o uso de solventes tóxicos e diminui o tempo de extração em comparação com métodos de força de cisalhamento convencionais em que o consumo de energia é diretamente proporcional à pressão de operação ou velocidade de fluxo (CHISTI; MOO-YOUNG,

1986). Além de ser relativamente de baixo custo e não perigoso (LUQUE-GARCIA et al., 2003).

Figura 1.2 Sistemas ultrassônicos comumente utilizados (a) banho de ultrassom, (b) reator de ultrassom com agitação, (c) sonda de ultrassom, (d) sonicação contínua com sonda.



Fonte: Adaptado de Chemat et al. (2017).

1.3.2 Liofilização

Definida como o processo de desidratação através da sublimação de um produto congelado (RATTI, 2001). É uma tecnologia de secagem que vem sendo utilizada principalmente visando a preservação do alimento, com o propósito de prolongar o prazo de validade do produto (CLAUSSEN, 2007). As reações microbiológicas e de deterioração são suspensas pelo processo de liofilização, pelo fato de haver a ausência de água líquida e baixa temperatura requerida pelo processo, como resultado obtém-se um produto final de excelente qualidade (RATTI, 2001;

KROKIDA, 2006).

A liofilização é um dos métodos mais utilizados no preparo de proteínas desidratadas, pelo fato do processo apresentar ao produto estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes. (MURGATROYD et. al., 1997). A liofilização apresenta três etapas: congelamento do produto, secagem primária onde a água é removida por sublimação e secagem secundária (dessorção) (ORDÓÑEZ, 2005).

A primeira etapa tem por objetivo transformar as soluções aquosas dos alimentos em uma mistura de duas fases: uma constituída por cristais de gelo e a outra pela solução concentrada dos solutos. O processo consiste em, inicialmente, congelar o produto rapidamente, para fazer com que as suas características de sabor, aroma e constituintes químicos, sejam preservadas (ORDÓÑEZ, 2005). Durante a secagem primária, em que o produto já se encontra congelado, a pressão do interior do equipamento reduz abaixo de 600 Pa e fornece o calor latente de sublimação do gelo. Assim, os cristais de gelo são removidos por sublimação que ocorre sob vácuo e adição de calor por meio das placas de aquecimento. O processo não ocasiona alterações na composição química, além de reduzir o teor de água à níveis muito baixos ($\leq 5\%$) (CAVALCANTI MATA et al., 2003; HARPER; TAPPEL, 1957).

Na secagem secundária, também chamada de dessorção, o alimento parcialmente seco permanece no liofilizador por cerca de 2 a 6 horas, mantendo-se o vácuo, assim ocorre a evaporação de grande parte da água residual (ORDÓÑEZ, 2005).

1.4 SIDRA

Segundo a legislação brasileira a sidra é definida como sendo a:

Bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de maçã fresca, sã e madura, do suco concentrado de maçã ou ambos, com ou sem a adição de água podendo ser gaseificada, desalcoholizada, por meio de processo tecnológico adequado, adicionada de açúcares, água e outros aditivos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

Para a legislação brasileira a sidra ainda pode ser adicionada de suco de pera, máximo 30% (BRASIL, 2008). São bebidas que são produzidas fermentação alcoólica total ou parcial de misturas de mostos de maçãs de mesa ou industriais. A matéria-

prima e a tecnologia de processamento podem variar nos mais de 20 países do mundo que produzem sidra (LEA; DRILLEAU, 2003). Mas independente da matéria-prima, ou da tecnologia utilizada, o aroma frutado é um dos principais aspectos de qualidade sensorial da sidra (XU et al., 2006).

As sidras europeias têm destaque pela sua qualidade, sendo tradicionalmente produzidas com variedades de maçãs que possuem alto teor de taninos e polifenóis (ROWLES, 2000). As sidras francesas, são conhecidas pelo seu sabor suave, adstringente e aromas frutados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). Enquanto as alemãs e suíças, são secas e ácidas. Na Áustria o produto é seco e ácido, com um aroma equilibrado pungente com predominância de ácido acético (PICINELLI et al., 2000). Já no Brasil, a sidra é suave, pouco aromática e com baixa acidez, passando a ter reconhecimento no país na primeira metade do século XX, sendo produzida principalmente com maçãs de mesa (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; LEA; DRILLEAU, 2003).

As maçãs destinadas ao processamento de sidra no Brasil normalmente são de descarte comercial, as quais não apresentam características atrativas e agradáveis para o consumo. As maçãs de descarte são utilizadas como matéria prima para a elaboração da sidra, sendo processada de acordo com a disponibilidade das cultivares disponibilizadas durante as safras (PAGANINI, 2004). No Brasil as sidras se destinam principalmente ao consumo em comemorações de final de ano, competindo com bebidas como vinhos frisantes, cervejas e refrigerantes (CARVALHO et al., 2010). Sendo a produção do país para atender somente o mercado interno, sem perspectivas de exportação ou importação. Isso devido ao fato de a população não ter o hábito do consumo frequente ou rotineiro da bebida. Segundo Nogueira et al. (2003) com o crescimento da produção nacional de maçãs a disponibilidade de maçãs de baixo valor comercial tende a aumentar. Devido a este fato, o setor agroindustrial se preocupa com a agregação de valor econômico e de qualidade da sidra brasileira, almejando produtos com maior qualidade. Os autores salientam a necessidade de aprimorar a qualidade da sidra para apresentar um perfil definido de aceitação pelo consumidor brasileiro. Gerando uma bebida de qualidade que seja consumido não só nas comemorações de final de ano, mas durante o ano todo. E assim aumentar a produção de sidra nacional objetivando pela comercialização internacional, já que a quantidade de matéria prima disponibilizada ao setor industrial é significativa.

1.4.1 Processamento da sidra

A produção de sidra se inicia pela extração do suco de maçã que é realizada por meio de prensas mecânicas (DEL CAMPO et al., 2005). Posteriormente é realizado a etapa de despectinização do mosto com adição de enzimas pectinolíticas, seguido de precipitação e trasfega. Na sequência, inicia-se a fermentação do mosto que pode ocorrer de forma natural, com as leveduras naturalmente presentes na maçã, ou pela adição de inóculo de levedura (NOGUEIRA et al., 2003a).

Após a fermentação, o mosto fermentado é filtrado e transferido para tanques de maturação, onde ocorrem as fermentações secundárias. Na sequência é realizada a adição dos demais ingredientes para correção da bebida, como sacarose (75-100 g/L), ácido láctico para correção de acidez, caso haja a necessidade, e demais aditivos permitidos por legislação (NOGUEIRA et al., 2003a). Sendo estes aditivos ativadores de fermentação como sais de amônio, vitaminas, ergosterol, ácidos graxos insaturados, conservantes como ácido sórbico e dióxido de enxofre, os acidulantes, ácido cítrico e ácido láctico (BRASIL 1988; BRASIL, 1994; BRASIL, 2009). Por fim, o fermentado é clarificado por meio da utilização de gelatina e/ou bentonite, e a bebida é adicionada de CO₂ e pasteurizada, estando pronta para o consumo (NOGUEIRA et al., 2003a).

A produção de sidra tradicional é realizada pela fermentação natural. Esses métodos tradicionais, além de serem muito lentos e caros, podem causar fermentações descontroladas que determinam fortes carências na qualidade da sidra, especialmente se a matéria-prima não apresenta condições sanitárias adequadas e a temperatura é muito alta durante a extração de suco (MANGAS, 1994; LAPLACE, J. M. et al., 2001). Porém, a sidra francesa é considerada umas das melhores do mundo, (NOGUEIRA, 2003a; NOGUEIRA, 2008) tendo como características: fermentação lenta, de um a dois meses, parcial, com açúcares residuais e em que o grau de álcool não excede 5 %, porque é realizado por microflora natural (LE QUÉRÉ et al., 2006).

Contudo, a prática comum das indústrias de sidra de adicionar culturas iniciais no processo de fermentação que reduz o risco de deterioração, além de diminuir riscos de mudanças indesejáveis no sabor da sidra. O que discriminam as diferentes tecnologias usadas no processamento de sidra são as diferenças no sabor e aroma da bebida (LEA et al., 2003).

1.4.2 O processo fermentativo

A elaboração da sidra é um processo complexo, a qual combina duas fermentações biológicas sucessivas. Sendo a primeira, a fermentação alcoólica clássica, a qual converte açúcares em etanol a partir de espécies de cepas de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*. A segunda fermentação é a fermentação malolática, a qual faz a conversão do ácido L-málico em ácido L-lático que ocorre durante o processo de maturação da bebida por bactérias do ácido lático (NEDOVIC et al., 2000; HERRERO, 1999).

Em sidras a primeira etapa da fermentação pode ser subdividida em oxidativa, responsável pela formação dos aromas, e fermentativa, na qual ocorre a transformação dos açúcares em etanol (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). A fermentação oxidativa ocorre antes da adição do inóculo de levedura comercial, quando há a presença de leveduras de baixa ação fermentativa, principalmente *Metschnikowia pulcherrima* e *Hanseniaspora valbyensis*. Sendo esta fermentação importante, pois, ocorre o aparecimento de aroma frutado representado pelos ésteres, como acetato de etila e fenil-etila (PIETROWSKI et al., 2012; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2012). O método francês de processamento de sidra inclui a fermentação oxidativa devido ao fato de que a levedura selvagem, com baixa atividade de fermentação alcoólica, produz aromas frutados e florais, melhorando assim a qualidade do produto final (LE QUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

A fermentação alcoólica, é um processo realizado predominantemente por leveduras do gênero *Saccharomyces*. Consiste na transformação de açúcares fermentescíveis em CO₂ e etanol como produtos principais, além de glicerol, ácidos succínicos, ácidos voláteis e ésteres, como metabólicos secundários (RAVANELI, 2010).

A segunda fermentação ou fermentação malolática é reconhecida como uma importante etapa na fabricação de sidra, pois, é responsável por reduzir a acidez da sidra, estabilizar a bebida em relação as deteriorações microbianas por meio do efeito bacteriostático do ácido lático produzido. Nesta etapa também ocorre o consumo de substratos residuais e ainda contribui para a complexidade do sabor produzindo compostos tais como ácido acético, acetato de etila, lactato de etila, diacetil, acetona e 2,3-butanodiol (NEDOVIC et al., 2000).

1.4.3 Formação de compostos aromáticos em sidra

O aroma desempenha um papel importante na qualidade dos fermentados de maçã e sidras (PIETROWSKI, 2012). Sendo os componentes voláteis responsáveis pelo aroma da sidra, é importante entender sua formação durante o processamento da bebida (MANGAS, 1994). Na sidra vários compostos de diferentes classes foram encontrados, essencialmente álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos e compostos aromáticos como o 2-feniletanol (XU et al., 2007; PENG et al., 2009). Alguns dos compostos aromáticos são derivados da fruta como butanoato de etila e etanoato de hexila, mas a maioria desses compostos aromáticos são metabólitos secundários formados durante a fermentação alcoólica (XU et al., 2006).

A composição dos compostos aromáticos na sidra pode ser influenciada pela tecnologia e processamento utilizado bem como a variedade e grau de maturação da maçã, tipo de leveduras utilizadas, condições do processamento, temperatura, aeração e agitação, e envelhecimento ou maturação da sidra (LEA; DRILLEAU, 2003; BRAGA et al., 2013). Sendo, os precursores intermediários de aromas presentes na maçã e o tipo de levedura utilizada os principais fatores que podem influenciar na composição desses compostos aromáticos (SWIEGERS et al., 2006). Os principais compostos voláteis determinados em fermentados de maçã e sidra são álcoois superiores (principalmente os amílicos), ésteres, ácidos graxos e cetonas (RITA et al., 2011). Destes, etanol, 1-butanol, 1-hexanol, 3-Acetato de metilbutila, acetato de 2-feniletila, acetato de butila, 2-fenil-etanol, 2-3- butanodiol e isobutanol, acetato de etila, ácido hexanóico que é tipicamente dominante (XU, 2007). Alguns destes, como o butanol, são próprios da maçã. Já o acetato de etila são produtos da fermentação. O isobutanol, também encontrado na sidra, aumenta os aromas frutados (PICINELLI et al., 2002; XU, 2007).

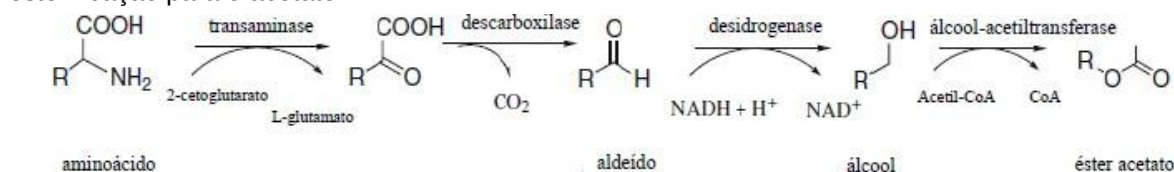
Existem várias técnicas de extração de compostos orgânicos. Porém, escolher uma técnica apropriada para extração de compostos voláteis é um desafio, pois, estes são muito instáveis podendo sofrer perdas ou alterações durante a extração (PIETROWSKI et al., 2012). As técnicas mais utilizadas para determinar compostos aromáticos de frutas e bebidas são técnicas de cromatografia, principalmente cromatografia gasosa (BRAGA, 2013). Várias formas de extração podem ser utilizadas como headspace dinâmico, extração líquido-líquido, headspace estático, microextração em fase sólida entre outros (XU et al., 2007; PENG et al., 2009). Na

extração por headspace, a fase líquida da amostra deve estar em equilíbrio com a fase em vapor, onde todos os compostos voláteis estarão concentrados, então a amostra deve ser coletada com uma seringa. A amostra na fase gasosa é então injetada no cromatógrafo para análise. Desta maneira, perda de amostras é minimizada além de ter pouca manipulação do produto. Porém, com essa metodologia compostos presentes em traços e com alto ponto de ebulição não são quantificados tão facilmente (PIETROWSKI et al., 2012).

1.4.4 Importância dos aminoácidos na formação de aromas

Santos et al. (2015) encontraram um teor de nitrogênio inicial em maçãs que variou de 192,38 a 430,60 mg/L, sendo diretamente relacionado ao teor inicial de aminoácidos, principalmente ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina que são os mais facilmente assimilados pela levedura (LEQUERE; DRILLEAU, 1998). O nitrogênio é um fator limitante para o crescimento e manutenção da levedura *Saccharomyces*. O nitrogênio assimilável afeta a cinética de fermentação em concentrações superiores a 75 mg/L podendo evitar fermentações lentas (ALBERTI et al., 2011). Sidras fabricadas com baixo teor de nitrogênio ou aminoácidos tem-se uma fermentação lenta e cerca de 50% menos de compostos voláteis, principalmente 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico) e ésteres. (SANTOS et al., 2015). Compostos nitrogenados como os aminoácidos podem ser utilizados em biossíntese de proteínas, e em outras reações que influenciam o crescimento e o metabolismo das leveduras (ARIAS-GIL et al., 2007). O efeito do conteúdo de aminoácidos na maçã está relacionado a formação de compostos voláteis em sidra. Os principais precursores intermediários para a biossíntese de compostos aromáticos são os aminoácidos iniciais presentes nos mostos de maçã (ARDO, 2006). Sendo os principais grupos de voláteis em bebidas fermentadas os álcoois superiores, os quais são formados pelo catabolismo de aminoácidos na via de Ehrlich conforme a Figura 1.3 (SANTOS et al., 2015).

Figura 1.3 Via metabólica de Ehrlich, partindo de um aminoácido para o álcool superior com posterior esterificação para o acetato.



Fonte: Walker, 1998

Nas reações metabólicas dos aminoácidos primeiramente ocorre a redução do aminoácido a aldeído, a partir de uma reação catalisada por enzimas transaminase e descarboxilase. Posteriormente, o aldeído formado reduz-se a álcool superior pela ação da enzima desidrogenase. Então, o álcool pode ser parcialmente transesterificado para o éster acetato se houver atividade da enzima álcool acetiltransferase (DICKINSON; SALGADO; HEWLINS, 2003; WALKER, 1998).

Portanto, torna-se interessante a suplementação do meio com aminoácidos precursores de aroma. Os aminoácidos utilizados como precursores, além de melhorar a qualidade da sidra ainda podem ajudar a padronizar os aromas a partir de correções no mosto de maçãs (SANTOS et al., 2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos temas abordados percebeu-se a importância do gênero *Saccharomyces* nas indústrias de bebidas alcoólicas. Nas indústrias cervejeiras são utilizadas na etapa de fermentação. Etapa na qual o resíduo de levedura denominado biomassa residual é gerado, consistindo no segundo resíduo sólido gerado em maior quantidade. A sua utilização é pequena e empregada principalmente na alimentação de animais. Este subproduto apresenta elevado teor de proteína e poderia ser utilizado como fonte de nutrientes em processos biotecnológicos. Neste contexto, o ultrassom torna-se importante na extração de compostos nitrogenados, visto que além de ser uma tecnologia assistida sustentável, possui grande potencial em processo de extração, pois, pode acelerar a transferência de calor e/ou massa. Portanto, este trabalho visa elaborar um extrato nitrogenado da biomassa residual da indústria cervejeira, como uma possível fonte de aminoácidos com aplicação em processos fermentativos.

CAPÍTULO 2: OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS NITROGENADOS DA BORRA DE LEVEDURA POR ULTRASSOM

RESUMO

A borra de levedura é um resíduo oriundo da indústria cervejeira com alto valor proteico. Sendo os compostos nitrogenados importantes suplementos em processos fermentativos para o metabolismo da levedura, a extração destes compostos da borra de levedura se torna interessante do ponto de vista ambiental. Portanto, este capítulo tem como objetivo a otimização do processo de extração de compostos nitrogenados da borra de levedura de cervejaria através do tratamento com dispositivo ultrassônico. Realizou-se um planejamento fatorial Box Behnken, onde as variáveis estudadas foram tempo de extração (10, 20 e 30 minutos), porcentagem de amplitude do equipamento (20, 45 e 70 %), e a razão levedura/água (25:100, 40:100 e 55:100). O rendimento foi determinado conforme a extração de nitrogênio total kjeldhal. Através da metodologia de superfície de resposta e a função de desejabilidade foi possível determinar o ponto ótimo de extração, sendo sugerido conforme o planejamento o tempo de 30 minutos, razão levedura/água 55:100 e amplitude de 70%. O modelo foi validado, onde o valor observado se encontrou no intervalo de confiança de 95%. Desta forma, foi possível a otimização das condições para obtenção de um extrato nitrogenado com um rendimento de nitrogênio total kjeldahl de 90%.

Palavras chave: Box Behnken, metodologia de superfície de resposta, nitrogênio, ultrassom.

2.1 INTRODUÇÃO

A borra de levedura contém cerca de 50% de proteínas em sua composição, podendo ser considerada uma boa fonte de compostos nitrogenados (aminoácidos) (COSTA; CASTRO-GOMEZ, 2012) podendo este resíduo ser utilizado como suplemento de aminoácidos em processos fermentativos. Pois, sabe-se que em processos fermentativos o nitrogênio é um nutriente limitante para o crescimento das leveduras, sendo que, se o meio é deficiente deste nutriente a fermentação pode ser lenta ou ainda interrompida (ALBERTI et al., 2011).

A borra de levedura é considerada o segundo maior subproduto gerado em cervejarias, sendo utilizada principalmente para alimentação animal ou descartada de forma inadequada (sem inativação microbiológica) (FERREIRA et al., 2010). Este resíduo pode ser melhor reaproveitado através da extração dos compostos intracelulares da levedura, além de evitar um impacto ambiental. A extração de

compostos nitrogenados da borra de levedura pode ser efetuada por meio de tratamentos com dispositivo ultrassônico (BOSSIO; HARRY; KINNEY, 2008).

O ultrassom é uma tecnologia de grande potencial (LUQUE-GARCIA et al., 2003), então tem sido utilizado para transferência de massa e remoção de contaminantes para diferentes produtos e processos, podendo este ser escalonado (DEM'YANUSHKO et al. 2017; MUSIELAK; MIERZWA; KROEHNKE; 2016; MULET et al., 2003). Considerado um método que evita o uso de solventes tóxicos e diminui o tempo de extração em comparação com métodos de força de cisalhamento convencionais, acelerando a transferência de calor e massa (CHISTI; MOO-YOUNG, 1986). Além de ser relativamente de baixo custo e não perigoso (LUQUE-GARCIA et al., 2003).

Alguns fatores como tempo, temperatura, razão sólido/líquido, entre outros podem influenciar na extração de compostos (ANAYA-ESPARZA et al., 2017). Com isso, a utilização de ferramentas estatísticas como a metodologia de superfície de resposta e função de desejabilidade se tornam importantes para a otimização dos processos de extração.

Portanto, este capítulo tem como objetivo estudar a otimização da extração de compostos nitrogenados presentes na borra de levedura de cervejaria por meio do tratamento com dispositivo ultrassônico, a fim de obter um extrato nitrogenado para posterior aplicação em processos fermentativos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

A borra de levedura na forma úmida (80% de umidade) foi obtida na Microcervejaria Koch Bier situada em Ponta Grossa-Paraná. Foram utilizados 5 Kg de borra de levedura, proveniente das cepas *Saccharomyces cerevisiae* subsp *uvarum* (Draught, mauribrew, Queensland, Austrália) com 4 ciclos de fermentação.

O dispositivo ultrassônico utilizado foi o Sonics Vibra-cell com potência de 500 Watts, frequência 20 kHz (VC505, Newtown, USA), sonotrodo de 124 µm. A centrífuga utilizada foi a Centrífuga MPW Med. Instruments com potência de 600 Watts (MPW-351, Varsóvia, Polônia). Todos os reagentes químicos usados neste estudo foram de grau analítico.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 *Obtenção do extrato nitrogenado*

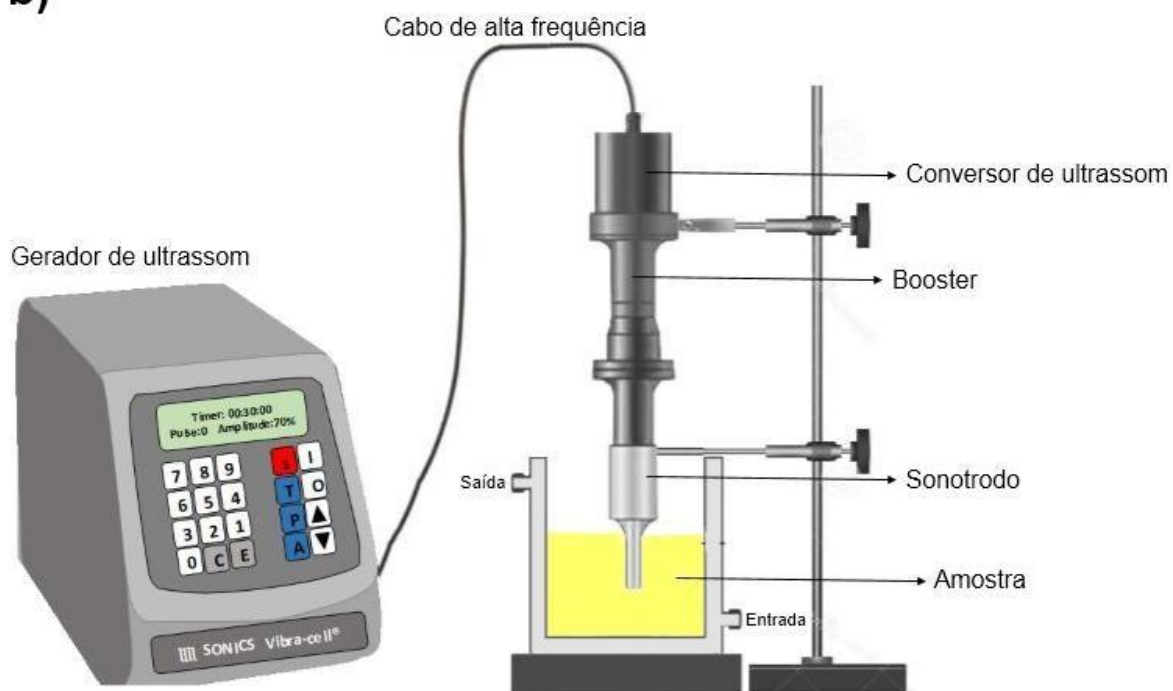
A borra de levedura obtida foi lavada com água destilada, agitada e centrifugada. Esse processo de lavagem foi repetido três vezes consecutivas para a retirada de resíduo de cerveja que poderia estar presente. Para a extração de compostos nitrogenados da borra de levedura por meio do tratamento com o dispositivo ultrassônico (Figura 2.1 a)) realizou-se um planejamento experimental Box Behnken (1960). A amostra foi acondicionada em béquer, com um sistema de resfriamento (conforme Figura 2.1 b)), o qual continha circulação de água, a temperatura foi mantida em torno de 26 ± 2 °C.

Figura 2.1 a) Dispositivo ultrassônico da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pertencente ao laboratório de pesquisa do curso de Engenharia de Materiais; b) Sistema de Ultrassom.

a)



b)



SISTEMA DE ULTRASSOM

Fonte: Autora.

Foram analisados 3 fatores (tempo de extração, razão levedura/água, e amplitude de onda do ultrassom) e 3 níveis (-1, 0, +1). Os níveis reais dos fatores independentes foram 10, 20 e 30 minutos para o tempo, 25:100, 40:100 e 55:100 para razão levedura/água (m/v) e 20, 45 e 70% de amplitude baseados em testes prévios. O planejamento experimental com os dados não codificados (reais) e codificados (entre parênteses) é dado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Planejamento experimental com os valores reais e codificados.

Experimentos	Amplitude (124 μm), x_1 (%)	Razão, x_2 (m/v)	Tempo, x_3 (min.)
1	20 (-1)	25:100 (-1)	20 (0)
2	70 (1)	25:100 (-1)	20 (0)
3	20 (-1)	55:100 (1)	20 (0)
4	70 (1)	55:100 (1)	20 (0)
5	20 (-1)	40:100 (0)	10 (-1)
6	70 (1)	40:100 (0)	10 (-1)
7	20 (-1)	40:100 (0)	30 (1)
8	70 (1)	40:100 (0)	30 (1)
9	45 (0)	25:100 (-1)	10 (-1)
10	45 (0)	55:100 (1)	10 (-1)
11	45 (0)	25:100 (-1)	30 (1)
12	45 (0)	55:100 (1)	30 (1)
13	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)
14	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)
15	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)

Quinze combinações foram formadas com 3 pontos centrais. Esses experimentos foram realizados em ordem randomizada.

2.2.2.2 Otimização da extração

Para avaliar a influência das variáveis independentes (tempo, amplitude e razão levedura/água) sobre a variável de resposta (teor de nitrogênio), foi utilizado o software Statistica® 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). A otimização do processo tomou-se como base o planejamento experimental de Box Behnken (PBB) (1960). O total de 15 corridas foi diferenciado pelos níveis em que cada uma das três variáveis se encontrava, seguindo a matriz de experimentos. Para facilitar a compreensão dos resultados encontrados nos experimentos determinados na matriz de planejamento, foi realizada análise de variância (ANOVA) com $p > 0,05$. A

metodologia de superfície de resposta foi aplicada para a determinação das condições ótimas para a extração de compostos nitrogenados juntamente com um modelo polinomial (Equação 1) para o ajuste dos dados experimentais.

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^k b_i x_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j b_{ij} x_i x_j + e_j \quad (1)$$

Onde y é a resposta predita, b_0 , b_i , b_{ii} , b_{ij} são os coeficientes de regressão para termos lineares e quadráticos. As variáveis independentes avaliadas foram denominadas x_1 : amplitude, x_2 : razão levedura/água e x_3 : tempo de extração (BRUNS; SCARMINO; BARROS NETO, 2006). Os termos não significativos pela ANOVA foram retirados do modelo, sendo os dados reajustados apenas para parâmetros significativos ($p < 0,05$). A qualidade dos ajustes foi avaliada por meio do p-valor (lack of fit), coeficiente de determinação (R^2) e seu R^2 ajustado.

Após a modelagem, utilizou a função de desejabilidade para a otimização. Uma forma de trabalhar as respostas é pela aplicação de uma função de desejabilidade. Este tratamento foi proposto por Derringer e Suich em 1980 e baseia-se na transformação de cada resposta individual em uma escala adimensional de desejabilidades individuais (d_i). A escala de desejabilidades individuais pode variar de 0 (para uma resposta inaceitável) a 1 (para a resposta desejada). Para a validação do modelo realizou-se um experimento com as condições ótimas preditas pelo modelo, afim de verificar o poder de predição do modelo desenvolvido. Os resultados foram avaliados pelos intervalos de predição ao nível de 95%.

2.2.2.3 Análises físico químicas

A análise de umidade da levedura bruta, borra de levedura, foi realizada conforme a metodologia descrita pela AOAC (2019). O nitrogênio total Kjeldahl foi determinado pelo método de micro Kjeldahl conforme AOAC (2019) e IAL (2008).

2.2.2.4 *Análise microscópica*

As amostras foram acondicionadas em um suporte metálico (Stub) e secas ao ar ambiente, por volta de 24 horas, então foram metalizadas (metalizador Quorum-SC7620, Inglaterra) sendo submetidas em seguida à observação e análise através de MEV-Microscopia Eletrônica de Varredura (Vega 3, Tescan, República Tcheca) antes e após o tratamento com o ultrassom (ponto ótimo definido através da otimização).

2.2.2.5 *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão amostral. As diferenças significativas dos valores médios entre os tratamentos foram analisados utilizando ANOVA unifatorial. O teste foi utilizado, quando aplicável, para comparar as médias ($p < 0,05$) dos dois tratamentos nas análises de nitrogênio total. Utilizou-se também o teste de Fisher, quando aplicável, para comparação de pares de média, com nível de significância de $p \geq 0,05$. Todos os dados foram analisados através do software Statistica® versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Otimização da extração de compostos nitrogenados da borra de levedura de cervejaria

O resultado da análise de nitrogênio total da amostra de levedura bruta após a sua lavagem foi de $17660,15 \pm 15,56$ mg/Kg, com umidade de $80 \pm 0,9$ %. Este valor indica o teor máximo de NTK (nitrogênio total Kjeldahl) que pode ser obtido nos extratos. Multiplicando o valor de nitrogênio total pelo fator 5,8 (MATHIAS et al., 2015) obtém-se ao redor de 51% de proteína em base seca. Pinto et al. (2013) destaca que a levedura residual apresenta caráter proteico entre 35 e 60%.

Os resultados obtidos entre os 15 experimentos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), logo, as variáveis independentes influenciam na extração de nitrogênio total Kjeldahl da borra de levedura (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 Teor de nitrogênio total Kjeldahl dos extratos nitrogenados, obtidos a partir da borra de levedura, dos 15 experimentos de extração conforme determinado pelo planejamento Box Behnken.

Experimentos	Amplitude (124 μm), x_1 (%)	Razão, x_2 (m/v)	Tempo, x_3 (min.)	NTK (mg/L)
1	20 (-1)	25:100 (-1)	20 (0)	5008 ⁿ $\pm$ 26
2	70 (1)	25:100 (-1)	20 (0)	12939 ^c $\pm$ 5
3	20 (-1)	55:100 (1)	20 (0)	5122 ^m $\pm$ 26
4	70 (1)	55:100 (1)	20 (0)	14149 ^b $\pm$ 54
5	20 (-1)	40:100 (0)	10 (-1)	3630 ^o $\pm$ 15
6	70 (1)	40:100 (0)	10 (-1)	10521 ^g $\pm$ 15
7	20 (-1)	40:100 (0)	30 (1)	6261 ^k $\pm$ 26
8	70 (1)	40:100 (0)	30 (1)	14804 ^a $\pm$ 26
9	45 (0)	25:100 (-1)	10 (-1)	6121 ^l $\pm$ 15
10	45 (0)	55:100 (1)	10 (-1)	7857 ^j $\pm$ 40
11	45 (0)	25:100 (-1)	30 (1)	9565 ^f $\pm$ 15
12	45 (0)	55:100 (1)	30 (1)	11605 ^d $\pm$ 30
13	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)	9349 ^h $\pm$ 35
14	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)	8974 ⁱ $\pm$ 17
15	45 (0)	40:100 (0)	20 (0)	9524 ^g $\pm$ 30

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os experimentos ($p < 0,05$). NTK= nitrogênio total Kjeldahl.

O teor de nitrogênio total Kjeldahl obtido entre os experimentos variou de 3630 a 14804 mg de nitrogênio por litro de extrato. O resultado obtido no ponto 8 resultou na extração de 84% de compostos nitrogenados do total encontrado na levedura bruta, sendo os parâmetros de extração desse ponto razão levedura/água 55:100, tempo de 30 minutos e amplitude do ultrassom de 70%. Enquanto que o experimento 5 obteve-se o menor resultado, sendo o experimento realizado com razão levedura/água 40:100, 10 minutos e 20% de amplitude do ultrassom. O experimento 4 obteve uma extração de 14149 mg de nitrogênio por litro de extrato, sendo este ponto interessante do ponto de vista econômico, pois, comparado ao experimento 8 extraiu apenas 5% a menos de nitrogênio com cerca de 30% do tempo de processo. O modelo para cada variável resposta proposto pela análise de regressão linear múltipla foi significativo ($p \geq 0,01$) e não apresentou falta de ajuste ($p > 0,05$). O modelo foi capaz de explicar 98% ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,987$) da variabilidade dos resultados na extração de compostos nitrogenados das células de levedura. As variáveis independentes que mostram significância foram os efeitos do coeficiente de regressão linear da amplitude, razão e tempo, obtendo-se o seguinte modelo de regressão linear múltipla (Equação 2):

$$y = 9029,22 + 4049,09 x_1 + 637,44 x_2 + 1762,98 x_3 \quad (2)$$

As variáveis independentes avaliadas foram denominadas x_1 : amplitude, x_2 : razão levedura/água e x_3 : tempo de extração. Em relação a porcentagem de amplitude de onda (x_1) do dispositivo ultrassônico, o qual está diretamente relacionado com o comprimento de onda do dispositivo, apresentou coeficientes de regressão linear com efeito positivo, indicando que quanto maior a amplitude maior será a extração de compostos nitrogenados. A amplitude foi o parâmetro que mais influenciou na extração dos compostos nitrogenados. Entretanto, dentro das condições utilizadas neste trabalho a máxima amplitude possível de ser operada é de 70%, para que a vida útil do dispositivo ultrassônico não seja afetada, conforme designação do fabricante. (SONICS & MATERIALS, INC, 2008).

O coeficiente de regressão linear significativo para a variável tempo (x_3) mostrou um efeito positivo, ou seja, quanto maior o tempo de extração maior será o rendimento obtido no processo. Isso se dá pelo fato de que quanto maior o tempo da amostra no dispositivo ultrassônico maior será a sua exposição ao processo de cavitação, o qual é o responsável pela ruptura e morte celular e consequentemente a exposição do conteúdo intracelular, facilitando a sua extração (RIESZ et al., 1985; CHEMAT et al. 2011). No entanto, o aumento do tempo de processo torna-se tecnicamente inviável, devido aos maiores custos do processo (energia e tempo).

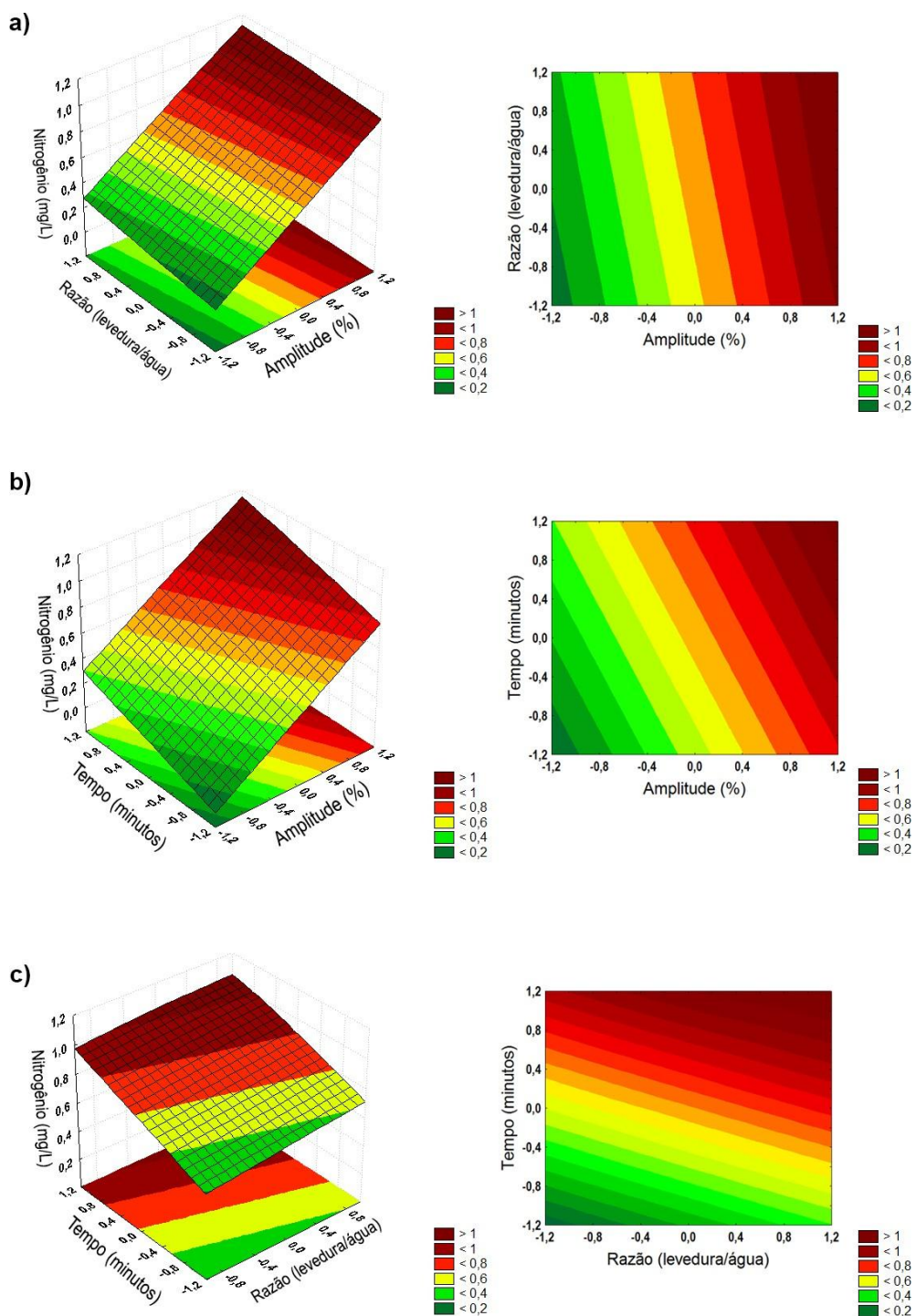
O parâmetro razão levedura/água (x_2) exerceu a menor influência no processo de extração, porém observou-se que assim como os demais parâmetros essa influência foi positiva, ou seja, quanto maior a razão levedura/água melhor será o processo de extração em termos de rendimento. De acordo com Yan et al. (2011), a razão sólido/líquido influencia positivamente na concentração final no produto a ser extraído. No entanto, o dispositivo ultrassônico limita-se a meios líquidos, ou seja, o aumento da razão levedura/água para este processo de extração com o dispositivo ultrassônico não seria vantajoso, já que o aumento da razão acarretaria também no aumento da viscosidade. À medida que a viscosidade do material aumenta, sua capacidade de transmitir vibrações diminui. Normalmente, a viscosidade máxima em que um material pode ser processado efetivamente é de 4 Pa.s (SONICS, 2017).

A natureza do solvente também pode afetar na extração (AZWANIDA et al., 2015). Leroy et al. (1990) na extração de compostos intracelulares de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizaram como solvente clorofórmio e tolueno. Porém, um

bom solvente segundo Azwanida et al. (2015) inclui baixa toxicidade, baixo ponto de ebulição, rápida transferência dos solutos, e incapacidade de gerar complexos dissociados. Para a escolha de um solvente segundo os autores deve-se levar em consideração a quantidade dos compostos extraídos, a taxa de extração, facilidade de manuseio, nível de toxicidade, o seu potencial de perigo para a saúde e meio ambiente. Na extração de compostos a substituição de solventes perigosos, tóxicos, voláteis e altamente inflamáveis por outros que apresentem propriedades ecológicas, de saúde e segurança tem sido cada vez mais recorrente, sendo uma prioridade na química verde (FLOREZ et al., 2015).

Foi possível prever as condições ótimas das variáveis, conforme a função de desejabilidade proposto por Derringer e Suich (1980), o qual é denominado o ponto ótimo de extração. O ponto ótimo é onde as somas dos efeitos das variáveis de estudo resultam no melhor rendimento do processo (ANDERSON, 2016). O ponto ótimo previsto, segundo a função de desejabilidade, é quando o processo de extração de compostos nitrogenados utiliza-se de uma razão levedura/água 55:100; tempo de extração de 30 minutos e porcentagem de amplitude de 70%. Como pode ser observado na Figura 2.2 e no modelo, o tempo e a razão levedura/água tem uma influência muito pequena comparada a influência da amplitude do equipamento na extração.

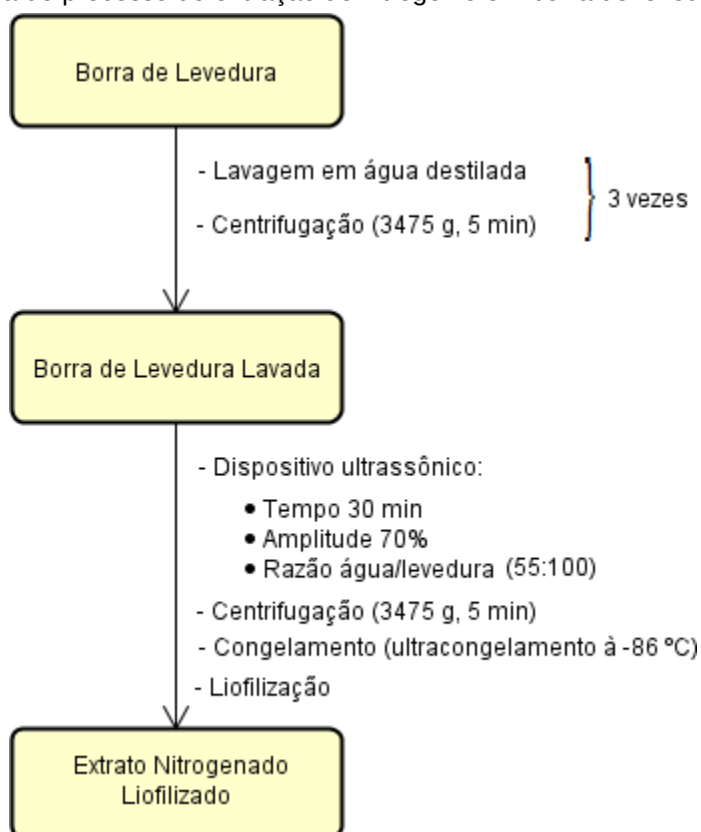
Figura 2.2 Superfície de resposta das variáveis independentes da extração de compostos nitrogenados. a) Relação entre Amplitude e razão (levedura/água). b) Relação entre Amplitude e tempo. c) Relação entre razão (levedura/água) e tempo.



O valor predito para a extração de nitrogênio total Kjeldahl, foi de 15478,0 mg/L. Para validação do processo, repetiu-se o experimento utilizando as condições ótimas prevista pelo modelo obtendo-se o teor de 15817 ± 1191 mg/L de compostos nitrogenados. Logo, podemos ver que o modelo foi validado, pois, o valor experimental obtido está dentro do intervalo de confiança de 95% (14696,27 mg/L a 16261,23 mg/L de nitrogênio total Kjeldahl).

Após a otimização de extração, onde obteve-se um rendimento de 90% de compostos nitrogenados, definiu-se um fluxograma do processo de extração de nitrogênio em borra de levedura de cervejaria conforme Figura 2.3.

Figura 2.3 Fluxograma do processo de extração de nitrogênio em borra de levedura de cervejaria.



Fonte: Autora

Após a obtenção dos compostos nitrogenados conforme visto anteriormente, optou-se por liofilizar o extrato (Figura 2.4), devido ao fato de prolongar a vida de prateleira do produto, além de facilitar o transporte e utilização do produto.

Figura 2.4: Extrato de levedura liofilizada

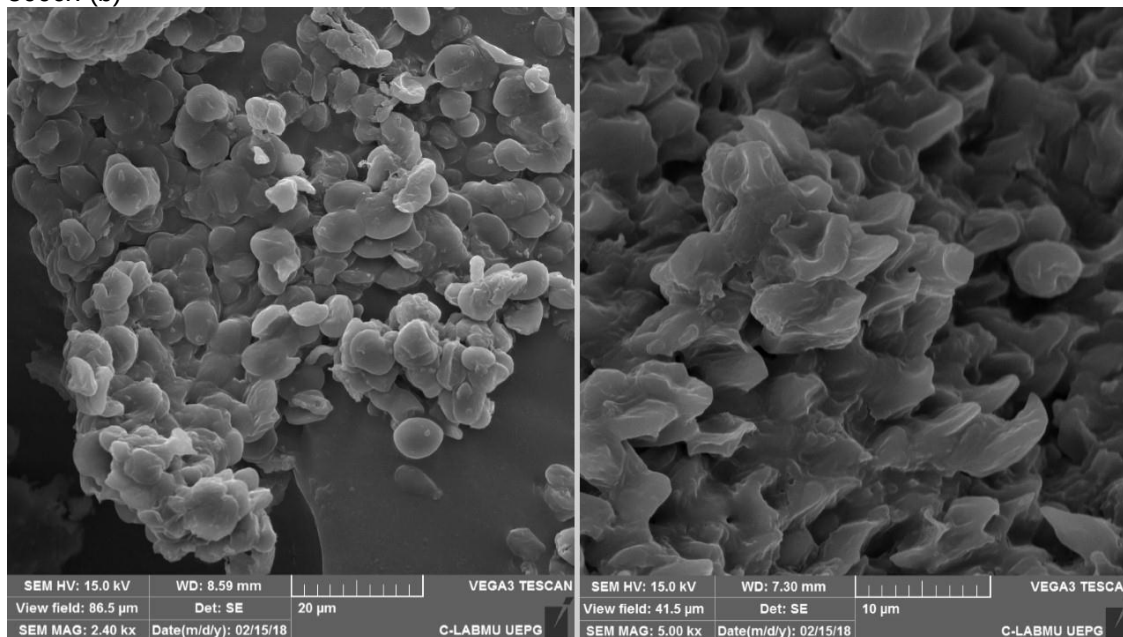


Foi observado que após as etapas de tratamento no dispositivo ultrassônico e centrifugação da levedura para se adquirir o extrato, obteve-se um menor volume de resíduo de levedura, ou seja, além do reaproveitamento do resíduo de cervejaria, reduziu-se em 78% o volume de resíduo de levedura gerado, sendo este podendo ser facilmente descartado pois através do tratamento no dispositivo ultrassônico há a inativação celular das leveduras, impedindo a proliferação das leveduras.

2.3.2 Análise microscópica

A desidratação das amostras ao ar ambiente possibilitou a observação das células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, o que indica que esse tipo de material biológico pode ser observado em MEV. Quando observadas sob um aumento de 2400 vezes (Figura 2.5 (a)), pode-se notar a presença de células inteiras e algumas células deformadas indicando sua autólise. Isto porque as células obtidas são oriundas de processos fermentativos de cervejaria, e contém células inviáveis. A lise celular pode ocorrer de forma natural de forma lenta, quando as células sofrem algum tipo de estresse, as membranas perdem sua capacidade de retenção e assim, o material intracelular se torna solúvel, extravasa pela parede celular, resultando em morte celular (TODD et al., 2000). Fatores químicos endógenos como o etanol e outros metabólitos tóxicos, como o acetaldeído, produzido por atividade fermentativa também podem ser letal para as células de levedura (WALKER; WHITE, 2017).

Figura 2.5 Micrografia de MEV da borra de levedura antes do tratamento com o dispositivo ultrassônico 2400x (a) e após o tratamento com o dispositivo ultrassônico utilizando as condições ótimas de extração 5000x (b)



Observa-se que na Figura 2.5 (b), aumentado em 5000 vezes, praticamente todas as células apresentam-se murchas ou deformadas, ou seja, indicando que o tratamento com o dispositivo ultrassônico foi eficiente na lise celular. Muitas membranas celulares foram destruídas. Danos às células foram distribuída de forma desigual, impossibilitando a quantificação de células por contagem na câmara de Neubauer. Os efeitos dos danos do ultrassom nos componentes celulares dependem das condições ultrassônicas, incluindo frequência, potência e temperatura sob o qual alguns microrganismos são completamente ou seletivamente esterilizado ou inativados (ANAYA-ESPARZA et. al, 2017). Adekunte et al. (2010) conseguiram uma redução de 5 log na morte celular de leveduras em suco de tomate, sem alterações significativas nas características organolépticas do suco. Os autores utilizaram um dispositivo ultrassônico na frequência de 20KHz, com um tempo de 7,5 minutos, com uma amplitude de 61 micrômetros. Um estudo do efeito do ultrassom na viabilidade celular em células *Saccharomyces cerevisiae* realizado por Wordon et al. (2012) obteve resultados satisfatórios. Os autores perceberam que após 5 minutos de tratamento no ultrassom 92% da população celular estava morta, eles utilizaram um dispositivo de 20 KHz, amplitude de 124 µm, não ultrapassando 35 °C, com tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos de tratamento. Os autores ainda, obtiveram resultados de

análise em microscopia eletrônica parecidos com as que se obteve nesse estudo. De forma geral, pode-se dizer com os resultados obtidos que o ultrassom tem grande potencial na ruptura celular em células de leveduras, podendo ser estudado e utilizado em extrações de outros componentes de interesse como enzimas, por exemplo. E também pode ser utilizado em alimentos nos quais as células *Saccharomyces cerevisiae* apresentam riscos de contaminação.

2.4 CONCLUSÃO

Foi possível otimizar as condições das variáveis de extração por meio do método de superfície de resposta o qual sugeriu que a extração seja conduzida utilizando uma amplitude de 70% da capacidade do ultrassom, razão levedura/água 55:100 (m/V) e tempo de 30 minutos. Dessa forma, o extrato de nitrogênio obtido em condições otimizadas pode ser utilizado como uma possível fonte de nitrogênio em processos fermentativos. Além disso, uma alternativa de reutilização do subproduto de cervejaria, contribuindo com o meio ambiente na redução de resíduos gerado (78% do volume).

CAPÍTULO 3: EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO NITROGENADO NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO EM MOSTO SINTÉTICO E MOSTO DE MAÇÃ

RESUMO

A *Saccharomyces* é um dos microrganismos mais utilizados em indústrias de bebidas alcoólicas. A sua capacidade fermentativa é influenciada por vários fatores, sendo os principais a fonte de carbono (açúcares) e nitrogênio. Por esse motivo, o objetivo do presente capítulo foi aplicar o extrato nitrogenado obtido de biomassa residual de cervejaria e avaliar seus efeitos durante alguns processos fermentativos. O extrato nitrogenado foi obtido em condições otimizadas de extração (potência 70%, tempo de 30 min. e razão levedura/água 55:100 (m/v). O extrato foi avaliado em mosto de glicose, mosto sintético e natural de maçã, sendo este último com diferentes cepas de leveduras. Para avaliar a capacidade fermentativa do extrato, diferentes concentrações do mesmo foram adicionadas em mosto sintético de maçã e mosto de glicose obtendo teores de nitrogênio de 0, 50, 75, 100, 125 e 150mg/L. Percebeu-se que quanto maior foi a adição do extrato melhor foram os parâmetros cinéticos de fermentação. Em um segundo experimento, ao mosto sintético foi adicionado de concentrações de 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio para analisar o crescimento populacional do meio e a evolução da composição físico química do mosto. Para avaliar a influência do extrato na produção de sidra, 3 processos fermentativos de sidra foram lançados em conjunto. O primeiro mosto foi adicionado da levedura Bouquet, o segundo Reims Champagne e o terceiro Aromatic, ambas com adição relativa de 100mg/L de nitrogênio no mosto. Os outros três experimentos foram realizados com as mesmas leveduras sem a adição do extrato. Os mostos de sidra e sintético foram fermentados sob as mesmas condições durante 15 dias. O processo foi interrompido nos dias 1, 3, 6, 10 e 15 para avaliar os efeitos da adição de extrato. Foi determinado os teores de açúcares, etanol, pH, acidez titulável e nitrogênio total Kjeldahl de todos os processos fermentativos. Além disso, foi avaliada a intensidade dos atributos sensoriais: qualidade e intensidade de odor e qualidade das sidras sem e com adição de extrato. A adição do extrato melhorou os parâmetros cinéticos de fermentação, tornando a fermentação mais eficiente em todos os experimentos. Os melhores resultados de cinética para o mosto de glicose e sintético se deu para as amostras adicionadas de 150 mg/L de nitrogênio na forma de extrato de levedura, ou seja, para a maior concentração de extrato adicionada. Verificou-se que na produção de sidras independente da levedura a ser utilizada o extrato nitrogenado influência de forma positiva na sua fermentação não alterando a qualidade da bebida. Portanto, a adição do extrato melhorou os parâmetros cinéticos de todos os processos fermentativos, aumentando a produção de etanol e gás carbônico. Na produção de sidra o extrato não alterou a qualidade sensorial da bebida podendo ser esta uma estratégia econômica de produtividade para indústrias do ramo de bebidas alcoólicas.

Palavras-chave: Resíduo cervejeiro; sidra; análise sensorial.

3.1 INTRODUÇÃO

Nos processos fermentativos de bebidas alcoólicas, sabe-se que as condições

de fermentação como a qualidade da matéria prima e a cepa de levedura podem variar, sendo fatores que podem causar mudanças na qualidade e que mais tarde pode-se tornar aparente no aroma do produto (HOLT et al., 2018).

O inóculo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* na indústria de bebidas alcoólicas tem sido uma prática comum, empregada há anos, sendo um dos fatores mais importantes em fermentações (EDGARDO et al., 2008). A capacidade da levedura em produzir etanol depende de muitos fatores, como macro e micronutrientes e fatores ambientais. Carbono e nitrogênio são os principais nutrientes nos meios de fermentação (ALBERS et al., 1996).

A levedura é capaz de utilizar diversos compostos nitrogenados como aminoácidos, pequenos peptídeos, bases nitrogenadas (purínicas e purimidínicas), uréia, amônia, utilizando-se de vários sistemas de transporte e absorção (HENSCHKE; JIRANEK, 1994). Lopez et. al (1970) relataram que o nitrogênio orgânico assimilado pelas leveduras são aminoácidos, amidas e peptídeos de baixo peso molecular, sendo o nitrogênio orgânico o mais adequado à incorporação de nitrogênio que os substratos amoniacaais. Em fontes de nitrogênio orgânico são encontrados uma mistura adequada de aminoácidos, que podem ser utilizados diretamente pela levedura para a síntese de proteínas sem desaminação prévia.

A levedura em crescimento assimila diretamente cerca de 80% do nitrogênio à partir de aminoácidos (BELL et al., 2005). Durante a fase de crescimento da levedura, o nitrogênio é rapidamente assimilado, pois fornece precursores para a síntese de aminoácidos e ácidos nucleicos, contribuindo para as altas taxas de crescimento e produção de biomassa, e estimulando a atividade fermentativa (HENSCHKE; JIRANEK, 1994; PULZATTO, 2000). O teor de nitrogênio afeta tanto o crescimento das leveduras como influencia a taxa de produção de etanol. O transporte de açúcares é regulado pela presença de nitrogênio assimilável no meio e pela síntese proteica das células (WALKER, 1998). Se a síntese de proteínas diminuir ocorre uma diminuição do sistema de transporte celular, assim como a redução do transporte de açúcares para dentro da célula. Esta diminuição da atividade metabólica celular, pode ainda ser maior quando há ausência ou carência de nitrogênio no meio (SALMON; MAURICIO, 1994). Porém, se a adição de nitrogênio não for tardia, pode restaurar a atividade metabólica da levedura e consequentemente a atividade fermentativa (BELY et al., 1994).

As composições da matéria prima, para produção de sidras, podem variar

dependendo das cultivares, grau de maturação e condições climáticas (SYMONEAUX et al., 2015; DRILLEAU et al., 1999). A complementação nitrogenada do mosto pode constituir uma prática benéfica na multiplicação e no crescimento celular do fermento, e conseqüentemente para a melhoria dos índices de eficiência, rendimento e produtividade do processo (RIBEIRO; LOPES; FERRARI, 1987).

O conteúdo de aminoácidos presente no meio fermentativo também está relacionado com a formação de compostos voláteis em sidra (SANTOS et al., 2015). Os aminoácidos encontrados nos mostos iniciais de maçã são os mais relevantes precursores e intermediários para a formação de aroma (ARDO, 2006). Santos et al. (2015) verificou que sidras processadas com baixo teor de nitrogênio ou aminoácidos obtiveram fermentação lenta e cerca de 50% menos compostos voláteis. Sendo o ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico e alanina significativos na formação de compostos voláteis que fazem parte da estrutura do aroma frutado em sidras (SANTOS et al., 2015). Uma vez que o aroma frutado é um dos principais aspectos de qualidade sensorial da sidra (XU et al., 2006).

Portanto, a adição de extrato de levedura no seu processo fermentativo se torna uma medida interessante de padronização do processo de fermentação. Sendo assim, a aplicação de extrato de levedura pode afetar a efetividade e rendimento da fermentação, bem como melhorar as características sensoriais da sidra. Portanto, este capítulo tem como objetivo avaliar a adição do extrato nitrogenado obtido de resíduo de cervejaria como suplemento em processos fermentativos e avaliar a sua influência na cinética de fermentação e qualidade sensorial do odor da sidra com diferentes tipos de cepas de leveduras.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Materiais

O extrato de levedura foi obtido através da otimização da extração de compostos nitrogenados. A extração dos compostos nitrogenados foi realizada conforme as condições otimizadas do Capítulo 2 (item 2.3.1) com uma razão levedura/água 55:45, tempo de extração de 30 minutos e porcentagem de amplitude de 70%, por meio do tratamento com dispositivo ultrassônico. O dispositivo ultrassônico utilizado foi o Sonics Vibra-cell com potência de 500 Watts, frequência 20

kHz (VC505, Newtown, USA). A borra de levedura na forma úmida (80% de umidade) foi obtida na Microcervejaria Koch Bier situada em Ponta Grossa-Paraná. Foram utilizados 5 Kg de borra de levedura, proveniente das cepas *Saccharomyces cerevisiae* subsp *uvarum* (Draught, mauribrew, Queensland, Austrália) com 4 ciclos de fermentação. A centrífuga utilizada foi a Centrifuga MPW Med. Instruments com potência de 600 Watts (MPW-351, Varsóvia, Polônia).

Foram utilizadas maçãs da cultivar Gala adquiridas no comércio local, município de Ponta Grossa (25° 05' 42" S 50° 09' 43" O) (Paraná, Brasil). Os microrganismos utilizados como inóculo para as fermentações alcoólicas na forma seca ativa foram *Saccharomyces cerevisiae* Fermol Reims Champagne (ref. PB 2002, AEB Group, Bréscia, Itália), Fermol Aromatic (ref. PB 2540, AEB Group, Bréscia, Itália) e Fermol Bouquet (ref. PB 2004, AEB Group, Bréscia, Itália). O ultracongelador utilizado foi da NUARE (NU-9668GC, Minnesota, USA). O Liofilizador utilizado para a liofilização do extrato foi da marca TERRONI (LS3000, SP, Brasil). Todos os reagentes químicos usados neste estudo foram de grau analítico. O pH das sidras foi determinado utilizando phmetro de bancada (Tecnal, TEC 3- MP, SP, Brasil).

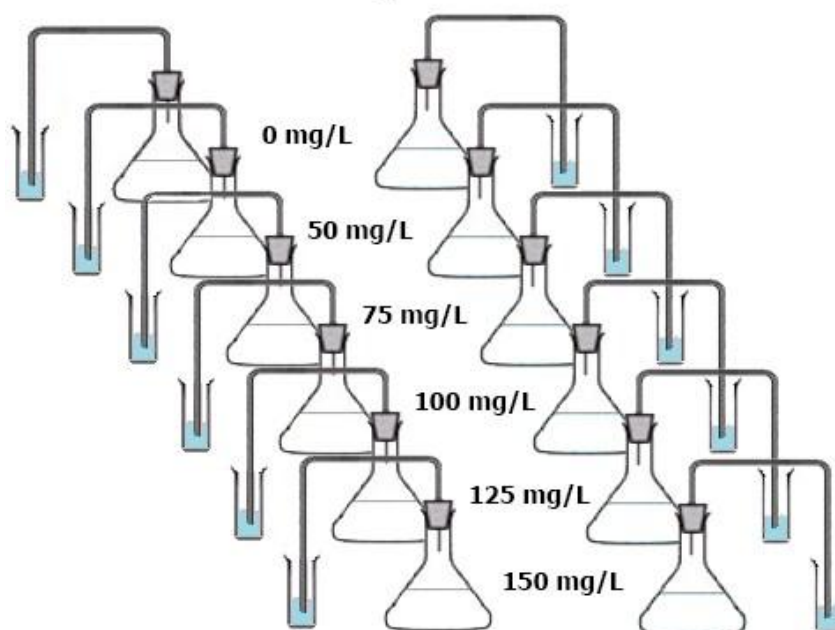
3.2.2 Métodos

3.2.2.1 Avaliação do extrato na solução de glicose

Foi elaborado um mosto que consistiu de uma solução de glicose a 120g/L (Figura 3.1) para observar inicialmente como o extrato influencia na fermentação.

Figura 3.1 Fermentadores de bancada com mosto de glicose 120g/L adicionado de nitrogênio na forma de extrato nas concentrações indicadas.

Mosto de Glicose 120 g/L



O mosto foi dividido em 12 fermentadores de bancada (erlenmeyers higienizados) de 450 mL de volume útil munidos de batoque, onde ocorreu o processo fermentativo. Nesse primeiro experimento, o volume de extrato nitrogenado líquido necessário para obter a concentração de nitrogênio (0, 50, 75, 100, 125 e 150 mgN/L) requerida foi liofilizado. Essa quantidade calculada de extrato liofilizado foi dissolvida no mosto. Nos fermentadores foram adicionados o extrato liofilizado com o equivalente as seguintes concentrações de nitrogênio: 0 (amostra controle), 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L. Em seguida, foram inoculados 20 g/hL de levedura seca ativa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae* r.f. Fermol Reims Champagne, previamente hidratada conforme recomendação do fabricante, em cada fermentador. Este inóculo correspondeu a uma população inicial de $1,0-2,0 \times 10^6$ UFC/mL. A fermentação foi conduzida em temperatura de 23 ± 2 °C durante 18 dias.

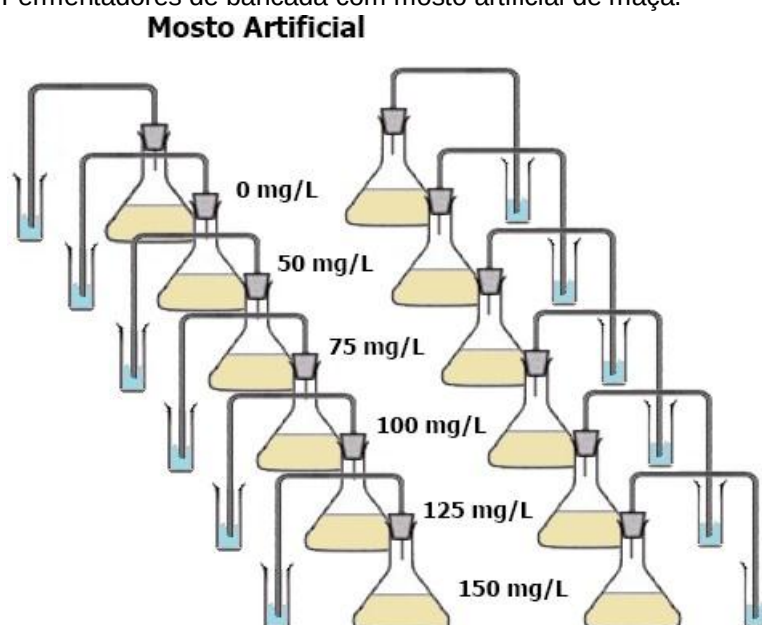
3.2.2.2 Avaliação do extrato em mosto sintético de maçã

O mosto sintético de maçã foi produzido de acordo com Santos et. al (2016). Este mosto foi composto por 89,63 g de glucose, 38,97 g de frutose, 2,43 mg de ácido málico, 20 mg de mioinositol, 2 mg de ácido nicotínico, 1,5 mg de ácido pantotênico, 0,25 mg de tiamina, 0,25 mg de piridoxina, 0,1 mg de biotina (as vitaminas foram

adicionadas sem agitar a mistura), 750 mg fosfato de potássio di-hidratado, 252 mg de sulfato de potássio, 99 mg de sulfato de magnésio heptahidratado, 155 mg de cloreto de cálcio di-hidratado, 200 mg de cloreto de cálcio, 4 mg de sulfato de manganês monohidratado, 4 mg de sulfato de zinco heptahidratado, 1 mg de sulfato de cobre pentahidratado, 1 mg de iodeto e potássio, 0,5 mg de cloreto de cobalto hexahidratado, 1 mg de ácido bórico, 1 mg de molibdato de amônio, e água destilada para completar 1 litro de mosto.

Realizou-se um primeiro ensaio, no qual, o mosto foi dividido em 12 fermentadores de bancada (erlenmeyers higienizados) de 450 mL de volume útil munidos de batoque, onde ocorreu o processo fermentativo, Figura 3.2. O volume de extrato nitrogenado líquido necessário para obter a concentração de nitrogênio (0, 50, 75, 100, 125 e 150 mgN/L) requerida foi liofilizado e dissolvido no mosto. Em seguida foram inoculados 20 g/hL de levedura seca ativa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae* r.f. Fermol Reims Champagne, previamente hidratada conforme recomendação do fabricante, em cada fermentador. Esta inóculo correspondeu a uma população inicial de $1,0\text{-}2,0 \times 10^6$ UFC/mL. A fermentação foi conduzida na temperatura de 23 ± 2 °C durante 18 dias.

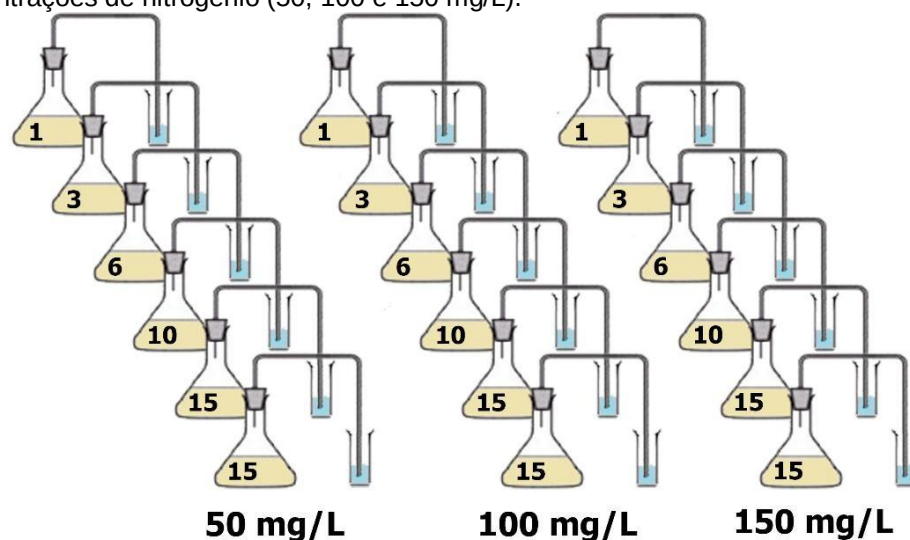
Figura 3.2 Fermentadores de bancada com mosto artificial de maçã.



Após analisar a capacidade fermentativa do extrato no mosto sintético de maçã definiu-se repetir o experimento para estudar a cinética de fermentação no mosto em alguns pontos da fermentação (dias). Nesse experimento optou-se por liofilizar o

extrato, para depois pesar a quantidade de extrato em pó necessário para adquirir as concentrações de nitrogênio requerida no experimento (50, 100 e 150 mgN/L). O mosto foi dividido em 15 fermentadores de bancada (erlenmeyers higienizados) de 450 mL de volume útil munidos de batoque, onde ocorreu o processo fermentativo. Esses fermentadores foram divididos em 3 grupos, onde cada grupo de 5 fermentadores recebeu uma concentração de nitrogênio conforme a Figura 3.3. O inóculo, assim como as condições de fermentação foram os mesmos dos experimentos anteriores. Após 1, 3, 6, 10 e 15 dias a fermentação foi interrompida, sendo retirado um fermentador de cada experimento para análises. Os dias também representam a identificação das amostras.

Figura 3.3 Fermentadores de bancada com mosto sintético de maçã adicionado de extrato com diferentes concentrações de nitrogênio (50, 100 e 150 mg/L).



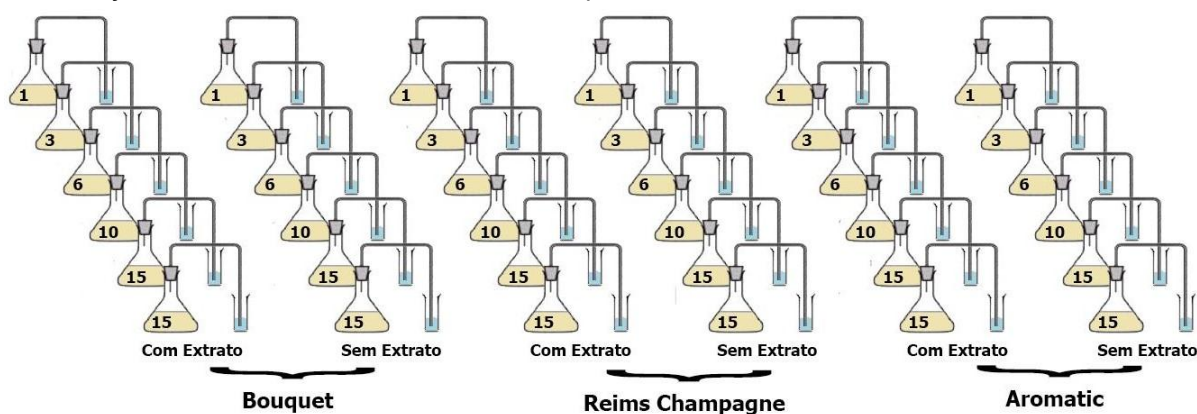
3.2.2.3 Avaliação do extrato em mosto de maçã

Após a análise cinética em mosto sintético de maçã, realizou um outro experimento do mosto natural de maçã. Para a elaboração da sidra primeiramente as maçãs obtidas foram selecionadas, eliminando as frutas danificadas. Em seguida, foram lavadas em água corrente e sanitizadas em solução de cloro a 200 mg/L por 15 minutos a 5 °C. Após corretamente higienizadas, as maçãs foram trituradas em processador (MET Visa, Tipo MPA, Brusque, Santa Catarina, Brasil), acondicionadas em telas de polipropileno (diâmetro de fio de 33 BWG - Vonder) para prensagem em Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil, à pressão de 3,0 kgf/cm² durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado por meio da adição de pectinase (Pectinex

Ultra Clear, Novozymes do Brasil) na concentração de 3,0 mL/hL, durante 60 minutos a 40 °C. Em seguida da despectinização o mosto foi trasfegado após a sua sedimentação.

Este mosto foi dividido em 3 grupos, para que fosse possível avaliar o efeito do extrato nitrogenado com 3 diferentes cepas de levedura. Para o primeiro processo fermentativo foi utilizado a levedura Bouquet, para o segundo a levedura Reims Champagne e para o terceiro a levedura Aromatic. As três leveduras foram fermentadas na ausência e presença de extrato nitrogenado para avaliar a diferença na cinética de fermentação. Foram utilizados fermentadores (erlenmeyers higienizados) de 250 mL de volume útil munidos de batoque, onde ocorreu os processos fermentativos. A fermentação foi conduzida em temperatura de 23 ± 2 °C durante 15 dias. Nos dias 1, 3, 6, 10 e 15 a fermentação foi interrompida, sendo retirado um fermentador de cada experimento para análises. Os dias também representam a identificação das amostras, conforme figura 3.4, a amostra 15 foi realizada em duplicata.

Figura 3.4 Fermentadores de bancada na ausência e presença de extrato nitrogenado para fermentação de sidra utilizando três diferentes cepas de levedura.

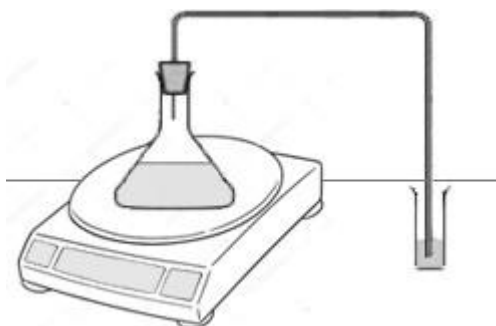


Nos fermentadores adicionados de extrato a concentração relativa de nitrogênio foi de 100 mg/L. Em seguida foram adicionados 20 g/hL de levedura seca ativa (LSA) *Saccharomyces cerevisiae*, onde cada lote recebeu uma cepa de levedura diferente conforme a figura acima, previamente hidratada conforme recomendação do fabricante. Cada inóculo correspondeu a uma população inicial de $1,0-2,0 \times 10^6$ UFC/mL.

3.2.2.4 Cinética de fermentação

Em todos os experimentos o processo fermentativo foi monitorado pela perda de peso dos mostos em fermentação devido a liberação de gás carbônico (CO_2 g/L) pelo batoque, Figura 3.5. A partir destes dados foi realizado um alisamento polinomial e calculada a velocidade máxima ($d\text{CO}_2/dt$) em dias, tempo máximo de fermentação (dias) e liberação de CO_2 (g) por litro de mosto, conforme Alberti et al. (2011).

Figura 3.5 Fermentador de bancada com sistema de batoque.



Fonte: Autora.

3.2.2.5 Análises físico-químicas

O mosto fermentado de cada tratamento foi centrifugado por 15 minutos a 3475 g para a retirada das leveduras. O nitrogênio total Kjeldahl foi determinado pelo método de micro Kjeldahl conforme AOAC (2019) e IAL (2008). O teor de açúcares redutores totais foi determinado pelo método Somogyi-Nelson (MALDONADE et al., 2013). O teor alcoólico das amostras foi determinado por leitura em ebuliômetro devidamente calibrado com água destilada pelo método de ebuliometria (CURVELO-GARCIA, 1980). A acidez total titulável foi expressa em ácido málico e determinada pela neutralização com NaOH 0,1N até pH 8,33 com fenolftaleína (AOAC, 2016). O pH das sidras foi determinado utilizando potenciômetro de bancada (Tecnal, TEC 3-MP, SP, Brasil).

3.2.2.6 Contagem de leveduras

A contagem de células viáveis do mosto sintético de maçã com concentrações de 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio foram realizados em câmara de Newbauer (XB-K-25, SMIC, China), pelo método de contagem direta em microscópio óptico, utilizando

o corante azul de metileno segundo Bonneu et al. (1991). Para obter o número de células/mL, multiplicou-se o valor obtido por 10.000, pois: 1 ml = 1 centímetro cúbico, 1 centímetro cúbico = $10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$. Na câmara de Neubauer obtemos o número de células por $0,1 \text{ mm}^3$, então multiplica-se por 10, portanto $10 \times 1.000 = 10.000$. Se houver diluição, multiplica-se ainda, o resultado pela diluição da amostra.

3.2.2.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi iniciada após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP 62047516.3.0000.0105) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). A análise foi realizada no laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa. A sensorial consistiu de dez (10) julgadores selecionados (com idades entre 22 e 42), os quais, apreciavam e consumiam esse tipo de bebida com frequência. Os julgadores receberam informações sobre a elaboração do produto e não apresentavam problemas de saúde nem faziam uso de medicamentos que impediam o consumo de bebida alcoólica. A análise sensorial foi realizada de acordo com Benvenuti et al. (2019) com adaptações. Os atributos avaliados conforme figura 3.5, foram qualidade de odor, qualidade da bebida e intensidade de odor.

Os julgadores receberam amostras codificadas de sidras produzidas com maçãs da cultivar Gala, com 3 diferentes cepas de levedura (conforme descrito no item 3.2.2.4). As amostras consistiam em sidras produzidas com adição do extrato nitrogenado nas concentrações de 100 mg/L de nitrogênio e sem a adição do extrato nitrogenado. Os atributos foram avaliados em triplicata. Para avaliação da intensidade da bebida definiu-se uma escala de 5 pontos partindo do “Muito fraco” para o “Muito forte”. Para avaliação da qualidade de odor e qualidade da bebida definiu-se uma escala de 5 pontos partindo do “Excelente” para o “Péssimo” conforme descrito nas fichas sensoriais (Apêndice A).

3.2.2.8 Estatística

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão amostral. As diferenças entre as amostras foram avaliadas por meio da análise de variância

(ANOVA), seguido de teste de médias de Fischer LSD quando aplicável. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software STATISTICA® versão 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em solução de glucose

Realizou-se inicialmente um experimento fermentativo em um mosto simples contendo água e glucose (120g/L) para avaliar a influência do extrato na composição do meio e processo fermentativo. Segundo Alberti et al., (2011) o nitrogênio assimilável afeta a cinética de fermentação em concentrações superiores a 75 mg/L podendo evitar fermentações lentas. Partindo deste dado o mosto foi adicionado de extrato nitrogenado de levedura nas concentrações relativas de 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L de nitrogênio, no início da fermentação. Nota-se na Tabela 3.1 que a concentração de nitrogênio após a adição do extrato, antes da fermentação, teve uma pequena variação da concentração adicionada. Esta variação pode ser explicada devido ao extrato ser calculado o volume de extrato a ser adicionada (0, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L) na forma líquida e depois ser liofilizado para então ser adicionado no mosto de glicose.

Em relação ao nitrogênio total adicionado, o teor diminuiu durante a fermentação, uma vez que é um nutriente essencial para o desenvolvimento das leveduras. Isso se deve ao seu consumo pelas leveduras usado para seu crescimento e multiplicação celular. O nitrogênio residual variou de 11 a 51 mg/L de nitrogênio ao final da fermentação.

Através do monitoramento de perda de massa dos fermentadores durante a fermentação do mosto de glicose 120g/L, foi determinado os parâmetros cinéticos, sendo eles a taxa de gás carbônico liberado e velocidade máxima de fermentação. Na Tabela 3.1, nota-se que a velocidade de fermentação máxima aumentou conforme a concentração de extrato nitrogenado adicionada, ou seja, quanto maior foi a adição do extrato de nitrogênio maior foi a velocidade de fermentação ($\text{gCO}_2/\text{L}/\text{dia}$).

Observa-se que a amostra que teve a maior adição de extrato de nitrogênio, 150 mg/L, obteve uma maior velocidade de fermentação de 6,6 $\text{gCO}_2/\text{L}/\text{dia}$, logo, pode-se dizer que a concentração de nitrogênio no mosto influencia diretamente na

velocidade máxima de fermentação e demais parâmetros cinéticos. Isto porque, o nitrogênio influi na reprodução de leveduras, sendo grande parte do suplemento de nitrogênio usado para o crescimento da levedura, o que favorece a fermentação aumentando a taxa de produção etanol e eficiência da fermentação (BASSO et al., 1996).

Tabela 3.1 Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto de glicose 120g/L após 18 dias de fermentação.

Concentração de extrato (mgN/L)	Concentração de nitrogênio Inicial (mg/L)	NTKf (mg/L)	CO2 liberado (g/L)	V _{máx} (gCO ₂ /L/d)	Tempo de V _{máx} (d)	ART (g/L)	Etanol (°GL)	pH	Acidez (g/100mL)
0	11,00 ± 1,73	11,00e ± 1,73	2,6	No	No	8,65a ± 0,01	0,40f ± 0,10	3,36a ± 0,01	0,03e ± 0,01
50	43,00 ± 1,73	29,00d ± 1,73	20,3	No	No	8,71a ± 0,01	0,97e ± 0,06	3,18d ± 0,01	0,08d ± 0,01
75	61,00 ± 2,99	38,00c ± 4,58	32,1	1,9	1	4,73c ± 0,01	2,13d ± 0,23	3,33b ± 0,01	0,10e ± 0,01
100	86,00 ± 1,73	39,00c ± 3,00	32,2	2,6	1	5,08b ± 0,01	2,73c ± 0,15	2,95f ± 0,01	0,15a ± 0,01
125	105,00 ± 1,73	48,00b ± 3,00	62,8	4,7	0,1	1,26d ± 0,01	4,97b ± 0,06	3,12e ± 0,01	0,14a ± 0,01
150	132,00 ± 5,99	51,00a ± 3,00	68,3	6,6	0,1	0,21e ± 0,01	5,60a ± 0,10	3,25c ± 0,01	0,14a ± 0,01

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). mgN/L = miligramas de nitrogênio por litro de mosto; NTKf= nitrogênio total Kjeldahl ao final da fermentação; V_{máx}= velocidade máxima de fermentação; ART= açúcares redutores totais; nd=não detectado.

É de grande interesse avaliar a demanda de nitrogênio de um mosto com deficiência desse nutriente, pois o tempo de fermentação está intimamente relacionado com a capacidade das leveduras de assimilar o nitrogênio eficientemente (JULIEN et al., 2000).

Na amostra controle onde a concentração de nitrogênio adicionada foi zero, não houve uma velocidade máxima de fermentação, consequentemente também não houve o tempo de velocidade máxima (dias), pois, a fermentação ocorreu de forma crescente isso porque sem a adição de nitrogênio a fermentação ocorreu de forma lenta, não existindo um pico de velocidade como observado nas demais amostras. Porém, mesmo em um meio sem suplementação de nitrogênio houve uma perda de massa. Segundo Nogueira; Wosiacki (2010) as principais fontes de carbono e energia são os açúcares solúveis, e a concentração de 120 g/L é suficiente para permitir que o crescimento da levedura atinja em torno de $6,0 \times 10^7$ células / mL. Portanto, apesar de não haver a suplementação de nitrogênio, havia ainda a suplementação de carbono no meio, na forma de açúcares, 120g/L de glicose. Assim, apesar de reduzir o rendimento e a viabilidade celular, as leveduras conduziram uma fermentação lenta.

O açúcar redutor total residual para a amostra adicionada de 150 mg/L de nitrogênio, dentre todas as amostras foi menor.

O transporte de açúcares é regulado pela disponibilidade de nitrogênio assimilável no meio, e pela atividade de síntese proteica das células (WALKER, 1998). No momento em que o consumo de nitrogênio diminui, ocorre a diminuição do transporte de açúcares. A adição de nitrogênio se não for tardia, restaura a atividade fermentativa (BELY et al., 1994). Isso explica porque nos mostos com elevado teor de nitrogênio a velocidade de fermentação será maior, assim, como o consumo do açúcar.

Percebe-se que quanto menor os valores de açúcares redutores totais presentes no final da fermentação, maior foi as concentrações de etanol produzido. O nitrogênio auxilia no transporte de açúcares para dentro das células, portanto, quanto maior for a disponibilidade de nitrogênio assimilável no meio, maior a transferência de açúcares para dentro das células, como consequência houve maior conversão de açúcar para produção de etanol. Observa-se que a formação de etanol foi de forma crescente conforme a adição de nitrogênio no mosto.

Santos (2008) avaliou a influência de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação em batelada com três produtos comerciais diferentes (A, B e C) sendo o

que o produto que obteve maior formação de etanol foi o produto comercial C que continha maior quantidade de nitrogênio, assim como também teve maior eficiência de fermentação.

O pH do mosto foi padronizado entre 3,4 a 3,6. Entretanto, ao final da fermentação houve uma redução do pH, Tabela 3.1. O pH do mosto variou de 2,95 a 3,36. Como o mosto de glicose é um meio menos complexo, essa formação de ácidos pode não ser tão significativa, não havendo grandes alterações de pH durante a fermentação.

Em relação aos teores de acidez total titulável expresso em ácido málico (Tabela 3.1), o mosto apresentou teores considerados baixos ($< 0,45$ g/100mL).

3.3.2 Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em mosto sintético de maçã

Após verificar a influência do extrato no mosto de glicose, realizou-se um experimento com um mosto mais complexo, sendo este o mosto sintético de maçã. Assim como o mosto de glicose, no mosto sintético a concentração de nitrogênio antes de proceder a fermentação, após a adição do extrato teve uma pequena variação da concentração adicionada. Esta variação pode ter ocorrido devido ao extrato ser calculado na concentração a ser adicionada (0, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L) na forma líquida e depois ser liofilizado para então ser adicionado nos mostos.

Em relação ao nitrogênio total, o teor de nitrogênio diminuiu durante a fermentação assim como no experimento anterior (Tabela 3.2), isso se deve ao seu consumo pelas leveduras usado para seu crescimento e multiplicação celular. O nitrogênio residual variou de 15 a 40 mg/L.

Através do monitoramento de perda de massa dos fermentadores foi possível obter os parâmetros cinéticos, a taxa de gás carbônico liberado, tempo máximo e velocidade máxima de fermentação. Na Tabela 3.2, nota-se que a velocidade de fermentação máxima aumentou conforme a concentração de extrato nitrogenado adicionada, assim como no experimento anterior.

Tabela 3.2 Parâmetros cinéticos e físico-químicos do mosto sintético de maçã (18 dias de fermentação).

Concentração de extrato (mgN/L)	Concentração de nitrogênio Inicial (mg/L)	NTKf (mg/L)	CO2 liberado (g/L)	V _{máx} (gCO ₂ /L/d)	Tempo de V _{máx} (d)	ART (g/100mL)	Etanol (°GL)	pH	Acidez (g/100mL)
0	18,00 ± 0,0	15,00 ^e ± 0,0	12	nd	Nd	10,40 ^a ± 0,27	1,03 ^d ± 0,15	3,18 ^a ± 0,01	0,13 ^d ± 0,01
50	52,00 ± 6,24	23,00 ^c ± 1,73	59,7	3,9	1,5	0,53 ^b ± 0,04	5,23 ^c ± 0,21	2,99 ^b ± 0,01	0,20 ^b ± 0,01
75	72,00 ± 3,00	18,00 ^d ± 0,00	70,8	6,1	1	0,55 ^b ± 0,01	6,00 ^b ± 0,17	3,02 ^c ± 0,01	0,19 ^c ± 0,01
100	91,00 ± 3,46	28,00 ^b ± 3,46	71	7,6	1	0,11 ^c ± 0,01	6,47 ^a ± 0,15	3,07 ^d ± 0,01	0,20 ^b ± 0,01
125	112,00 ± 4,58	28,00 ^b ± 1,73	69,6	9,9	1	0,07 ^c ± 0,01	6,37 ^a ± 0,12	3,12 ^e ± 0,01	0,20 ^b ± 0,01
150	140,00 ± 4,58	40,00 ^a ± 4,58	70,6	13,1	0,1	0,07 ^c ± 0,01	6,27 ^{ab} ± 0,15	3,18 ^a ± 0,01	0,21 ^a ± 0,01

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). mgN/L = miligramas de nitrogênio por litro de mosto; NTKf= nitrogênio total Kjeldahl ao final da fermentação; V_{máx}= velocidade máxima de fermentação; ART= açúcares redutores totais; nd= não detectado.

A amostra adicionada de extrato com 150 mg/L de nitrogênio, obteve uma velocidade de fermentação de 13,1 gCO₂/L/dia. Isto porque, o nitrogênio influi na reprodução de leveduras, sendo grande parte do suplemento de nitrogênio usado para o crescimento da levedura, o que favorece a fermentação aumentando a taxa de produção etanol e eficiência da fermentação (BASSO et al., 1996).

Observa-se ainda que a amostra controle do mosto sintético teve uma maior perda de gás carbônico comparada a amostra controle do mosto de glicose do experimento anterior, 12 e 2,6 g/L respectivamente, isto também pode ser explicado pelo fato de o mosto sintético conter mais nutrientes e vitaminas comparado ao mosto de glicose, que continha somente água e glicose em sua composição.

O açúcar redutor total para as amostras que foram adicionadas de 100, 125 e 150 mg/L de nitrogênio foram considerados iguais estatisticamente como pode ser observado na Tabela 3.2, isso porque o açúcar presente no mosto foi consumido totalmente (99,9%), sendo o açúcar consumido para o crescimento e metabolismo das leveduras. As amostras com 0, 50 e 75 mg/L de nitrogênio tiveram os índices de açúcares residuais mais elevados comparado as outras amostras após 18 dias de fermentação.

A formação de etanol foi maior nas amostras com maiores teores de extrato, sendo as amostras adicionadas de 100, 125 e 150 mg/L de nitrogênio consideradas iguais estatisticamente com, 6,47, 6,37 e 6,27 °GL de etanol, respectivamente.

O pH do mosto foi padronizado entre 3,4 a 3,6 ao início da fermentação, no entanto, o pH do mosto variou de 2,99 a 3,18, ao final da fermentação. O mosto sintético teve um pH menor que o mosto de glicose ao final da fermentação. Isto pode ser explicado pelo fato de serem produzidos ácidos orgânicos durante a fermentação, o que pode causar a redução do pH (CUNHA et al., 2002). Como o mosto de glicose é um meio menos complexo, essa formação de ácidos pode não ser tão significativa, não havendo grandes alterações de pH durante a fermentação.

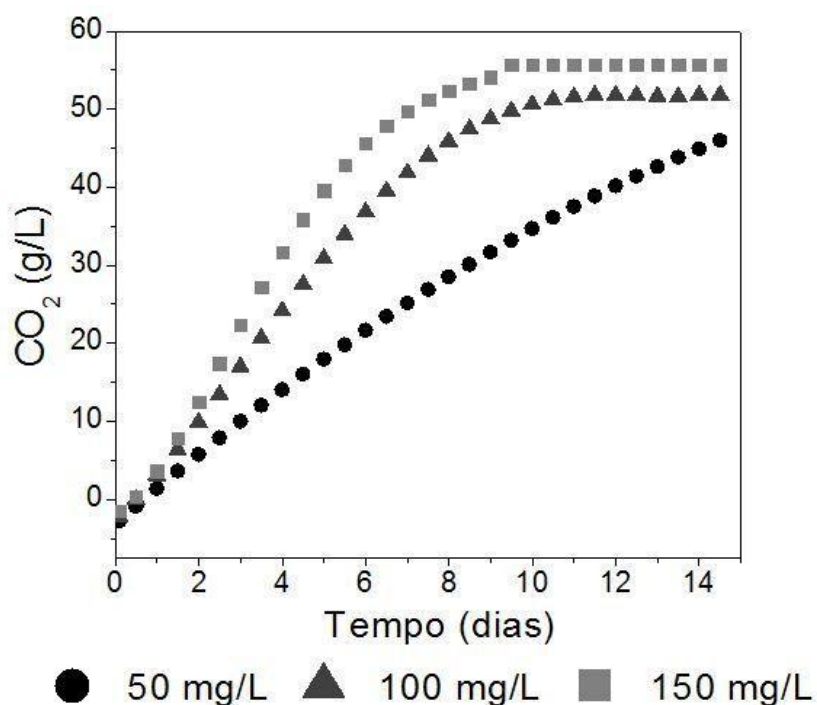
Em relação aos teores de acidez total titulável expresso em ácido málico (Tabela 3.2), o mosto apresentou teores considerados baixos (< 0,45 g/100mL). Carvalho (2010) obteve resultados semelhantes de acidez em um fermentado de maçã semelhante à sidra francesa. Ambos os mostos de glicose e sintético aumentaram a concentração de acidez conforme aumentou-se a concentração de extrato nitrogenado.

Após analisar a capacidade fermentativa do extrato no mosto sintético de maçã definiu-se estudar a cinética de fermentação e a evolução da composição do meio no mosto sintético de maçã adicionando as concentrações de 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio, sendo coletadas amostras para análises nos dias 1, 3, 6, 10 e 15.

Nesse experimento, optou-se por realizar a liofilização do extrato para depois pesar e adicionar a concentração de nitrogênio no mosto (50, 100 e 150 mg/L). Observa-se na Tabela 3,4 no tempo 0 (dias) as amostras adicionadas de 50 e 100 mg/L tiveram uma concentração maior de nitrogênio do que o requerido, 69 e 127 mg/L, provavelmente devido à falta de homogeneidade da amostra associada ao pequeno volume de mosto onde a amostra foi adicionada. Porém, vemos que ao longo da fermentação o mosto teve uma redução de nitrogênio total Kjeldahl indicando o consumo do nutriente pelas leveduras.

Os parâmetros cinéticos foram analisados através da perda de massa dos fermentadores de bancada. É possível observar na Figura 3.6 que a amostra com maior adição de extrato obtiveram uma maior liberação de CO_2 e velocidade máxima de fermentação ($\text{gCO}_2/\text{L}/\text{dia}$).

Figura 3.6 Liberação de gás carbônico do mosto sintético de maçã com adição do extrato nitrogenado nas concentrações de 50,100 e 150 mg/L.



A amostra com adição de extrato de 150 mg/L de nitrogênio obteve uma maior velocidade de fermentação, 9,9 gCO₂/L/dia (Tabela 3.3), seguida da amostra com 100 mg/L de extrato com 7,2 gCO₂/L/dia. A liberação de CO₂ das amostras com 50, 100 e 150 mg/L de extrato foram próximas, 46,0, 51,8 e 55,7 g/L respectivamente.

Na análise microscópica de contagem celular pode-se observar (Tabela 3.3) que a população de células aumentou durante a fermentação. Nota-se que a amostra a qual foi adicionada de mais extrato, 150 mg/L, teve um maior crescimento populacional, 24,5x10⁶ UFC, ou seja, o nitrogênio está diretamente relacionado com o aumento da população, o que está de acordo com Alberti (2011).

Tabela 3.3 Valores referentes aos parâmetros cinéticos de fermentação do mosto sintético adicionado de extrato com 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio.

Parâmetros cinéticos			
Dias	50	100	150
CO ₂ liberado (g/L)	46,0	51,8	55,7
V _{máx} (gCO ₂ /L.d)	4,6	7,2	9,9
Tempo de V _{máx} (d)	0,1	2,5	2,5
População máxima	14,2	12,6	24,5
No: não obteve-se velocidade máxima e tempo de velocidade máxima			

Nota: nd= não detectado.

Este crescimento populacional está relacionado com a utilização dos compostos nitrogenados pela *Saccharomyces* sp. durante a fase de crescimento, exercendo um importante papel na síntese de proteínas, influenciando o crescimento e o metabolismo das leveduras (JULIEN et al., 2000).

Com relação as análises de açúcares, o fermentado sintético continha inicialmente 120 g/L de açúcares (glicose, frutose e sacarose), sendo este esgotado ao final da fermentação (Tabela 3.4). As amostras com 50 mg/L de N tiveram o índice de açúcar residual mais elevado comparado as outras amostras, podendo ser explicado pelo fato de ter sido adicionado de menos nitrogênio, já que o transporte de açúcares é regulado pela disponibilidade de nitrogênio no meio.

Tabela 3.4- Parâmetros físico-químicos do mosto sintético de maçã adicionado de extrato com concentração de 50, 100 e 150 mg/L de nitrogênio (15 dias de fermentação).

Análises	Concentração de nitrogênio (mg/L)	Dias de fermentação					
		0	1	3	6	10	15
NTK (mg/L)	50	69,00a ± 0,00	38,00b ± 3,46	32,00c ± 1,73	33,00c ± 0,00	28,00d ± 1,73	27,00d ± 3,00
	100	127,00a ± 1,73	52,00b ± 1,73	42,00d ± 0,00	45,00c ± 0,00	38,00e ± 1,73	39,00e ± 0,00
	150	150,00a ± 3,00	66,00b ± 3,00	60,00c ± 5,20	48,00d ± 0,00	49,00d ± 1,73	49,00d ± 1,73
ART (g/L)	50	15,60a ± 0,78	12,33b ± 0,07	7,21c ± 0,57	4,2d1 ± 0,25	3,22e ± 0,03	0,93e ± 0,01
	100	12,30a ± 0,20	9,13b ± 0,02	5,07c ± 0,57	2,06d1 ± 0,09	0,19e ± 0,01	0,01e ± 0,01
	150	15,54a ± 0,38	9,67b ± 0,20	7,11c ± 0,09	2,02d1 ± 0,15	0,21e ± 0,01	0,01e ± 0,01
Etanol (°GL)	50	nd	0,27e ± 0,15	0,80d ± 0,10	1,80c ± 0,10	3,67b ± 0,06	4,83a ± 0,21
	100	nd	0,90d ± 0,10	1,53c ± 0,06	4,37b ± 0,23	5,43a ± 0,15	5,63a ± 0,06
	150	nd	1,00e ± 0,10	2,37d ± 0,23	4,50c ± 0,10	6,03b ± 0,15	6,47a ± 0,15
pH	50	3,79a ± 0,01	3,34b ± 0,02	3,21c ± 0,02	3,03d ± 0,01	3,01d ± 0,01	3,02d ± 0,01
	100	3,51a ± 0,01	3,39b ± 0,01	3,09c ± 0,01	2,98d ± 0,01	3,08c ± 0,01	3,39b ± 0,01
	150	4,23a ± 0,01	3,36c ± 0,03	3,57b ± 0,06	2,98e ± 0,01	3,13dd ± 0,01	3,32c ± 0,03

Nota: letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras (p<0,05). NTK= nitrogênio total Kjeldahl; V_{máx}= velocidade máxima; ART= açúcares redutores totais; nd= não detectado.

Além disso, a fermentação não foi completa para este tratamento, visto que não houve a estabilização da curva de liberação de CO₂ após 15 dias de fermentação (Figura 3.6). Portanto, a fermentação foi mais lenta havendo a presença de açúcares residuais ao final do experimento.

Na produção de etanol, podemos observar que quanto maior foi a adição de nitrogênio no meio, maior foi a produção de etanol, sendo a produção de $6,47 \pm 0,15$ g/100mL para amostra adicionada de 150 mg/L de nitrogênio e $4,83 \pm 0,21$ g/100mL para amostra adicionada de 50 mg/L de nitrogênio. Percebe-se ainda que após 10 dias de fermentação mesmo o consumo de nitrogênio tendo permanecido estável, houve um aumento na produção de etanol do dia 10 para o dia 15 de fermentação, podendo este fato estar relacionado com o teor de ergosterol presente no meio. Sabe-se que a biomassa residual de levedura contém além de um alto teor de aminoácidos, carboidratos, cinzas e lipídeos (dentre eles, ergosterol), podendo estes ser extraídos juntamente com o nitrogênio. O ergosterol, principal esterol da membrana de *Saccharomyces cerevisiae* (HENDERSON et al., 2011), preserva a integridade estrutural da membrana em condições de estresse (DICKY et al., 2010). Essa molécula interage com os lipídeos, modulando a interação do etanol com a membrana, protegendo-a dos efeitos deletérios dos álcoois (VANEGAS et al., 2010). Nesse sentido ergosterol é descrito como responsável por conferir a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tolerância ao etanol, favorecendo assim a fermentação. Larue et al., (1980) perceberam que a adição de ergosterol no mosto de uva aumentou a fermentação do açúcar em condições anaeróbicas, além de melhorar a tolerância das leveduras ao álcool. Ohta e Hayashida (1983) verificaram que a adição de ergosterol e ácido oleico provocou aumento na produção de etanol durante a fermentação de "sake" além de reduzir o tempo da fermentação.

Como já visto anteriormente o teor de nitrogênio tem influência direta na formação de etanol. Observa-se que a formação de etanol foi de forma crescente conforme a adição de nitrogênio foi aumentando no mosto.

O pH do mosto sintético foi padronizado em torno de 3,6 a 3,8. Entretanto, após a adição do extrato houve um aumento do pH para a amostra adicionada de 150mg/L de nitrogênio, Tabela 3.4. Durante o período de fermentação, houve uma redução do pH com diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), variando ao final de fermentação entre 3,02 a 3,39.

Como visto nos experimentos fermentativos citados acima o teor de nitrogênio

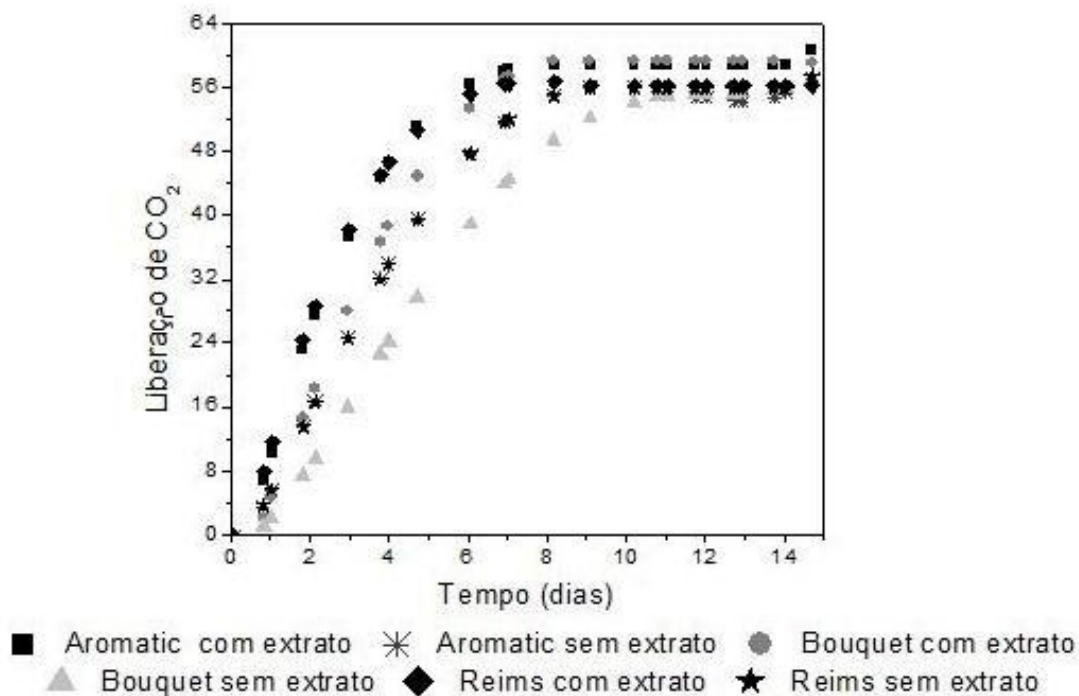
tem influência direta na velocidade de fermentação, assim como na produção de gás carbônico, crescimento da biomassa, e consumo de açúcares e formação de etanol. Sendo que as maiores velocidades de fermentação nos experimentos foram obtidas nas amostras que continham maior concentração de nitrogênio. No início da fermentação, as leveduras utilizam o nitrogênio dos sais de amônio para o seu crescimento, seguido pelo nitrogênio dos aminoácidos livres. Alguns destes, particularmente, arginina, ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, treonina e serina são assimilados preferencialmente (MORENO-ARRIBAS et al., 2009).

3.2.3 Avaliação da capacidade fermentativa do extrato em mosto natural de maçã

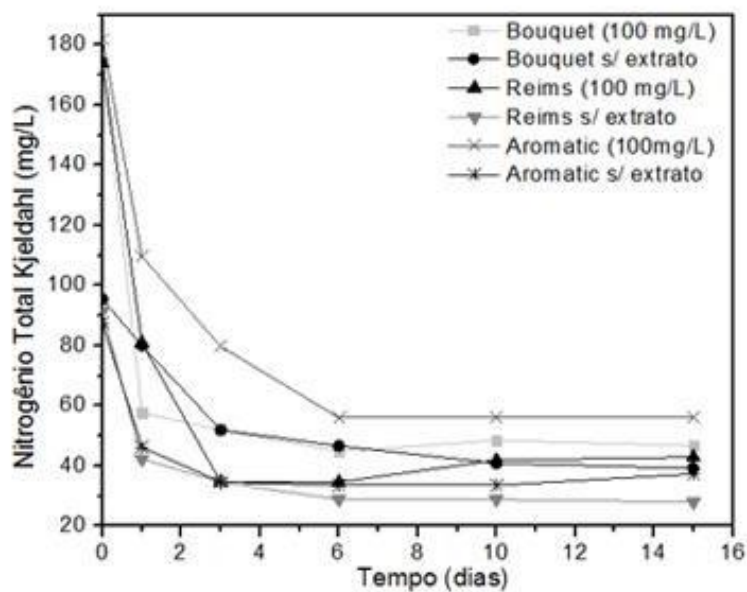
Para avaliar a influência do extrato nitrogenado em diferentes cepas de levedura, realizou-se a fermentação de sidras com 3 diferentes cepas de leveduras (Aromatic, Bouquet e Reims Champagne). Através do monitoramento da perda de massa foi possível obter as curvas cinéticas de fermentação dos mostos. Podemos observar por meio das curvas cinéticas (Figura 3.7) que as cepas de leveduras adicionadas de extrato tiveram maior liberação de gás carbônico. As leveduras adicionadas de extrato Reims e Aromatic alcançaram uma velocidade de 18,5 e 18,3 gCO₂/L/dia respectivamente, seguida da Bouquet com 12,7 gCO₂/L/dia. As leveduras sem adição de extrato tiveram 9,9, 10,2 e 7,9, respectivamente para Aromatic, Reims e Bouquet.

Figura 3.7 Liberação de gás carbônico e consumo de nitrogênio de sidras produzidas de diferentes cepas de leveduras na presença e ausência de extrato

a)



b)



(100mg/L).

Em relação ao crescimento populacional nota-se que as sidras adicionadas de extratos tiveram um aumento no número de células comparadas as que não foram adicionadas de extrato (Tabela 3.5). Pode-se concluir que indiferente da cepa de levedura utilizada, o extrato nitrogenado irá influenciar no crescimento populacional, velocidade de fermentação e produção de gás carbônico.

Tabela 3.5 Valores referentes aos parâmetros cinéticos de fermentação das sidras na ausência e presença de extrato (100 mg/L de nitrogênio), utilizando 3 diferentes cepas de leveduras.

Parâmetros cinéticos	Ausência de extrato			Presença de extrato (100mg/L)		
	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne
CO ₂ liberado (g/L)	57,2	57,3	57,7	59,3	61	56,1
V _{máx} (gCO ₂ /L/d)	7,9	10,2	9,9	13	18,3	18,5
Tempo de V _{máx} (d)	3	0,5	1	1	0,5	0,5
População máxima (10 ⁶) UFC	8,8	9,5	19,8	31,9	12,6	35,1

No consumo de açúcares (Tabela 3.6) na fermentação das sidras, observa-se que no 6º dia de fermentação já havia o consumo total de açúcares pelas leveduras, não havendo detecção no 10º dia. Porém, percebe-se que ao longo da fermentação o consumo foi maior para o mosto adicionado de extrato nitrogenado comparado ao que não houve adição.

Tabela 3.6 Valores referentes as análises físico-químicas das sidras na ausência e presença de extrato nitrogenado após 15 dias de fermentação.

Tempo (dias)	Ausência de extrato			Presença de extrato (100mgN/L)		
	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne	Bouquet	Aromatic	Reims Champagne
ART (g/100 mL)						
0	10,74 ^a ± 0,16	11,28 ^a ± 0,23	11,34 ^a ± 0,09	11,88 ^a ± 0,14	12,47 ^a ± 0,11	12,42 ^a ± 0,17
1	10,20 ^b ± 0,03	11,20 ^a ± 0,10	9,45 ^b ± 0,03	10,31 ^b ± 0,22	11,62 ^b ± 0,46	11,21 ^b ± 0,17
3	6,54 ^b ± 0,11	8,20 ^b ± 0,30	8,76 ^b ± 0,11	4,19 ^c ± 0,05	5,21 ^c ± 0,47	7,43 ^c ± 0,28
6	1,07 ^c ± 0,35	0,89 ^c ± 0,16	3,24 ^c ± 0,01	0,60 ^d ± 0,02	0,59 ^d ± 0,09	1,56 ^d ± 0,43
10	0,35 ^d ± 0,15	0,30 ^d ± 0,15	1,04 ^d ± 0,15	0,48 ^d ± 0,15	0,53 ^d ± 0,15	0,77 ^e ± 0,15
15	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Etanol (° GL)						
0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	0,30 ^d ± 0,10	nd	1,05 ^d ± 0,00	0,87 ^e ± 0,15	0,47 ^e ± 0,06	0,67 ^e ± 0,06
3	2,03 ^c ± 0,06	1,71 ^c ± 0,00	1,43 ^d ± 0,00	4,27 ^d ± 0,15	4,03 ^d ± 0,06	2,77 ^d ± 0,06
6	5,37 ^b ± 0,15	5,77 ^b ± 0,23	4,50 ^c ± 0,23	6,27 ^c ± 0,06	6,20 ^c ± 0,10	6,03 ^c ± 0,10
10	5,77 ^a ± 0,40	6,10 ^a ± 0,10	5,70 ^b ± 0,10	6,33 ^{bc} ± 0,15	6,63 ^b ± 0,12	6,47 ^b ± 0,12
15	5,97 ^a ± 0,12	6,27 ^a ± 0,15	6,30 ^a ± 0,15	6,60 ^a ± 0,10	6,93 ^a ± 0,06	6,90 ^a ± 0,06
Acidez (g/100 mL)						
0	0,25 ^d ± 0,01	0,25 ^d ± 0,01	0,25 ^d ± 0,01	0,26 ^d ± 0,01	0,26 ^b ± 0,01	0,26 ^c ± 0,01
1	0,28 ^c ± 0,02	0,33 ^a ± 0,02	0,28 ^c ± 0,02	0,32 ^c ± 0,02	0,27 ^b ± 0,01	0,27 ^c ± 0,01
3	0,33 ^b ± 0,01	0,16 ^e ± 0,01	0,29 ^c ± 0,01	0,36 ^a ± 0,02	0,28 ^a ± 0,01	0,31 ^b ± 0,01
6	0,36 ^a ± 0,01	0,27 ^c ± 0,01	0,34 ^a ± 0,01	0,36 ^a ± 0,01	0,25 ^c ± 0,01	0,33 ^a ± 0,01
10	0,36 ^a ± 0,01	0,28 ^{bc} ± 0,01	0,32 ^b ± 0,01	0,34 ^{ab} ± 0,01	0,25 ^c ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01
15	0,34 ^b ± 0,01	0,27 ^b ± 0,01	0,31 ^b ± 0,01	0,33 ^{bc} ± 0,01	0,25 ^c ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01
pH						
0	3,95 ^a ± 0,04	3,92 ^c ± 0,01	3,83 ^{bc} ± 0,01	3,93 ^a ± 0,01	3,91 ^a ± 0,01	3,89 ^a ± 0,03
1	3,79 ^b ± 0,02	3,96 ^a ± 0,01	3,86 ^a ± 0,02	3,79 ^c ± 0,03	3,85 ^c ± 0,01	3,86 ^a ± 0,05
3	3,73 ^c ± 0,03	3,98 ^a ± 0,01	3,74 ^d ± 0,02	3,71 ^d ± 0,01	3,94 ^d ± 0,01	3,79 ^b ± 0,03
6	3,71 ^c ± 0,01	3,97 ^a ± 0,01	3,80 ^c ± 0,01	3,88 ^b ± 0,02	4,07 ^b ± 0,01	3,84 ^a ± 0,01
10	3,69 ^d ± 0,01	3,95 ^b ± 0,01	3,82 ^e ± 0,01	3,74 ^e ± 0,01	3,96 ^e ± 0,01	3,74 ^c ± 0,03
15	3,59 ^e ± 0,03	3,82 ^d ± 0,03	3,66 ^f ± 0,03	3,72 ^d ± 0,03	3,91 ^a ± 0,03	3,68 ^f ± 0,01

Nota: letras diferentes entre as colunas representam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$). ART = açúcar redutor total. mgN/L= miligramas de nitrogênio por litro.nd= não detectado.

Em relação ao etanol, observa-se que as sidras adicionadas de extrato tiveram um melhor desempenho na produção do álcool. A sidra produzida com a Aromatic e Reims adicionadas de extrato produziram cerca de 9,5% a mais de álcool comparada as sidras Aromatic e Reims sem adição de extrato. Para a sidra produzida com a Bouquet essa diferença foi de 8,7%. Apesar, dessa diferença ser menor que 10%, para a indústria de bebidas alcoólicas pode ser vantajoso, já que com a adição do extrato pode-se reduzir o tempo de fermentação obtendo melhores resultados de cinética de fermentação bem como teores alcoólicos maiores.

Durante o período de fermentação, houve diferença significativa do pH entre os

dias da fermentação ($p < 0,05$). Ácidos carboxílicos são importantes constituintes do suco de maçã (málico, quínico e ácido chiquímico) e sidra (ácido láctico, ácido acético e succínico). Suas concentrações determinam o pH e afetam o sabor das sidras e sua suscetibilidade à deterioração microbiana (PICINELLI et al., 2000).

A acidez total titulável determinada como teor de ácido málico, o principal ácido presente nas maçãs, estava presente como ácido residual em todas as sidras analisadas (Tabela 3.6). Percebe-se que a cepa de levedura Aromatic não alterou a acidez, já as cepas Bouquet e Reims aumentaram a acidez durante a fermentação alcoólica. Ao final da fermentação a sidra produzida da cepa de levedura Reims Champagne, com e sem adição de extrato, tiveram os maiores teores de acidez 0,33 e 0,34 g/100 mL. Esta diferença de acidez entre as sidras produzidas de diferentes cepas de leveduras, pode ser explicada pela formação de ácidos orgânicos, os quais podem variar de acordo com a cepa de *Saccharomyces* selecionada para a produção da sidra (VALLES et al., 2007). A média da acidez total das sidras produzidas encontra-se dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira, caracterizando bebidas sem contaminações (BRASIL, 1974).

Com relação ao nitrogênio, adicionou-se aos mostos o extrato liofilizado equivalente a 100 mg/L de nitrogênio. O mosto de maçã com a cepa de levedura Boquet, Reims Champagne e Aromatic teve respectivamente 80, 83 e 94 mg/L de nitrogênio a mais comparado ao mosto sem a adição do extrato. Apesar dessa pequena variação, o mesmo não influenciou nos experimentos, pois, a ideia era justamente verificar como o meio se comporta com excesso de nitrogênio com diferentes cepas de leveduras. Ao longo da fermentação observa-se que as sidras tiveram uma redução durante a fermentação indicando o consumo do nutriente pelas leveduras (Figura 3.6).

Como visto em todos os experimentos fermentativos citados acima, o teor de nitrogênio tem influência direta na velocidade de fermentação, assim como na produção de gás carbônico, crescimento da biomassa, consumo de açúcares e formação de etanol. Pulzatto (2010) em seus estudos sobre fermentação com diferentes cepas de leveduras suplementadas com nitrogênio amoniacal e nitrogênio proteico correspondendo a 3, 6 e 9 g/L de extrato de levedura teve uma produção específica de células (Y_x/s), gramas de massa celular seca/gramas de ART consumido, que aumentou linearmente com o aumento do nitrogênio proteico no meio. Também foram positivamente influenciados o teor de etanol no vinho e o rendimento

da fermentação. Abramov, Éfendieva e Kotento (1994) enfatizam que a síntese de biomassa celular pela levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, está notadamente relacionada com o conteúdo de nitrogênio no meio, uma vez que a proporção de compostos nitrogenados na célula de levedura atinge 50% de sua massa. Dessa forma, podemos concluir que a suplementação do meio com extrato nitrogenado se torna importante para a efetividade da fermentação, além da melhoria na cinética e rendimento do processo, segundo Alberti (2011) se o meio fermentativo conter menos que 75 mg/L de nitrogênio a fermentação pode nem acontecer.

Um outro fator que pode afetar diretamente a taxa de crescimento das leveduras e reações metabólicas é a temperatura (BOZOGLU et al., 2015). Influenciando no metabolismo da levedura e na produção de compostos voláteis (FLEET, 1993). A temperatura atua na fluidez da membrana plasmática e na atividade das enzimas, alterando a permeabilidade da membrana e o metabolismo das células. O efeito inibidor do etanol também está intimamente relacionado à temperatura da fermentação (TORIJA et al., 2003). Segundo Sa-Correia e Van Uden (1983) a faixa de melhor resistência ao etanol das *Saccharomyces* é de 13 a 27° C a 11% de etanol. Além disso, as baixas temperaturas reduzem o crescimento de bactérias acéticas e lácticas, facilitando o controle da fermentação alcoólica (HERRERO et al., 2006).

Bozoglu et al., 2015 avaliou a influência da temperatura em fermentação de vinhos e percebeu que em temperaturas mais baixas (20° C) houve uma maior produção de compostos voláteis no vinho, sendo considerada em seu estudo a melhor condição para produção e modulação de aromas em vinhos.

3.3.3 Avaliação sensorial

Os resultados da avaliação dos atributos sensoriais encontram-se na Tabela 3.7. Pode-se observar que não houve diferença significativa na intensidade de odor nem na qualidade da bebida. Para o atributo de qualidade de odor houve diferença significativa entre as amostras, o que indica que a interferência na sensorial das sidras não é causada pelo extrato nitrogenado, mas sim pelas próprias leveduras.

Tabela 3.7 Análise sensorial de sidras com diferentes cepas de levedura

	Análise Sensorial		
	Intensidade de odor	Qualidade de odor	Qualidade da bebida
Bouquet sem extrato	3,2 ± 0,5	2,1 ^c ± 0,3	2,5 ± 0,06
Bouquet com extrato	2,9 ± 0,2	2,5 ^{abc} ± 0,2	2,7 ± 0,4
Reims sem extrato	2,8 ± 0,2	2,7 ^{ab} ± 0,2	3,0 ± 0,1
Reims com extrato	2,6 ± 0,2	2,6 ^{ab} ± 0,1	3,0 ± 0,2
Aromatic sem extrato	3,0 ± 0,7	2,3 ^{ac} ± 0,4	2,7 ± 0,6
Aromatic com extrato	2,7 ± 0,2	2,8 ^a ± 0,1	3,1 ± 0,4

Nota: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$). As notas sensoriais variam de 1 a 5, sendo 1-excelente e 5-péssimo para a qualidade de odor e bebida. E 1-muito fraco para 5-muito forte para a intensidade da bebida.

Para a intensidade de odor observa-se que as amostras mantiveram-se próximo do ponto “Moderado” da escala de intensidade de odor definida nesta análise sensorial. Para este atributo não houve uma diferença significativa, o que nos remete que, o extrato não interferiu na intensidade de odor das amostras. Para qualidade da bebida pode-se observar que as amostras mantiveram-se próximos do ponto 3 da escala definida neste trabalho, sendo “Regular” para qualidade da bebida. Este atributo também não houve diferença significativa entre as amostras, o que indica que a adição do extrato nitrogenado não afeta a qualidade de bebida. Já para o atributo de qualidade de odor observa-se que houve uma diferença significativa entre as amostras que contém diferentes cepas de leveduras, ou seja, essa diferença é causada pela variação de cepas de leveduras utilizadas e não pela adição do extrato nitrogenado.

Os principais compostos voláteis encontrados em sidra são os álcoois superiores, ésteres e ácidos graxos (HERRERO ET AL., 2006; AZHU VALAPPIL et al., 2009). Alguns destes compostos são derivados da fruta, mas a maioria é formado durante a fermentação alcoólica como metabólitos secundários (RITA et al., 2011; MADRERA et al., 2011). E o tipo de levedura usada, assim como a concentração de precursores de aroma na maçã influenciam na produção destes compostos. A capacidade de produção de álcoois superiores, principal grupo de compostos voláteis em bebidas fermentadas, é uma característica individual de cada tipo de levedura, portanto, a produção desses compostos pode variar de acordo com as cepas de *Saccharomyces* que são selecionadas para a produção de sidra (SWIEGERS et al., 2006; PENG et al., 2009). A diferença apenas entre diferentes cepas de leveduras na qualidade do odor, é explicada pelo fato de cada cepa de levedura ter uma produção característica de compostos voláteis.

Durante a fermentação, os aminoácidos são absorvidos pelo sistema de transporte da membrana celular da levedura. Os aminoácidos são os principais precursores de aroma (PENG et al., 2009). Estes aminoácidos passam pela reação de desaminação na via de Erlich, onde os principais produtos da quebra destes aminoácidos são os álcoois superiores (YE et al., 2014). Estes álcoois são intermediários para a formação de ésteres pelo processo de esterificação durante a fermentação alcoólica (YE et al., 2014; GARDE-CERDÁN; ANCÍN-AZPILICUETA et al., 2014). Sendo os ésteres responsáveis por aromas mais doces e frutados.

Logo, a adição do extrato nitrogenado em sidras é interessante visto que há a aceleração e um melhoramento da cinética de fermentação, mas não há mudanças ou efeitos negativos nas características gerais do aroma das sidras. Para as indústrias de bebidas esta pode ser uma estratégia vantajosa do ponto de visto econômico e produtivo, pois, pode-se produzir mais em menos tempo mantendo a qualidade e características sensoriais do produto e aumentando a produtividade do negócio.

3.4 CONCLUSÃO

A adição do extrato nitrogenado obtido a partir de borra de levedura de cervejaria resultou em todos os processos fermentativos um aumento da eficiência da fermentação alcoólica. Constatou-se que quanto maior foi a adição do extrato no mosto maior foi a velocidade de fermentação, liberação de CO₂, produção de etanol e consumo de açúcares. Na fermentação de sidras com diferentes cepas de leveduras foi observado que mesmo com diferentes cepas a eficiência de fermentação se reproduz nos mostos adicionados de extratos, além de aumentar a velocidade de fermentação. Percebe-se que a adição do extrato nitrogenado não influenciou nas características sensoriais da sidra, mantendo as características sensoriais do produto. Para as indústrias de bebidas a adição de extrato nitrogenado em processos fermentativos torna-se interessante do ponto de visto econômico, pois, além de aumentar a eficiência e rendimento de fermentação não altera as características sensoriais do produto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do método de superfície de resposta (MSR) foi possível realizar a otimização da extração dos compostos nitrogenados da borra de levedura de cervejaria utilizando as condições de 70% de amplitude, razão levedura/água 55:100 (V/V) e tempo de 30 minutos. Dessa forma, pode-se obter um extrato nitrogenado como uma alternativa de reaproveitamento do subproduto de cervejaria, reduzindo 78% do volume desse resíduo gerado.

O extrato com compostos nitrogenados de borra de levedura obtido nas condições otimizadas, se mostrou eficaz como suplemento de nitrogênio nos processos fermentativos realizados neste trabalho. A adição do extrato nitrogenado influenciou positivamente na manutenção e viabilidade celular, aumentando a velocidade de fermentação, a liberação de CO₂, produção de etanol e consumo de açúcares. Percebeu-se que a adição do extrato em sidras produzidas com diferentes cepas de leveduras foi eficaz aumentando a eficiência de fermentação independente da levedura utilizada. Não houve influência nas características sensoriais da sidra, mantendo as características sensoriais originais do produto.

Desta forma, essa pesquisa pode impactar o setor de bebidas alcoólicas, pois, pode reduzir os dias de fermentação e até mesmo aumentar a produtividade sem alterar as características sensoriais do produto. Além disso, pode despertar interesse em outros setores industriais como a indústria sucroalcooleira para produção de etanol, por exemplo.

Ainda, para trabalhos futuros pode-se realizar um estudo de caracterização do extrato nitrogenado através do perfil de aminoácidos, teor de ergosterol e vitaminase verificar o efeito do ergosterol no mosto sem oxigênio durante o processo fermentativo. Pode-se estudar também a extração de outros compostos para possíveis aplicações em bebidas ou produtos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOV, S.A.; ÉFENDIEVA, D.A.; KOTENTO, S.T. Effect of the growth medium on the protein content of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.30, p.225-227, 1994.
- ADEKUNTE, A. O.; TIWARI, B. K.; CULLEN, P. J.; SCANNELL, A. G. M.; O'DONNELL, C. P. Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 500-507, 2010.
- ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. . Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996
- ALBERTI, A.; VIEIRA, R. G.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple wine processing with different nitrogen contents. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 551-558, 2011.
- ALEXANDRE, H.; GUILLOUX-BENATIER, M. Yeast autolysis in sparkling wine—a review. **Australian journal of grape and wine research**, v. 12, n. 2, p. 119-127, 2006.
- ANAYA-ESPARZA, L. M.; VELÁZQUEZ-ESTRADA, R. M.; ROIG, A. X.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; SAYAGO-AYERDI, S. G.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E.
Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. **Trends in food science & technology**, v. 61, p. 26-37, 2017.
- ANDERSON, M. J.; WHITCOMB, P. J. **RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments**. Productivity press, 2016.
- AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. AOAC International, 2019.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL NETTO, W.; LIMA, U. D.
A. **Biotecnología Industrial**: Biotecnologia na produção de alimentos, v. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. 544 p.
- ARDÖ, Y. Flavour formation by amino acid catabolism. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 2, p. 238-242, 2006.
- ARIAS-GIL, M.; GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1312-1318, 2007.
- AWAD, T. S.; MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M. M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 410-427, 2012.

AZHU VALAPPIL, Z.; FAN, X.; ZHANG, H. Q.; ROUSEFF, R. L. Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 924-929, 2009.

AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medical & Aromatic Plants**, v.4, n. 3, p. 3-8, 2015.

BABAYAN, T. L.; BEZRUKOV, M. G. Autolysis in yeasts. **Acta Biotechnologica**, v.5, n. 2, p. 129-136, 1985.

BABAYAN, T. L.; BEZRUKOV, M. G.; LATOV, V. K.; BELIKOV, V. M.; BELAVTSEVA, E. M.; TITOVA, E. F. Induced autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*: Morphological effects, rheological effects, and dynamics of accumulation of extracellular hydrolysis products. **Current Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 163-168, 1981.

BAXTER, E. D. Hordein in barley and malt—A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, n. 3, p. 173-176, 1981.

BELY, M.; SALMON, J. M.; BARRE, P. Assimilable nitrogen addition and hexose transport system activity during enological fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, Place Viala, v. 100, n. 4, p. 279-282, 1994.

BENTO, C. V.; ALMEIDA, J. B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º PARTE—AS LEVEDURAS. **Revista Analytica**, n. 35, p. 36-42, 2006.

BENVENUTTI, L.; BORTOLINI, D. G.; NOGUEIRA, A.; ZIELINSKI, A. A. F.; ALBERTI, A. Effect of addition of phenolic compounds recovered from apple pomace on cider quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 100, p. 348-354, 2019.

BONNEU, M.; CROUZET, M.; URDACI, M.; AIGLE, M. Direct selection of yeast mutants with reduced viability on plates by eritrosine B. staining. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 225-230, 1991.

BOSSIO, J. P.; HARRY, J.; KINNEY, C. A. Application of ultrasonic assisted extraction of chemically diverse organic compounds from soils and sediments. **Chemosphere**, v. 50, n. 9, p. 858-864, 2008.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics**, v. 2, n. 4, p. 455-475, 1960.

BOZOGLU, M. D.; ERTUNC, S.; AKAY, B.; BURSALI, N.; VURAL, N.; HAPOGLU, H.; DEMIRCI, Y. The Effect of temperature, pH and SO₂ on ethanol concentration and sugar consumption rate (SCR) in apple wine process. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 37, n. 3, p. 431-439, 2015.

BRAGA, C. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; DA SILVA, K. M.; DE SOUZA, F. K. F.; PIETROWSKI, G. D. A. M.; COUTO, M.; NOGUEIRA, A. Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 967-974, 2013.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 1997. Seção 4, cap. 4, art. 91b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 64, de 23 de abril de 2008. Aprova os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 12 jul. 2017.

BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 1988. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 jul. 2017.

BRUNS, R. E.; SCARMINO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical Desing - Chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, p. 273, 2006.

CARVALHO, J. R. F.; SILVA, K. M.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Elaboração de fermentado de maçã com características semelhantes a sidra francesa. **Boletim do centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 01, p. 97 – 114, 2010.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing—food quality assurance and food safety. **Trends in Food Science & Technology**, 26, 88–98, 2012.

CHEMAT, F., and MUHAMMED, K. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017.

CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Disruption of microbial cells for intracellular products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 4, p. 194-204, 1986.

CLAUSSEN, I. C.; USTAD, T. S.; STRØMMEN, I.; WALDE, P. M. Atmospheric freeze drying—A review. **Drying Technology**, v. 25, n. 6, p. 947-957, 2007.

COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Monograph Archive**, v. 11, p. 39-99, 1982.

COPERSUCAR, **Fermentação**. São Paulo: Centro de Tecnologia. Divisão Industrial. 1987. 434p.

COSTA, A. G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2012.

CUNHA, S.C.; FERNANDES, J.O.; FERREIRA, I.M. HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. **European Food Research and Technology**, v. 214, n. 1, p. 67-71, 2002.

CURRIE, J. A.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. Release of protein from Bakers' yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, n. 5, p. 725-736, 1972.

CURVELO-GARCIA, A. S. **Controle de Qualidade dos Vinhos – Química Enológica – Métodos Analíticos**. Instituto da Vinha e do Vinho, Lisboa, 1988. 420p.

DEL CAMPO, G.; SANTOS, J. I.; BERREGI, I.; MUNDUATE, A. Differentiation of Basque cider apple juices from different cultivars by means of chemometric techniques. **Food Control**, 16, 551-557, 2005.

DEMAIN, A. L.; PHAFF, H. J.; KURTZMAN, C. P. The industrial and agricultural significance of yeasts. The yeasts, a taxonomic study. **Elsevier Science BV, Amsterdam**, p. 13-30, 1998.

DEM'YANUSHKO, I. V.; KAZANTSEV, V. F.; KARAGODIN, V. I.; LUZHNOV, Y. M.; PRIKHOD'KO, V. M. Tools for Ultrasound Cleaning. **Russian Engineering Research**, v. 37, n. 12, p. 1084-1086, 2017.

DERRINGER, G; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 2, p. 214-219, 1980.

DICKINSON, J. R.; SALGADO, L. E. T.; HEWLINS, M. J. E. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Microbiological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 8028-8034, 2003.

DICKEY, A. N.; YIM, W. S.; FALLER, R. Using ergosterol to mitigate the deleterious effects of ethanol on bilayer structure. **The Journal of Physical Chemistry**, v.113, p. 2388-2397, 2010.

DONALIES, U. E.; NGUYEN, H. T.; STAHL, U.; NEVOIGT, E. Improvement of *Saccharomyces* yeast strains used in brewing, wine making and baking. In: **Food Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 67-98, 2008.

DRILLEAU, J. F. Cider processing: nitrogen and fermentation; phenol compounds and oxydation. **Revue Pomme à Cidre**, v. 33, p. 24-25, 1993.

EDEBO, L.; MAGNUSSON, K.-E. Disintegration of cells and protein recovery. **Pure and Applied Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 325-338, 1973.

EDGARDO, A.; CAROLINA, P.; MANUEL, R.; JUANITA, F.; BAEZA, J. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 120-123, 2008.

FELDMANN, H. **Yeast Molecular Biology**: a short compendium on basic features and novel aspects. 433 p, 2005.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 2, p. 77-84, 2010.

FERREIRA, I. M.; JORGE, K.; NOGUEIRA, L. C.; SILVA, F.; TRUGO, L. C. Effects of the combination of hydrophobic polypeptides, iso- α acids, and malto-oligosaccharides on beer foam stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4976-4981, 2005.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 5, p. 463-471, 2006.

FLEET, Graham H. **Wine microbiology and biotechnology**. CRC Press, 1993.

FLEURI, L. F.; SATO, H. H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 871-879, 2005.

FLÓREZ, N.; CONDE, E.; DOMÍNGUEZ, H. Microwave assisted water extraction of plant compounds. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 590-607, 2015.

FOWELL, R. R. Sporulation and hybridization of yeasts. **The yeasts**, v. 1, p. 303-383, 1969.

GARDE-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 501-510, 2008.

GUSMÁN-JUÀREZ, M.; HUDSON, B. J. F. Yeast protein isolates low in nucleic acids. **Journal Science and Food Agriculture**, v. 29, n. 12, p. 1091-1097, 1978.

HARRISON, J. S. Yeast production. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 10, p. 129, 1971.

HARPER, J. C.; TAPPEL, A. L. Freeze-drying of food products. In: **Advances in Food Research**. Academic Press. p. 171-234. 1957.

HENDERSON, C.M.; LOZADA-CONTRERAS, M.; NARAVANE, Y.; LONGO, M. L.; BLOCK, D. E. Analysis of major phospholipid species and ergosterol in fermenting industrial yeast strains using atmospheric pressure ionization ion-trap mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12761–12770, 2011.

HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. **Wine Microbiology and Biotechnology**, p. 77-164, 1993.

HERRERO, M., DE LA ROZA, C., GARCIA, L. A., & DÍAZ, M. Simultaneous and sequential fermentations with yeast and lactic acid bacteria in apple juice. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 48-51, 1999.

HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Volatile compounds in cider: Inoculation time and fermentation temperature effects. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 3, p. 210-214, 2006.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B. VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.

HOUGH, J. S. **The Biotechnology of Malting and Brewing**. Cambridge: Cambridge University Press, 1985. 159 p.

IN, M. J.; KIM, D. C.; CHAE, H. J. Downstream process for the production of yeast extract using brewer's yeast cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, n. 1, p. 85, 2005.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^a ed. São Paulo; 1002 p, 2008.

JERONIMO, E. M. **O nitrogênio proteico na fermentação alcoólica e sua influência na qualidade da cachaça**. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) -UNICAMP/FEA, Campinas. 130p, 2004.

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts. The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**, n. p. 42-49, 1981.

JORGE, Z. L. C.; TREPTOW, R.; ANTUNES, P. Avaliação físico-química e sensorial de suco de maçãs cultivares Fuji, Granny Smith e seus “blends”. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 4, n. 1, 2012.

JOSHI, V. K.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology: Food Fermentation: Microbiology**,

Biochemistry, and Technology. Educational Publishers & Distributors. 1372 p, 1999.

JULIEN, A.; ROUSTAN, J. L.; DULAU, L.; SABLAYROLLES, J. M. COMPARISON of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 3, p. 215- 222, 2000.

KOLLAR, R.; STURKIK, E.; SAJBIDOR, J. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. **Food Biotechnology**, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237, 1992.

KORN, M.; PEREIRA, M. G.; BORGES, S. S. Algumas aplicações analíticas dos ultras- sons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 96, p. 51-6, 2005.

KREGER-VAN RIJ, N. J. W. Classification of yeasts. **The yeasts**, v. 1, p. 5-61, 1987.

KROKIDA, M. K.; PHILIPPOPOULOS, C. Volatility of apples during air and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 2, p. 135-141, 2006.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). The yeasts: a taxonomic study. **Elsevier**. 2384 p, 2011.

LARUE, F.; LAFON-LAFOURCADE, S.; GAYON, P.R. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 39 (4): 808-11, 1980.

LAMOOLPHAK, W.; GOTO, M.; SASAKI, M.; SUPHANTHARIKA, M.; MUANGNAPOH, C.; PROMMUAG, C.; SHOTIPRUK, A. Hydrothermal decomposition of yeast cells for production of proteins and amino acids. **Journal of Hazardous Materials**, v. 137, n. 3, p. 1643-1648, 2006.

LAPLACE, J. M.; JACQUET, A.; TRAVERS, I.; SIMON, J. P.; AUFFRAY, Y. Incidence of land and physicochemical composition of apples on the qualitative and quantitative development of microbial flora during cider fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, n. 4, p. 227-234, 2001.

LEE, H. O. **Fundamentals of Food Biotechnology**. Ed. V.C.H. Publishers Inc. New York, 1996, 431p.

LE QUÉRÉ, J. M.; HUSSON, F.; RENARD, C. M.; PRIMAULT, J. French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 1033-1044, 2006.

LEA, A.G.H.; DRILLEAU, J. Cidermaking. In: **Fermented beverage production**. Springer US. p. 59-87, 2003.

LEE, H.; ZHOU, B.; LIANG, W.; FENG, H.; MARTIN, S. E. Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. **Journal of Food Engineering**, 93, 354–364, 2009.

LEQUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Revue des**

Oenologues, v. 88, p. 17-20, 1998.

LEROY, M. J.; CHARPENTER, M.; DUTEURTRE, B.; FEUILAT, M.; CHARPENTIER, C. Yeast autolysis during champagne aging. **American Journal of Enology and Viticulture**, Reedley, v.41, p.21-28, 1990.

LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, HV de. Produção de etanol. **Biotecnologia**. São Paulo, 2001.

LODDER, J. **The yeasts**: a taxonomic study. 2 ed. Amsterdam: North-Holland Publish Company. 1985 p, 1971.

LOPEZ, J.; JORGENSEN, N. A.; LARSEN, H. J.; NIEDERMEIER, R. P. Effect of nitrogen source, stage of maturity, and fermentation time on pH and organic acid production in corn silage. **Journal of Dairy Science**, 1970.

LORENZINI, M.; SIMONATO, B.; SLAGHENAUF, D.; UGLIANO, M.; ZAPPAROLI, G. Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. **LWT-Food Science and Technology**, v. 99, p. 224-230, 2019.

LUQUE-GARCIA, J. L.; CASTRO, M.D. L. de. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.

MADRERA, R. R.; HEVIA, A. G.; GARCÍA, N. P.; VALLES, B. S. Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2064-2069, 2008.

MANGAS, J. J.; CABRANES, C.; MORENO, J.; GOMIS, D. B. Influence of cider-making technology on cider taste. **LWT-Food Science and Technology**, v. 27, n. 6, p. 583-586, 1994.

MATA, M. E. R. M. C.; DUARTE, M. E. M.; ALSEMO, G. C. S.; RODRIGUES, E.; GUEDES, M. A.; CAVALCANTI, A. S. R. R. M.; OLIVEIRA, C. C. A. Obtenção de graviola em pó pelo processo de liofilização. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 165-172, 2005.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Caracterização de resíduos cervejeiros. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 3805-3812, 2015.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A.; MOULIN, B. S. F. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. **Embrapa**. Comunicado Técnico 86, 2013, 4p.

MENEZES, T. J. Etanol, o combustível do Brasil. In: **Etanol, o combustível do Brasil**. Editora Agronômica Ceres, 1980.

MONTEIRO, F. F.; BISSON, L. F. NITROGEN SUPPLEMENTATION OF GRAPE JUICE. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, V. 43, N. 1, P. 1-10, 1992.

MORENO-ARRIBAS, V.; PUEYO, E.; POLO, M. C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J. Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4042-4051, 1998.

MULET, A.; CÁRCEL, J. A.; SANJUAN, N.; BON, J. New food drying technologies-Use of ultrasound. **Food Science and Technology International**, v. 9, n. 3, p. 215-221, 2003.

MURGATROYD, K.; BUTLER, L. D.; KINNARNEY, K.; MONGER, P. Good pharmaceutical freeze-drying practice. **Peter Cameron (ed.)**, 1997.

MUSIELAK, G.; MIERZWA, D.; KROEHNKE, J. Food drying enhancement by ultrasound—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 56, p. 126-141, 2016.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 1-14, 2006.

MUSSATTO, S.I. Biotechnological Potential of Brewing Industry By-Products. In **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. Springer Netherlands, p.313-326, 2009.

NEDOVIC, V. A.; DURIEUXB, A.; VAN NEDERVELDE, L.; ROSSEELS, P. Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9, p. 834-839, 2000.

NEVOIGT, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.72, n.3, p.379–412, 2008.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola. Efeito do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 191 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A., LE QUÉRÉ, J. M., GESTIN, P., MICHEL, A., WOSIACKI, G., DRILLEAU, J. F. Slow fermentation in French cider processing due to partial biomass reduction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 102-110, 2008.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. Q.; SIMÕES, D. R. S.; DRIELLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 2, n. 2, p. 289-298, 2003^a.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. Em VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. V.1. Ed. Edgard Blücher, São Paulo v. 1, p. 113-142, 2010.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. **Apple cider fermentation**. In: Handbook of plant based fermented food and beverage technology, CRC Press, 2 Ed., p. 209-236, 2012.

O'CONNOR-COX, E. S.; INGLEDEW, W. M. Wort nitrogenous sources—Their use by brewing yeasts: A review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 47, n. 4, p. 102-108, 1989.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

OHTA, K.; HAYASHIDA, S. Role of tween 80 and monoolein in a lipid-sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance os sake yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**. Baltimore, 46(4):824-5.1983.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Análise da aptidão industrial de seis cultivares de maçãs, considerando suas avaliações físico-químicas (dados da safra 2001-2002). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, nov./dez. 2004.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. vol. 1. São Paulo: McGraw Hill, 1980.

PENG, B.; YUE, T.; YUAN, Y. Analysis of key aroma components in cider from Shaanxi (China) Fuji apple. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n.3, p. 610-615, 2009.

PÉREZ-BIBBINS, B.; TORRADO-AGRASAR, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, N.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; DOMÍNGUEZ, J. M. Evaluation of the liquid, solid and total fractions of beer, cider and wine lees as economic nutrient for xylitol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1027- 1039, 2015.

PÉREZ-BIBBINS, B.; TORRADO-AGRASAR, A.; SALGADO, J. M.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P.; DOMINGUEZ, J. M. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. **Waste Management**, v. 40, p. 72-81, 2015.

PETRIER, C.; JIANG, Y.; LAMY, M. Ultrasound and environment: sonochemical destruction of chloroaromatic derivatives. **Environmental Science & Technology**, v. 32, n. 9, p. 1316-1318, 1998.

PICINELLI, A.; SUÁREZ, B.; MORENO, J.; RODRÍGUEZ, R.; CASO-GARCÍA, L. M.; MANGAS, J. J. Chemical characterization of Asturian cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3997-4002, 2000.

PICINELLI, A.; SUÁREZ, B.; MORENO, J.; RODRIGUES, R.; GARCÍA, C.; PANDO, R. M.; BEDRIÑANA; MANGAS, J. J. Técnicas analíticas en el control de calidad y caracterizacion de la sidra natura Asturiana. **Alimentaria**. p. 129-136, septiembre, 2002.

PIETROWSKI, G. A. M.; DOS SANTOS, C. M. E.; SAUER, E.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9815–9821, 2012.

PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; SANTOS, L.H.M.L.M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography**, v. 1121, n. 2, p. 145-153, 2006.

PINTO, L. C.; LOPES, M. V.; CARVALHO FILHO, C. D.; ALVES, L. V. A.; BENEVIDES, C. M. J. Determinação do valor nutritivo de derivados de levedura de cervejaria (*Saccharomyces* spp.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 7-17, 2013.

PRIEST, F. G.; STEWART, Graham G. (Ed.). **Handbook of Brewing**. CRC/Taylor & Francis, 2006. 831 p.

PULZATTO, M. E. Fatores que influem na obtenção de biomassa de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) da fermentação alcoólica. 2000.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of food engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001.

RAVANELI, G. C. Qualidade da matéria-prima, microbiota fermentativa e produção de etanol sob ataque de *Maharavafimbriolata* em cana-de-açúcar. 2010. Não paginado. Tese (Doutorado em Microbiologia agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

RIBEIRO, F. J.; LOPES, J. J.; FERRARI, S. E. Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 1, n. 105, p. 26-30, 1987.

RIESZ, P.; BERDAHL, D.; CHRISTMAN, C. L. Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 233, 1985.

RITA, R. D.; ZANDA, K.; DAINA, K.; DALIJA, S. Composition of aroma compounds in fermented apple juice: effect of apple variety, fermentation temperature and inoculated yeast concentration. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1709-1716, 2011.

ROWLES, Kristin. **Processed apple product marketing analysis: hard cider and apple wine**. 2000.

SA-CORREIA, I.; VAN UDEN, N. Temperature profiles of ethanol tolerance: effects of ethanol on the minimum and the maximum temperatures for growth of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 25, n. 6, 1983.

SALMON, J. M.; MAURICIO, J. C. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 1, p. 89-94, 1994.

SANTOS, A. M. D. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. 2008.

SANTOS, C. M. E. D.; ALBERTI, A.; PIETROWSKI, G. D. A. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; JORGE, R. M. M.. Supplementation of amino acids in apple must for the standardization of volatile compounds in ciders. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 2, p. 334-341, 2016.

SANTOS, E. D. M., C.; PIETROWSKI, G. D. A. M.; BRAGA, C. M.; ROSSI, M. J.; NINOW, J.; NOGUEIRA, A. Apple amino acid profile and yeast strains in the formation of fusel alcohols and esters in cider production. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 6, 2015.

SCHNEITER, R. **Genetics, Molecular and Cell Biology of yeast**. Université di Fribourg Suisse, Fribourg, 2004. 86 p.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1386-1393, 2014.

SHEN, Y., GUO, J.S., CHEN, Y.P., ZHANG, H.D., ZHENG, X.X., ZHANG, X.M., BAI, F.W. Application of low-cost algal nitrogen source feeding in fuel ethanol production using high gravity sweet potato medium. **Journal of Biotechnology**, 2012.

SILVA, F.; NOGUEIRA, L. C.; GONCALVES, C.; FERREIRA, A. A.; FERREIRA, I. M.; TEIXEIRA, N. Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 820-829, 2008.

TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2003.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2009.

SONICS & MATERIALS, INC. User's Guide. 2008. Acessado em :<https://www.sonics.com/site/assets/files/2961/vc505-vc750_new_micro_6-1-08.pdf> Acessado em 04 de fevereiro de 2019.

SONICS & MATERIALS, INC. Vibra cell. Ultrasonic liquid processor. Printed in USA, 2017.

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; DE TOLEDO, F. F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira**: AB. Edusp. 282 p, 1995.

SWIEGERS, J. H.; FRANCIS, I. L.; HERDERICH, M. J.; PRETORIUS, I. S. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery. Aust. NZ, **Wine Industry Journal**, v. 21, p. 34-42, 2006.

SWIEGERS, J. H.; KIEVIT, R. L.; SIEBERT, T.; LATTEY, K. A.; BRAMLEY, B. R.; FRANCIS, I. L.; PRETORIUS, I. S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon

Blanc wine. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 204-211, 2009.

SYMONEAUX, R.; CHOLLET, S.; PATRON, C.; BAUDUIN, R.; LE QUÉRÉ, J. M.; BARON, A. Prediction of sensory characteristics of cider according to their biochemical composition: Use of a central composite design and external validation by cider professionals. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 63-69, 2015.

TER SCHURE, Eelko G.; VAN RIEL, Natal AW; VERRIPS, C. Theo. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 67-83, 2000.

TODD, B. E.; FLEET, G. H.; HENSCHKE, P. A. Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: potential application in sparkling wine production. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 1, p. 65-72, 2000.

VALLES, B. S.; BEDRIÑANA, R. P.; TASCÓN, N. F.; SIMÓN, A. Q.; MADRERA, R. R. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 25-31, 2007.

VANEGAS, J. M.; FALLER, R.; LONGO, M.L. Influence of ethanol on lipid/sterol membranes: phase diagram construction from AFM imaging. **Langmuir Letter**, v. 26, p. 10415-10418, 2010.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000.

WALKER, G. M. Yeast physiology and biotechnology. **Scotland: John Wiley & Sons**, 350p, 1998.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: Biology and Applications**, p. 1-35, 2017.

WATANABE, T.; SRICHUWONG, S.; ARAKANE, M.; TAMIYA, S.; YOSHINAGA, M.; WATANABE, I.; NAKAMURA, T. Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9710-9714, 2010.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 2, p. 84-92, 1976.

WILLIAMS, A. A. Flavour research and the cider industry. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 80, n. 5, p. 455-470, 1974.

WORDON, B. A.; MORTIMER, B.; MCMASTER, L. D. Comparative real-time analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell viability, injury and death induced by ultrasound (20 kHz) and heat for the application of hurdle technology. **Food Research International**, v. 47, n. 2, p. 134-139, 2012.

WOSIACKI, G.; CHERUBIN, R. A.; SANTOS, D. S. Cider processing in Brazil. **Fruit**

Processing. Schönborn, v. 7, n. 7, p. 242-249, 1997.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 192-196, 2006.

XU, Y.; FAN, W.; QIAN, M. C. Characterization of aroma compounds in apple cider using solvent-assisted flavor evaporation and headspace solid-phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3051- 3057, 2007.

YAN, Y. L.; YU, C. H; CHEN, J.; LI, X. X.; WANG, W.; LI, S. Q. Ultrasonic-assisted extraction optimized by response surface methodology, chemical composition and antioxidant activity of polysaccharides from *Tramella mesentrica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 217-224, 2011.

YE, M., YUE, T., & YUAN, Y. Changes in the profile of volatile compounds and amino acids during cider fermentation using dessert variety of apples. **European Food Research and Technology**, v. 239, n. 1, p. 67-77, 2014.

ZABED, H.; FARUQ, G.; NARAYAN SAHU, J.; AZIRUN, M. S.; HASHIM, R.; BOYCE, A. N. Bioethanol production from fermentable sugar juice. **The Scientific World Journal**. p. 1- 11, 2014.

APÊNDICE A – FICHAS SENSORIAS DE FERMENTADO DE MAÇÃ PARA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE E QUALIDADE DE ODOR E QUALIDADE DA BEBIDA

(a)

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo amostras codificadas de fermentado de maçã. Por favor, prove as amostras e avalie as escalas quanto a intensidade de odor.

Amostra: _____

①	②	③	④	⑤
Muito fraco	Fraco	Moderado	Forte	Muito forte

(b)

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo amostras codificadas de fermentado de maçã. Por favor, prove as amostras e avalie as escalas quanto a qualidade de odor e qualidade da bebida.

Qualidade de odor:

Amostra: _____

①	②	③	④	⑤
Excelente	Bom	Regular	Ruim	Péssimo

Qualidade da bebida:

Amostra: _____

①	②	③	④	⑤
Excelente	Bom	Regular	Ruim	Péssimo

Nota: (a) Avaliação da intensidade do atributo odor; (b) Avaliação da qualidade do odor e da qualidade da bebida.