

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

ALINE ALBERTI

**EFEITO DO NITROGÊNIO E DO OXIGÊNIO NA ELABORAÇÃO DE
FERMENTADOS DE MAÇÃ**

**PONTA GROSSA
2011**

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

ALINE ALBERTI

**EFEITO DO NITROGÊNIO E DO OXIGÊNIO NA ELABORAÇÃO DE
FERMENTADOS DE MAÇÃ**

Dissertação apresentada à banca examinadora como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

**PONTA GROSSA
2011**

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

A334e Alberti, Aline
 Efeito do nitrogênio e do oxigênio na elaboração de fermentados de maçã /
Aline Alberti . Ponta Grossa, 2011.
 86f.

 Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) ,
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

 1.Fermentação alcoólica. 2. Mosto de maçã. 3. Levedura. 4. Velocidade
de fermentação. 5. Operações unitárias. 6. Escurecimento enzimático.
I. Nogueira, Alessandro. II.T.

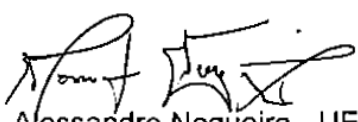
CDD : 660.62

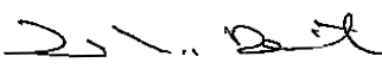
TERMO DE APROVAÇÃO

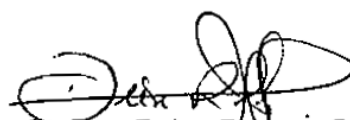
ALINE ALBERTI

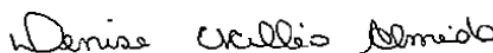
EFEITO DO NITROGÊNIO E DO OXIGÊNIO NA ELABORAÇÃO DE FERMENTADOS DE MAÇA

Dissertação aprovada como requisito parcial 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. Dr. Alessandro Nogueira - UEPG

 Prof. Dr. Ivo Mottin Demiate - UEPG

 Profa. Dra. Deise Rosana Silva Simões - UEPG

 Profa. Dra. Denise Milléo Almeida - UTFPR

Ponta Grossa, 04 de março de 2011.

A todos que souberam a importância deste trabalho

Dedico

AGRADECIMENTOS

A meus pais e a Ariane pelo apoio aos estudos e, pela paciência e compreensão durante o tempo em que me dediquei à elaboração deste trabalho.

A minhas queridas amigas, Fernanda Janaína e Jéssica que me acompanharam nesta jornada.

Ao Professor Alessandro Nogueira, meu orientador, pelas ideias, sugestões e ensinamentos e, sobretudo pelo incentivo, paciência e apoio em todos esses anos de trabalho.

Ao Professor Gilvan Wosiacki pela contribuição com seus conhecimentos e amizade.

Aos amigos Caroline, Giovana, Frederico, Renan, Henrique, Cíntia, Renato, Rosilda, Denise e Vitor pelo apoio e ajuda prestada.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo concedida.

Ao Anderson, pelo grande paciência, incentivo e ajuda sempre que solicitada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

No crescimento de leveduras durante a fermentação alcoólica os compostos nitrogenados e o oxigênio são os principais elementos limitantes, ou seja, sua ausência pode levar a fermentações lentas, ou paradas de fermentação. A fim de evitar estes problemas tecnológicos, no processamento brasileiro de fermentado de maçã é comum a adição de compostos nitrogenados, mesmo sem conhecer seu teor no mosto. Nesta operação, ocorre agitação do mosto para promover sua homogeneização e incorporação de oxigênio. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do nitrogênio e do oxigênio na elaboração de fermentados de maçã nas condições de processamento brasileiras. Os teores de nitrogênio e oxigênio dissolvido de mostos de maçã de diferentes cultivares, regiões e safras, foram analisados. Foi avaliado o efeito das operações unitárias e de inibidores de escurecimento enzimático na dissolução de oxigênio no mosto. O nitrogênio total foi determinado pelo método de Kjeldahl e o oxigênio dissolvido por oxímetro. O teor de nitrogênio de 51 amostras de mosto de maçã foram analisados, e destes, 98 % apresentaram valores acima de 75 mg/L, concentração suficiente para que a fermentação transcorra sem interrupções. A população máxima de levedura, bem como a velocidade de fermentação, são proporcionais aos teores de nitrogênio presentes nos mostos. No processamento, a maior dissolução de oxigênio no mosto de maçã ocorre durante a prensagem, $7,3 \pm 0,5$ mgO₂/L, em média. Mas a reação de oxidação dos compostos fenólicos é responsável por um consumo de mais de 90 % deste oxigênio. As operações seguintes de despectinização, trasfega e filtração aumentam o teor de oxigênio no mosto, que fica com média de $3,0 \pm 0,8$ mgO₂/L. A adição de dióxido de enxofre à maçã triturada, inibe a oxidação e consequentemente o mosto apresenta maior teor ao final do processo. A operação de maceração possibilitou uma menor redução (57 %, em média) do consumo de oxigênio dissolvido no mosto pela reação de escurecimento enzimático, possivelmente devido a oxidação prévia dos substratos fenólicos. O teor final de oxigênio resultante do processamento normal do mosto, sem adição de dióxido de enxofre ou maceração, 3,0 mg/L, foi suficiente para o desenvolvimento das leveduras. A adição forçada de oxigênio no mosto pode ser prejudicial para a atividade fermentativa das leveduras, possivelmente devido a oxidação de nutrientes. Desta forma, a adição de compostos nitrogenados e oxigênio, antes da fermentação, não é necessária nas condições de processamento utilizadas.

Palavras-chaves: fermentação alcoólica, mosto de maçã, levedura, velocidade de fermentação, operações unitárias, escurecimento enzimático.

ABSTRACT

In yeast growth during the alcoholic fermentation, the nitrogen compounds and the oxygen content are the main limiting elements. Nitrogen and oxygen absence can lead to sluggish or stuck fermentations. In order to prevent these technological problems, in the Brazilian apple wine processing the nitrogen compounds addition is common practice, without knowing its content in the apple must. In this operation, occurs must agitation with two purposes, homogenization and oxygen dissolution. The objective of this work was to evaluate the effect of nitrogen and oxygen in the elaboration of apple wine in Brazilian processing conditions. The nitrogen content and dissolved oxygen in apple must of different varieties, harvests and regions were analyzed. The effect of the unit operations and enzymatic browning inhibitors in the oxygen dissolution in apple must was evaluated. The total nitrogen content was determined by method of Kjeldahl and oxygen by dissolved oxygen meter. The total nitrogen content of 51 apple must samples was analyzed, and 98 % had values above 75 mg/L, which are enough for a complete fermentation. The maximum yeast population, as well as the fermentation rate, is proportional to nitrogen content in apple musts. In the apple must processing, the highest dissolution occurs during the pressing, around of $7.3 \pm 0.5 \text{ mgO}_2/\text{L}$. But the phenolic oxidation reaction is responsible for oxygen consumption (above 90 %). The unit operations of depectinization, racking and filtration increase the oxygen content in the apple must, around of $3.0 \pm 0.8 \text{ mgO}_2/\text{L}$. The addition of sulphur dioxide, in the milled apple, inhibits the oxidation and apple must keep higher oxygen content after filtration. The maceration possibility a smaller reduction (57 %, on average) in dissolved oxygen uptake in the must by the enzymatic browning reaction due to the previous oxidation of phenolic substrate. The final oxygen content of the normal apple must processing, without addition of sulphur dioxide or maceration, was 3.0 mg/L, enough for the yeast development. The forced oxygen addition in apple must can be harmful for the fermentative activity of the yeast, possibly due to the nutrients oxidation. Therefore, nitrogen compounds and oxygen additions before the fermentation are not necessary in used conditions.

Keywords: Alcoholic fermentation, apple must, yeast, fermentation rate, unit operation, enzymatic browning.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1.	Evolução da produção nacional de maçã no período de 1973 a 2009	16
Figura 2.	Fluxograma do processamento da sidra no Brasil	19
Figura 3.	Via glicolítica.....	21
Figura 4.	Vias de biossíntese de aminoácidos	24
Figura 5.	Catabolismo dos aminoácidos	26
Figura 6.	Etapas do escurecimento enzimático da maçã	28
Figura 7.	Mecanismo geral de reação da polifenoloxidase	29
Figura 8.	Biossíntese do ergosterol	32

Capítulo II: Apple wine processing with different nitrogen contents.

Figure 1.	Frequency distribution of the nitrogen determinations (mg/L) in 51 apple must	47
Figure 2.	Illustration of the precision of kinetic parameter in five 500 mL-flasks fermentation.....	47
Figure 3.	Growth profile of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Uvaferm CK (A), nitrogen consumption (B), sugar consumption and alcohol production (C), fermentation rate (D) during cider fermentation in varietal apple must:.....	49

Capítulo III: Efeito do Oxigênio Dissolvido no Processamento de Mosto e Fermentado de Maçã.

Figura 1.	Fluxograma de processamento de fermentado de maçã e esquema do processo de prensagem do triturado de maçã	56
Figura 2.	Consumo do oxigênio (mg/L) pela reação de escurecimento enzimático em mostos de maçã Eva (◆), Fuji (■), Gala (▲), Granny Smith (Δ) e Red Delicious (■), nos primeiros 10 minutos após a operação de prensagem	58
Figura 3.	Consumo do oxigênio (mg/L) pela reação de escurecimento enzimático em mosto de maçã, nos primeiros 10 minutos após a operação de prensagem com diferentes tempos de maceração: sem maceração (◇); 5 minutos (◆); 10 minutos (▲); 20 minutos (○) e 30 minutos (■).....	59
Figura 4.	Evolução do oxigênio dissolvido durante o processamento do mosto de maçã sem maceração.	60
Figura 5.	Evolução do oxigênio dissolvido durante o processamento do mosto de maçã com maceração.	61

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.	Frações nitrogenadas do mosto de maçãs	22
Tabela 2.	Aminoácidos no mosto de maçã	23
Tabela 3.	Cinética de absorção dos aminoácidos e amônia durante a fermentação com <i>Sacchromyces cerevisiae</i> em mosto de uvas	25
Tabela 4.	Adições de oxigênio pelas operações unitárias durante o processamento de mosto de uva	27

Capítulo II: Apple wine processing with different nitrogen contents.

Table 1.	Statistic descriptive of 51 total nitrogen analysis of the apple must	47
Table 2.	Physicochemical composition of three apple juices	48
Table 3.	Kinetic parameters of the three varietal apple juice fermentation	50

Capítulo III: Efeito do Oxigênio Dissolvido no Processamento de Mosto e Fermentado de Maçã.

Tabela 1.	Efeito de diferentes tempos de maceração (0, 10, 20 e 30 minutos) antes da prensagem no teor de oxigênio dissolvido (mg/L) durante o processamento do mosto de maçã Gala.	61
Tabela 2.	Efeito da adição de dióxido de enxofre no teor de oxigênio dissolvido (mg/L) durante o processamento de mosto de maçã.	62
Tabela 3.	Parâmetros cinéticos de fermentados de mostos de maçã da cultivar Gala, provenientes de dois lotes, (experimento 1 e 2) com diferentes teores de oxigênio dissolvido no início da fermentação (momento do inóculo da levedura)	63
Tabela 4.	Análises físico-químicas dos mostos de Gala e Fuji com e sem maceração...	64
Tabela 5.	Parâmetros cinéticos dos fermentados de Gala e Fuji, com e sem maceração, com diferentes teores de oxigênio dissolvido no início da fermentação (momento do inóculo da levedura)	65

SUMÁRIO

Capítulo I.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Maçã.....	16
3.2 Sidra.....	17
3.3 Fermentação alcoólica.....	20
3.4 Compostos nitrogenados.....	22
3.4.1 Metabolismo do nitrogênio.....	23
3.4.2 Influência do nitrogênio sobre a fermentação.....	26
3.5 Oxigênio.....	27
3.5.1 Escurecimento enzimático.....	27
3.5.2 Vias de utilização do oxigênio pela <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.5.3 Influência da adição de oxigênio no metabolismo da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
REFERÊNCIAS.....	34
 Capítulo II: Apple Wine Processing With Different Nitrogen Contents.....	43
1 INTRODUCTION.....	44
2 MATERIALS AND METHODS.....	45
2.1 Apple varieties.....	45
2.2 Apple juice processing.....	46
2.3 Apple juice fermentation.....	46
2.4 Kinetic fermentation.....	46
2.5 Physicochemical Analysis.....	46
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	46
3.1 Nitrogen content in apple must.....	46
3.2 Kinetic fermentation reproducibility.....	47
3.3 Nitrogen content and fermentation rate.....	47
4 CONCLUSIONS.....	50
REFERENCES.....	50
 Capítulo III: Efeito do Oxigênio Dissolvido no Processamento de Mosto e Fermentado de Maçã.....	52
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Material.....	55
2.2 Métodos.....	55
2.2.1 Efeito da absorção de oxigênio com escurecimento enzimático.....	55

2.2.2	Quantificação do oxigênio dissolvido nas operações unitárias do processamento	56
2.2.3	Efeito do teor inicial de oxigênio na cinética de fermentação.....	57
2.2.4	Efeito da maceração na cinética de fermentação.....	57
2.2.5	Análises físico-químicas.....	57
2.2.6	Análise estatística dos dados	58
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1	Efeito do escurecimento enzimático no teor de oxigênio dissolvido	58
3.2	Efeito da maceração no teor de oxigênio dissolvido durante as operações unitárias	59
3.3	Efeito do dióxido de enxofre no teor de oxigênio no processamento do mosto.....	61
3.4	Efeito do teor de oxigênio inicial na cinética de fermentação.....	62
3.5	Efeito da maceração na cinética de fermentação.....	63
4	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	65
Capítulo IV		71
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO I – Declaração de aceite do artigo “Apple Wine Processing With Different Nitrogen Contents.....	86

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a cultura da maçã tem potencial produtivo de aproximadamente um milhão de toneladas por ano, sendo que cerca de 95 % da produção correspondem as cultivares Gala, Fuji, e suas mutações. Durante a classificação destas frutas, aquelas que não apresentam as características físicas e fitopatológicas adequadas, cerca de 20 a 30 %, são denominadas maçãs de descarte. Estas frutas, ditas industriais são utilizadas na elaboração de sucos, fermentados, vinagres e destilados.

A fermentação alcoólica é um passo crucial no processamento da sidra. Durante este processo a levedura transforma os açúcares em gás carbônico (CO_2), álcool e energia, e produz compostos aromáticos, tais como ácidos graxos, ésteres e álcoois superiores. Nesta etapa, o oxigênio e o nitrogênio estão entre os principais elementos, uma vez que deficiências de um ou de outro, podem levar a fermentações lentas, ou paradas de fermentação.

O nitrogênio tem importante função anabólica na síntese protéica e consequentemente nas funções enzimáticas da célula e por isso é considerado fator limitante ao crescimento da levedura. O setor agroindustrial brasileiro de processamento de fermentados de maçã utiliza como prática corrente a adição de nutrientes (vitaminas e compostos nitrogenados) como forma de correção antes de inocular à levedura alcoólica. Este procedimento elimina o risco de lentidão ou paradas de fermentação, porém, não é feita uma análise de nitrogênio antes desta correção, o que pode causar um aumento desnecessário do composto, principalmente em situações onde o teor natural de compostos nitrogenados já está elevado. O produto com elevado teor residual de nitrogênio pode se tornar instável microbiologicamente com alterações organolépticas e ocorrer explosões de garrafas, no caso da sidra gaseificada naturalmente ou mal pasteurizada, além da formação de álcoois superiores que diminuem a qualidade sensorial da bebida. Sendo assim na **primeira etapa** deste trabalho foi avaliada a influencia do teor de nitrogênio na fermentação alcoólica do mosto de maçã nas condições de processamento brasileiras.

No mosto de maçã, o oxigênio age tanto no mosto quanto nas leveduras. Durante a extração do mosto, ocorre o escurecimento enzimático através da enzima polifenoloxidase que utiliza o oxigênio do meio na oxidação dos compostos fenólicos. Esta reação é responsável pelo consumo do oxigênio dissolvido que pode ser prejudicial ao crescimento da levedura, uma vez que necessita de pequenas concentrações para seu crescimento. Nestas condições o oxigênio é utilizado, principalmente, na síntese de esteróis e ácidos graxos

insaturados necessários à membrana plasmática das leveduras. Estes lipídeos permitem prolongar o metabolismo das células em condições enológicas e sua presença ao mosto tem efeitos benéficos sobre a viabilidade e vitalidade celular. Com isso, na **segunda etapa** deste trabalho foi avaliada a evolução do oxigênio dissolvido durante o processamento de mostos de maçã e sua influência nos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- *Avaliar* a influência do nitrogênio e oxigênio no processamento de fermentado de maçã.

2.2 Objetivos Específicos

- *Analisar* o teor de nitrogênio em mostos de diferentes cultivares de maçãs nacionais;
- *Avaliar* o efeito da concentração de nitrogênio na cinética de fermentação alcoólica de mosto de maçã;
- *Verificar* a necessidade de correções de nitrogênio no mosto de maçãs brasileiras;
- *Avaliar* o efeito de diferentes operações unitárias na dissolução de oxigênio durante o processamento de mosto de maçã;
- *Determinar* o consumo de oxigênio pela reação de escurecimento enzimático em mostos de diferentes cultivares de maçãs;
- *Avaliar* o efeito da oxigenação de mostos de diferentes cultivares na cinética de fermentação alcoólica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Maçã

Na década de 70, quando a cultura de maçã foi instalada no país, a produção não alcançava 15 toneladas, entretanto na safra 2009/2010 chegou a 1.274.705 toneladas (Figura 1), o que representa um crescimento de quase 7000 % (PÉRÈS, 2009). Com isso, em 2008 o Brasil ocupou o 12º lugar no cultivo de maçã (FAO, 2010). A produção está concentrada (99 %) abaixo do Trópico de Capricórnio. O Estado de Santa Catarina responde por 53 % da produção nacional, seguido do Rio Grande do Sul (42 %) e do Paraná (4 %) (ABPM, 2011).

As cultivares Gala e Fuji representam 95 % da produção (EPAGRI, 2002; WOSIACKI et al., 2008), sendo que a safra 2009/2010 foi composta por 55 % da primeira e 40 % da segunda (ABPM, 2011; FERREIRA, 2009). Isto se deve à aceitação dos consumidores pela coloração e sabor dessas frutas. Além disso, essas cultivares apresentam longo período de conservação em câmaras fria e com atmosfera controlada (FERREIRA, 2009; WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004).

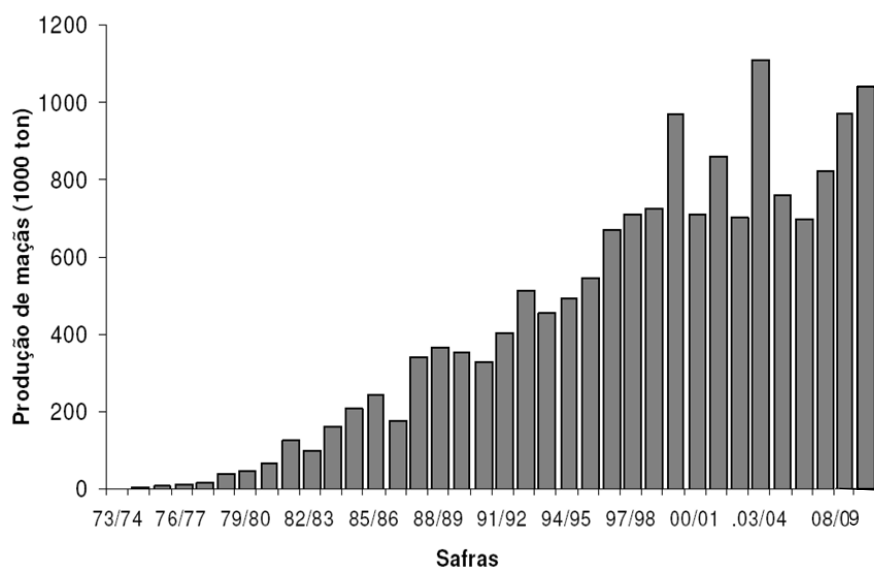


Figura 1. Evolução da produção nacional de maçã no período de 1973 a 2009.
Fonte: Nogueira; Wosiacki (2010); Pérès (2009); Wosiacki; Nogueira (2001).

A cultivar Gala, a mais plantada no Brasil, apresenta elevada qualidade organoléptica devido a sua suculência, ao gosto doce e média acidez. Tem excelente aparência com uma coloração vermelho rajada intensa e atraente no lado que recebe sol. O lado sombreado fica sem a coloração vermelha destacando a cor de fundo amarelo-esverdeada. Existem mutações

somáticas desta variedade como a Royal Gala, originada na Nova Zelândia, que tem coloração mais intensa; a Galaxy Gala é mais colorida e apresenta estrias uniformemente distribuídas em toda superfície do fruto (EPAGRI, 2002; WOSIACKI et al., 2008).

A cultivar ‘Fuji’, uma das quatro cultivares de macieira mais promissoras no contexto mundial na atualidade, apresenta frutos de tamanho médio a grande, com cor de fundo esverdeada, a qual se torna amarela à medida que ocorre sua maturação. A polpa é aromática, firme, crocante, muito suculenta e de gosto doce. Como corre com a cultivar Gala, as mutações somáticas da cultivar Fuji, diferem na coloração vermelha do epicarpo da fruta (EPAGRI, 2002; WOSIACKI et al., 2008a).

Entre 20 a 30 % da produção de maçãs não apresentam qualidade suficiente para serem vendidas *in natura*, devido a problemas fisiológicos e fitopatológicos, sendo denominadas de maçãs ‘industriais’. Estas frutas possuem composição físico-química muito parecida com as de mesa, que podem ser utilizadas para processamento de suco, além de fabricação de sidra, vinagre e destilados, dependendo dos problemas físico-patológicos apresentados (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; PAGANINI et al., 2004). As frutas sem pontos de podridão podem ser destinadas ao processamento de suco. A maior parte da produção de suco de maçã é exportada para os Estados Unidos da América, sob a forma de suco clarificado concentrado (75° Brix), para a elaboração de produtos infantis devido a pouca acidez em média de 0,36 g/100mL e baixa adstringência, com teor de fenóis em média de 311 mg/L (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; WOSIACKI et al., 2008). Frutas de qualidade inferior são encaminhadas para a fabricação do fermentado de maçã, base para a elaboração da sidra, formulação de outras bebidas alcoólicas, vinagres e destilado de maçã (NOGUEIRA et al., 2008a).

3.2 Sidra

A sidra brasileira é produzida a partir da mistura de frutas de cultivares comerciais e polinizadoras, ou seja, apenas com maçãs de mesas, provenientes do descarte industrial, e por isso, consiste em um produto suave, pouco aromático e com baixa acidez. Por outro lado a sidra francesa, considerada uma das melhores do mundo, em função do sabor suave, adstringente e presença de aromas frutados, são elaboradas com frutas melhoradas geneticamente exclusivamente para o processamento. Na Alemanha e Suíça, as sidras são mais secas e ácidas, enquanto que na Espanha, a bebida tem aroma pungente com predominância de ácido acético (MANGAS et al., 1999; NOGUEIRA, 2003).

Os mostos destas maçãs apresentam, em média, 120 g/L de açúcares redutores totais, sendo a frutose o constituinte majoritário, podendo chegar a 80 % do total em algumas cultivares (WOSIACKI et al., 2005). O ácido málico é o principal responsável pela acidez, 0,365 g/100mL, em média (WOSIACKI et al., 2008). Entre os aminoácidos, cinco deles, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina, glutamina e serina, representam de 86 a 95 % do total (BARON; BOHUON; DRILLEAU, 1977; LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998). Dentre as vitaminas, a que se destaca no processo fermentativo é a tiamina, considerada fator de crescimento das leveduras (BATAILLON et al., 1996).

A composição de compostos fenólicos em mostos de maçã depende da variedade da fruta, do seu grau de maturação, dos tratos culturais e do método de extração durante a operação de prensagem (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010). As principais perdas de compostos fenólicos durante o processamento da fruta ocorrem devido à oxidação enzimática (responsável pela coloração da bebida), e na clarificação do mosto (NOGUEIRA et al., 2008b). As principais classes de compostos fenólicos encontrados em maçãs são os ácidos fenólicos e os flavonóides. Sendo os representantes dos ácidos fenólicos, os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos, os flavan-3-óis (epicatequina, catequina e procianidinas), antocianinas, flavonóis (quercetina) e dihidrochalconas (floreтина e floredzina), representantes dos flavonóides (AWAD; DE JAGER; VAN WESTING, 2000; GUYOT et al., 1997; SPANOS; WROLSTAD, 1992; TSAO et al., 2005; VANZANI et al., 2005).

Para obtenção da sidra, no mosto obtido com auxílio de prensas de pistão ou esteiras, ocorre a adição de enzimas pectinolíticas em dosagens recomendadas pelos fabricantes, além de uma primeira sulfitagem (Figura 2). Após a despectinização e precipitação, o mosto é trasfegado e deixado para fermentar após o inóculo de levedura sob a forma seca ativa a uma razão de 20 g/hL (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

A fermentação ocorre em dornas à temperatura ambiente nos meses do final do verão e início do outono (20 a 25°C) (INMET, 2011). O processo de fermentação alcoólica pode ser dividido em fase oxidativa e fermentativa que correspondem à formação de aromas e da transformação de açúcares em álcool. A fase oxidativa está relacionada à formação do aroma da sidra, desenvolvido não somente por leveduras do gênero *Saccharomyces*, mas também por leveduras apiculadas. Dentre os compostos responsáveis pelo aroma da sidra destacam-se acetato de etila, acetato de 2-fenil etila, álcool isoamílico e álcool isobutílico (CABRANES et al., 1998). As leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam crescimento durante a fase

fermentativa com população inicial de aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/mL, estabilizando sua população após um consumo de 100 a 150 g/L de açúcares e apresentando população máxima de cerca de $2,0$ a $4,0 \times 10^7$ células/mL, situação na qual a velocidade de fermentação atinge seu valor máximo (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

Após a transformação total dos açúcares em etanol e CO_2 (fase fermentativa), o fermentado é filtrado e transferido para tanques onde permanecerá para que ocorra a fermentação secundária ou malolática. A fermentação malolática, conduzida por bactérias lácticas presentes naturalmente no epicarpo das frutas ou inoculadas como a *Oenococcus oeni*, que reduzem a sensação de acidez do fermentado por conversão do ácido málico em ácido láctico, melhorando o gosto da bebida (DRILLEAU, 1995; MESAS; ALEGRE, 1999).

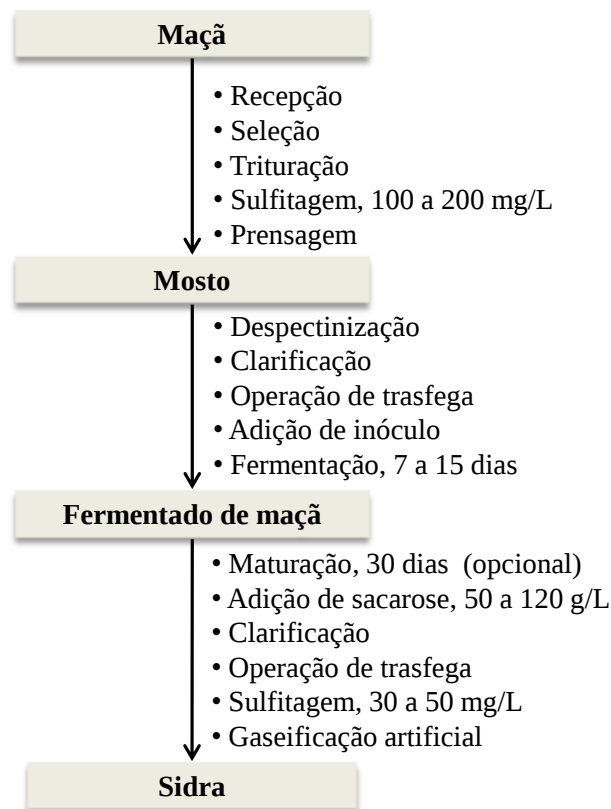


Figura 2. Fluxograma do processamento da sidra no Brasil.
Fonte: Adaptado de Nogueira; Wosiacki (2010).

Após a maturação, ocorre a adição de sacarose, entre 75 e 100 g/L, conservantes como o metabissulfito de potássio e ácido sórbico (WOSIACKI; CHERUBIN; SANTOS, 1997). A adição destes conservantes torna-se indispensável face a qualidade fitopatológica das frutas e às altas temperaturas durante o processamento, com um valor médio de 25°C , o que pode acarretar contaminação (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010). No Brasil, a legislação

permite o uso de ácido sórbico como conservador em sidras em um limite máximo de 500 mg/L. O dióxido de enxofre não deve ser adicionado acima de 250 mg/L. A adição de ácido benzóico não é permitida nesses produtos (BRASIL, 1988).

Após os processos fermentativos a bebida é clarificada com gelatina e bentonite. A gelatina, utilizada na clarificação, apresenta cargas positivas em baixo pH, a qual reage através de ligações iônicas, com os polifenóis com cargas negativas, formando um complexo insolúvel que pode precipitar ou ficar retido durante a filtração. A bentonite, tem cargas negativas que removem compostos com cargas positivas, como as proteínas. O tratamento excessivo, ao invés de inibir o surgimento da turbidez pode acelerá-la devido à introdução de precursores (SIEBERT et al., 1996; SPANOS, WROLSTRAD, 1992; TAJCHAKAVIT et al., 2001). Desta forma, diferenças na natureza da carga iônica de proteínas, polifenóis, pectinas e do agente de clarificação, induzem a floculação e sedimentação resultando na eliminação de precursores do *haze* da solução (OSZMIANSKI; WOJDYLO, 2007).

A formação do *haze* durante a estocagem é um problema no processamento de bebidas como vinho, cerveja e sucos de frutas. O fenômeno tem sido associado a presença de proteínas e polifenóis do suco, devido a reação de condensação entre os compostos fenólicos e/ou interação entre fenóis e moléculas de proteínas, formando complexos que sedimentam (HEATHERBELL, 1984; OH; HOFF, 1987; SHAHIDI; NACZK, 1995).

Ao final do processo de clarificação, o fermentado é gaseificado e engarrafado.

3.3 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é conduzida tanto por microrganismos presentes na própria fruta, quanto pelo inóculo de leveduras seca-ativas, sendo a principal delas a *Saccharomyces cerevisiae* (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010). Esta fermentação ocorre em condições iniciais de parcial anaerobiose (menos de 10 mg/L de oxigênio dissolvido no meio) sendo que o metabolismo da *S. cerevisiae* em tais condições é estritamente fermentativo (BARRE et al., 2000).

Após a entrada da glucose e frutose na célula, esta molécula é fosforilada pelas enzimas hexoquinase PI e PII. A hexoquinase PII ocorre principalmente na fase de crescimento em meio rico em açúcares, enquanto que a PI, aparece na fase estacionária (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). Em seguida, os açúcares fosforilados são transformados em piruvato pela via glicolítica (Figura 3).

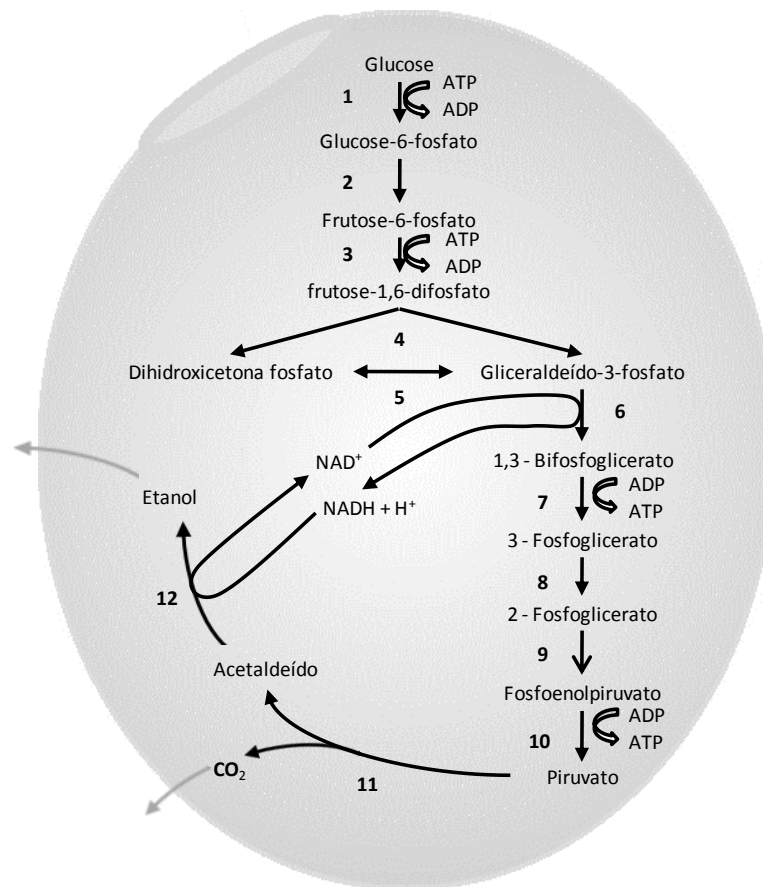
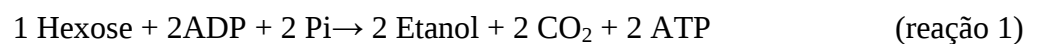


Figura 3. Via glicolítica. Enzimas: (1) Hexoquinase; (2) Fosfoglicose isomerase; (3) Fosfofrutoquinase; (4) Aldolase; (5) Triose fosfato isomerase; (6) Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; (7) Fosfoglicerato quinase; (8) Fosfoglicerato mutase; (9) Enolase; (10) Piruvato quinase (11); Piruvato descarboxilase; (12) Álcool desidrogenase.

Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (1998).

Em anaerobiose, o piruvato é descarboxilado a acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, e então reduzido a etanol, pela enzima álcool desidrogenase. Nesta etapa, ocorre a regeneração do cofator NAD que é utilizado a nível de gliceraldeído-3-fosfato. O balanço global da fermentação pode ser observado na reação 1.



Durante a fermentação alcoólica são produzidos outros metabólitos fermentativos, além de etanol e biomassa, porém em quantidades menores quando comparados com a quantidade de açúcares convertidos em etanol e gás carbônico (BARRE et al., 2000). Após o inóculo da levedura, as enzimas essenciais para a fermentação alcoólica (piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase) são induzidas pela presença da D-glucose. Por isso, no

início da fermentação a produção de etanol não ocorre de imediato, mas há formação de outros compostos, como o glicerol, piruvato e succinato (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998).

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações extracelulares de até 12 a 14 % de volume em fermentações normais. Segundo Dombek e Ingram (1986), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não acumula etanol no interior de seu citoplasma durante a fermentação; por ser uma molécula pequena e hidrofílica passa através da membrana plasmática por simples difusão.

Para seu crescimento a levedura *S. cerevisiae* requer algumas vitaminas como a biotina, ácido pantotênico, mioinositol e ácido nicotínico. Em presença de tiamina a levedura apresenta crescimento acelerado, embora seja capaz de sintetizá-la (BATAILLON et al., 1996).

3.4 Compostos nitrogenados

Compostos nitrogenados são essenciais para o metabolismo e crescimento das leveduras, sendo quantitativamente o mais importante depois do carbono (BISSON, 1999).

O mosto de maçãs apresenta diversas formas de compostos nitrogenados (Tabela 1) (BURROUGHS, 1957; LEA; DRILLEAU, 2003). Entre elas, aproximadamente 50 % representa a forma α -amina livre. Asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico e serina, que representam 86 a 95 % dos aminoácidos totais do mosto (Tabela 2), e são facilmente assimiláveis pelas leveduras (DRILLEAU, 1995). Durante a extração do mosto, alguns desses compostos podem ficar retidos no bagaço em quantidades que variam com o estado fisiológico da fruta (BARON; GOAS; DRILLEAU, 1982).

Tabela 1. Frações nitrogenadas do mosto de maçãs.

Nitrogênio total (método de Kjeldahl)	Fração nitrogenada	Nitrogênio total
	Forma amina	15,2 a 61,2 %
	Forma amida	5 a 30 %
	Forma amoniacal	Máximo 1 %

Fonte: Burroughs (1957).

Segundo Drilleau (1993) o teor de nitrogênio total de 27 mostos de maçãs francesas analisados, 25 % tinha menos de 75 mg/L, 51 % entre 75 a 150 mg/L, e o restante apresentou teores superiores a 150 mg/L. Este mesmo autor constatou que o teor de nitrogênio varia entre os pomares para a mesma cultivar e também de acordo com as safras, além da idade dos pomares, que quanto mais novos resultam em maior teor de nitrogênio nas frutas. Além disso,

o teor pode variar de acordo com a adubação nitrogenada realizada nos pomares (BARON; BOHUON; DRILLEAU, 1977).

Tabela 2. Aminoácidos no mosto de maçã.

Aminoácidos	Concentração (mg/L)
Ácido aspártico	20-350
Ácido glutâmico	10-300
Glutamina	max. 25
Asparagina	100-1500
Serina	5-60
Treonina	1-20
Glicina	máx. 10
Alanina	1-50
Valina	max. 40
Metionina	max. 30
Isoleucina	max. 10
Leucina	max. 10
Tirosina	max. 10
Fenilalanina	max. 15
Ácido aminobutírico	1-30
Ornitina	max. 1
Lisina	max. 10
Histidina	max. 10
Arginina	max. 10

Fonte: Lea; Drilleau (2003).

3.4.1 Metabolismo do nitrogênio

Os compostos nitrogenados podem afetar a célula de duas maneiras, [1] pelo aumento da produção de biomassa (constitui de 3 a 10 % da matéria seca da célula), e [2] acelerando o processo de metabolização dos açúcares (HENSCHKE; JIRANEK, 1992). Como consequência afeta a velocidade da reação, e a falta deste nutriente no mosto é uma das causas de fermentação lenta, uma vez que ele está relacionado ao transporte dos açúcares (BISSON, 1991).

Durante a fermentação, os compostos nitrogenados são absorvidos do meio através de transporte ativo, no início da fase de crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* e estocados nos vacúolos até serem utilizados quando for necessário para síntese de proteínas (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998).

Leveduras apresentam a capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos nitrogenados para seu crescimento, sendo degradados em dois produtos finais, amônia ou glutamato (CASSELAS, 2005). O glutamato pode ser sintetizado a partir da amônia e do α -cetoglutarato, intermediário do ciclo do ácido cítrico, através da ação da glutamato desidrogenase a NADP^+ (NADP^+ -GDH). A formação da glutamina a partir do

Estes microrganismos metabolizam diferentes fontes de nitrogênio para seu crescimento, mas nem todas as formas são igualmente assimiladas. *S. cerevisiae* não tem a capacidade de metabolizar proteínas, devido à ausência de enzimas capazes de hidrolisar estas moléculas (PRETORIUS, 2000). Amônia, glutamina e asparagina são preferencialmente assimiladas, enquanto que a prolina e a uréia são pouco metabolizadas. A sequencia de consumo é influenciada pela presença de íons amônio, e pela concentração total de nitrogênio. Jiranek, Langridge e Henschke (1995) investigaram a cinética de utilização de aminoácidos em presença ou ausência de íons amônio em condições enológicas. Na ausência de íons amônio foi observado um padrão de utilização dividido em quatro grupos (Tabela 3). No início da fermentação, ocorre imediata assimilação dos componentes do grupo A, enquanto os do grupo B apresentam um tempo de latência. Os aminoácidos do grupo C apresentam certo tempo de latência que corresponde ao final da absorção do Grupo A. O grupo D, onde situa-se a prolina, não é assimilado pela levedura.

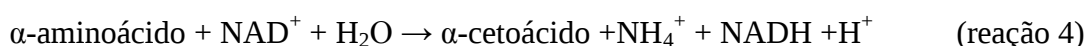
Tabela 3. Cinética de absorção dos aminoácidos e amônia durante a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* em mosto de uvas.

Grupo	Metabolismo	Aminoácidos
A	Rápida	Arg, Asp, Asn, Gln, Ile, Leu, Lis, Ser, Thr, NH ₃
B	Lenta	Glu, Ala, His, Met, Phe, Val
C	Assimilação ocorre quando o grupo A está esgotado	Gly, Trp, Tyr
D	Não é assimilada	Pro

Fonte: Jiranek; Langridge; Henschke (1995).

Os íons amônio são assimiláveis rapidamente e podem satisfazer a necessidade em compostos nitrogenados da célula, uma vez que, a levedura *S. cerevisiae*, tem a capacidade de sintetizar seus aminoácidos (CASSELAS, 2005).

Em mostos com baixo teor ou ausência de amônia, as leveduras utilizam as reservas de aminoácidos como doadores de grupamentos amina, que são transferidos para o α -cetoglutarato formando o glutamato. Esta reação é catalisada por transaminases que tem como cofator o fosfato de piridoxal que é derivado da piridoxina (vitamina B₆) (RIBÉREAU-GAYON et al., 1998). Em seguida, o glutamato é desaminado para formar íons amônio (Figura 5). O balanço final pode ser observado na reação 4.



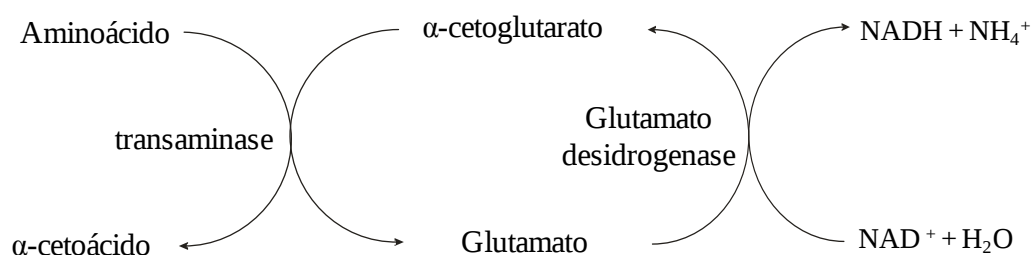


Figura 5. Catabolismo dos aminoácidos.
 Fonte: Ribéreau-Gayon et al. (1998)

3.4.2 Influência do nitrogênio sobre a fermentação

O desequilíbrio da razão carbono-nitrogênio, durante a fermentação, pode causar lentidão ou até mesmo interrupção do processo. Este problema ocorre devido a baixas concentrações, ou esgotamento de compostos nitrogenados assimiláveis que ocasiona redução do transporte das hexoses para dentro da célula (PRETORIUS, 2000).

O transporte de açúcares é regulado pela disponibilidade de nitrogênio assimilável no meio externo e pela atividade de síntese proteica das células (WALKER, 1998). No momento em que a síntese de proteínas diminui ou cessa, ocorre uma diminuição ou interrupção do sistema de transporte. Esta inibição catabólica é especialmente acelerada quando existe carência em nitrogênio assimilável no meio (SALMON; MAURICIO, 1994). A adição de nitrogênio assimilável durante esta fase, se não for realizada de forma tardia, permite restaurar parcialmente uma atividade de síntese proteica e, conseqüentemente uma reativação dos sistemas transportadores das hexoses, restaurando em parte a atividade fermentativa (BELY; SALMON; BARRE, 1994; SALMON, 1989). Isto explica porque em mostos com elevado teor de nitrogênio o tempo para exaustão dos açúcares do meio será menor, e conseqüentemente a velocidade de fermentação maior.

Os álcoois superiores, responsáveis pelo aroma do produto, podem ser produzidos pela levedura a partir de esqueletos carbônicos dos aminoácidos, assimilados durante a fermentação alcoólica. Os principais álcoois superiores sintetizados durante a fermentação alcoólica são o 1-propanol ou n-propanol, 2-metil-1-propanol ou isobutanol, 2-metil-1-butanol ou álcool amílico ativo e 3-metil-1-butanol ou álcool isoamílico e o feniletanol (BARRE et al., 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; WALKER, 1998).

Para evitar problemas na fermentação é comum a adição de suplementos ao mosto com sais de amônio, como sulfato de amônio. Entretanto a adição excessiva de nitrogênio inorgânico pode resultar em produtos com elevado teor de nitrogênio residual, principalmente

se o teor inicial do mosto for elevado. Isto torna o produto instável microbiologicamente, além do acúmulo de etil carbamato e álcoois superiores que diminuem a qualidade do produto (BELTRAN et al., 2005; GOÑI; AZPILICUETA, 1999). A produção de etil carbamato deve ser evitada uma vez que esta substância é cancerígena (OUGH; CROWELL; MOONEY, 1988).

3.5 Oxigênio

Durante o processamento de fermentados, o mosto entra em contato com o ar, o que resulta em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido no mosto (Tabela 4). Apesar disto, não está presente em grandes quantidades em vinhos, uma vez que quando dissolvido é rapidamente consumido até seu desaparecimento completo (VIVAS, 1999). O oxigênio influencia a qualidade do vinho tanto pela ação bioquímica do mosto quanto pela ação sobre o metabolismo das leveduras (ROSENFELD; BEAUVOIT, 2003).

Tabela 4. Adições de oxigênio pelas operações unitárias durante o processamento de mosto de uva.

Operações	Oxigênio dissolvido (mg/L)
Prensagem	3-5
Bombeamento	2
Transferência entre tanques	6
Filtração	4-7
Trasfega	3-5
Centrifugação	8
Engarrafamento	0,5-3
Envelhecimento em barris	20-45/ano

Fonte: Vivas et al. (2003).

3.5.1 Escurecimento enzimático

No processamento do mosto de maçã a reação de escurecimento enzimático inicia pelo contato da polifenoloxidase (PPO) com ácidos fenólicos em presença do oxigênio, na operação de trituração (DuTOIT et al., 2006). Como resultado, formam-se as quinonas altamente reativas que se polimerizam com polifenóis para formar compostos oxidados chamados de melanoidinas (MELO; VILAS BOAS, 1996).

As polifenol oxidases (1,2 benzenodiol: oxigênio óxido-redutase) são enzimas encontradas na maioria das plantas superiores e sua denominação “polifenol oxidase” se refere a enzimas cuja principal característica é a capacidade de utilizar oxigênio molecular durante a oxidação de compostos fenólicos. A polifenol oxidase catalisa dois tipos de reações (Figura 6), ambas usando oxigênio molecular: a) hidroxilação de monofenóis para *o*-difenóis frequentemente referida como atividade de cresolase (EC 1.14.18.1); b) oxidação de *o*-

difenóis quando se refere à atividade de catecolase (EC 1.10.3.1) (MARTINEZ; WHITAKER, 1995; OSZMIANSKI; LEE, 1990).

Basicamente, a reação cresolase catalisa a oxidação de fenol monohídrico, tal como a tirosina e *o*-cresol para formar o grupo hidroxila na posição orto e a reação catecolase envolve a remoção de dois átomos de hidrogênio de *o*-difênol, tais como catecol, ácido clorogênico ou 3-4 dihidroxi-fenilalanina, para formar a correspondente *o*-diquinona (SHAHIDI; NACZK, 1995). As quinonas formadas são substâncias altamente reativas com outras quinonas, aminoácidos ou proteínas, formando compostos coloridos, resultando na perda de coloração de frutas e seus produtos devido à degradação de compostos fenólicos. A atividade catecolase envolve a oxidação de dois *o*-difênóis a duas *o*-quinonas com a redução de quatro elétrons de O_2 , o que forma duas moléculas de água (WHITAKER, 1994).

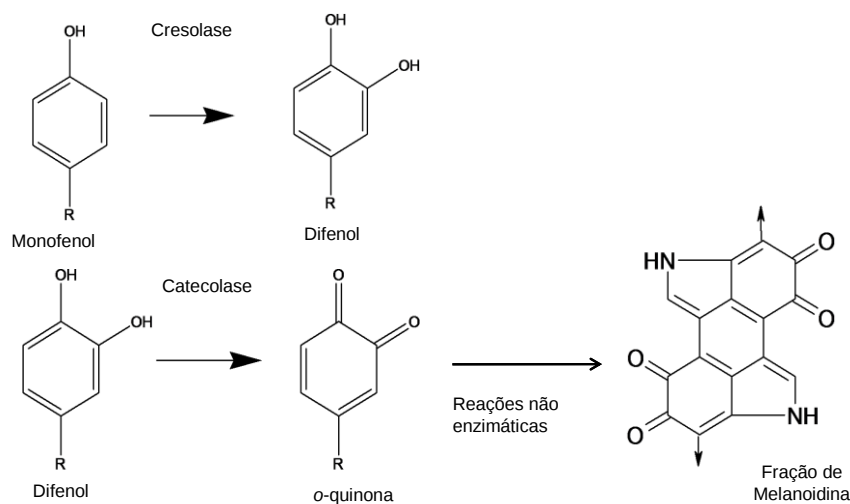


Figura 6. Etapas do escurecimento enzimático da maçã.
Fonte: Whitaker (1994).

Nos tecidos vivos, a enzima polifenol oxidase (PPO) e o substrato fenólico estão separados dentro da célula. No momento da extração ou de algum outro processo que danifique a célula, a enzima e o substrato entram em contato, ocorrendo então a reação.

Na maçã, o ácido clorogênico e as catequinas são sensíveis à oxidação pela PPO (OLIVEIRA et al., 2008; ROCHA; MORAIS, 2001). Entretanto, Alonso-Salces et al. (2004) reportaram que o ácido *p*-cumárico é um inibidor não-competitivo da PPO de maçã, a qual catalisa a oxidação do ácido clorogênico.

No centro ativo da enzima existem dois íons cobre, cujos campos de ligação contêm dois resíduos de histidina cada um. A enzima liga primeiramente o oxigênio e depois o monofenol, como indicado na Figura 7. A mudança de valência dos íons cobre ($Cu^+ \rightarrow Cu^{++}$)

provoca a formação de complexo enzima-substrato, no qual a ligação *orto* – *orto* fica tão polarizada que ocorre a hidroxilação, seguida da formação de um *o*-difenol. A oxidação do *o*-difenol a *o*-quinona termina o ciclo (BELITZ; GROSCH, 1997). As quinonas são compostos amarelados, instáveis e reativos que podem reagir entre si formando polímeros com elevado peso molecular de cor escura, denominados melanoidinas; formar complexos com aminoácidos ou proteínas; e oxidar compostos com baixo potencial de oxidoredução (NICOLAS et al., 1994; VÁMOS-VIGYÁZÓ, 1982).

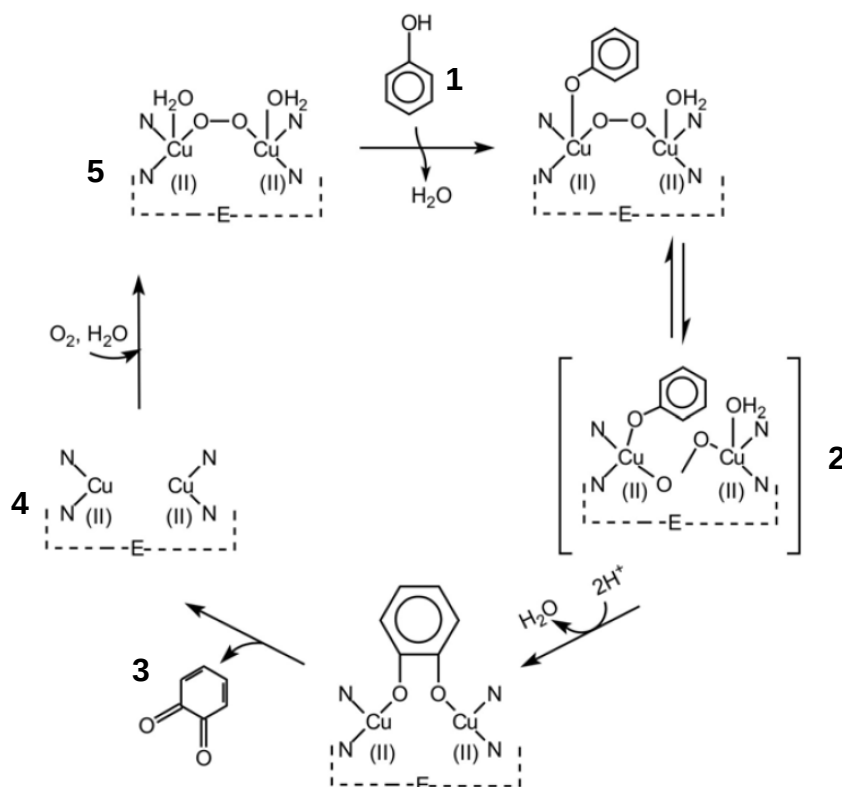


Figura 7. Mecanismo geral de reação da polifenoloxidase. Composto fenólico (1); complexo enzima-substrato (2); *o*-quinona (3); parte da enzima onde ocorrerá a reação (4); sítio ativo da enzima (5).

Fonte: Belitz; Grosch (1997).

3.5.2 Vias de utilização do oxigênio pela *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae consiste em um microrganismo com metabolismo anaeróbico facultativo, ou seja, capaz de metabolizar a glucose tanto em aerobiose quanto anaerobiose. Pertence ao grupo das leveduras Crabtree-positivas, uma vez que, em meios com alta concentração de açúcares fermentescíveis é observada uma repressão da atividade respiratória devido ao acúmulo de piruvato advindo da via glicolítica (WALKER, 1998). Nestas condições, devido à baixa quantidade de enzimas respiratórias e citocromos

"mitocondriais" a fosforilação oxidativa não ocorre de forma significativa em condições fermentativas (ROSENFELD; BEAUVOIT, 2003).

Em aerobiose, a oxidação de substratos, o transporte de elétrons pelos complexos respiratórios (I, II, III) e a redução do oxigênio a água por terminal citocromo *c* oxidase (complexo IV) são os responsáveis pela síntese de adenositrifosfato (ATP) através de um acoplamento quimio-osmótico (MITCHELL, 1961). Este conjunto de reações são essencialmente catalisadas pelos cinco complexos que se situam na membrana interna da mitocôndria. O complexo I (NADH CoQ redutase), o complexo II (succinato ubiquinona redutase), o complexo III (CoQH₂ citocromo *c* redutase) e o complexo IV (citocromo *c* oxidase) são responsáveis pela transferência de elétrons. O quinto e último complexo (ATP sintase) utiliza a energia da transferência para sintetizar ATP a partir de ADP e Pi (MITCHELL, 1961; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998).

O consumo de oxigênio pela levedura em condições enológicas (baixo teor de oxigênio) não prejudica o processo fermentativo. Sob estas condições o oxigênio é utilizado em várias vias metabólicas, sendo a principal delas a síntese de esteróis e ácidos graxos, que tem papel importante na permeabilidade da membrana, o que influencia a tolerância ao etanol, capacidade fermentativa e viabilidade da célula (SABLAYROLLES; BARRE, 1986).

Nestas condições, as mitocôndrias estão presentes nas células de *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, esta organela, chamada de promitocôndria, apresenta diferenças na sua estrutura, como a redução de citocromos, oxidases e F₁-ATPase. Desta forma, tem baixa capacidade oxidativa durante uma possível oxigenação transitória nas células (DuTOIT et al., 2006; ROSENFELD et al., 2003; ROSENFELD et al., 2004; VALERO et al., 2001).

Em condições enológicas, a síntese de esteróis apresenta uma significativa contribuição, entre 30 a 75 %, no consumo de oxigênio pelas células cultivadas anaerobicamente (ROSENFELD et al., 2002; ROSENFELD et al., 2003). Porém, no processamento de cerveja e sidra, a porcentagem de oxigênio utilizado é menor, 20 a 30 % (KIRSOP, 1977; O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1996) e 10-25 % (NOGUEIRA et al., 2004), respectivamente.

Além da síntese de esteróis e ácidos graxos, o oxigênio é utilizado em outras reações metabólicas, como a síntese de porfirina, a clivagem do anel de prolina, ou atividade de catalase, porém em quantidades muito menores (O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1996; ROSENFELD et al., 2003; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998). Devido aos baixos níveis de enzimas respiratórias e citocromos mitocondriais, a fosforilação oxidativa

clássica não ocorre de forma significativa nas condições de fermentação alcoólica (O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1996; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998), desta forma a via respiratória clássica pouco contribui no consumo do oxigênio (ROSENFELD et al., 2003; ROSENFELD et al., 2004).

Os esteróis são constituintes lipídicos essenciais da membrana plasmática, uma vez que regulam sua permeabilidade e fluidez. São reguladores do metabolismo aeróbio, do ciclo celular e do transporte e absorção de outros esteróis exógenos. O principal esterol, o ergosterol, é acoplado à membrana e corresponde a 50 % dos esteróis da célula de levedura (ALEXANDRE et al., 1994). Sua síntese envolve 25 reações e requer 10 ATPs e 16 NADPH para cada molécula de ergosterol formado. Além disso, 12 ATPs são necessárias para as reações de metilação da cadeia lateral (O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1996).

Ácido mevalônico (ácido 3,5-diidroxi-3-metilvalérico) o primeiro intermediário da biossíntese de esteróis, é formado pela condensação de acetil-CoA com acetoacetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril que é então reduzido a ácido mevalônico (Figura 8). Este último é convertido na sua forma isoprenóide estrutural (dimetilalil pirofosfato) e em seguida à Isopentenil pirofosfato. Reações de condensação levam a formação de esqualeno. Em seguida ocorre a ciclização do esqualeno à lanosterol. Na *Saccharomyces cerevisiae*, lanosterol é convertido a zymosterol, que segue para a mitocôndria, onde ocorre a metilação à fecosterol. No retículo endoplasmático, o fecosterol é finalmente convertido a ergosterol (WALKER, 1998).

Em condições anaeróbicas, as leveduras não conseguem sintetizar ergosterol, havendo a necessidade de suplementação do meio com esteróis. Oxigênio molecular é necessário para a conversão de esqualeno em ergosterol: 1 molécula de O₂ é necessário para a conversão de esqualeno em lanosterol, 9 de moléculas são necessárias para a conversão do lanosterol para zymosterol e 2 são necessários para a conversão de zymosterol de ergosterol (ROSENFELD et al., 2003).

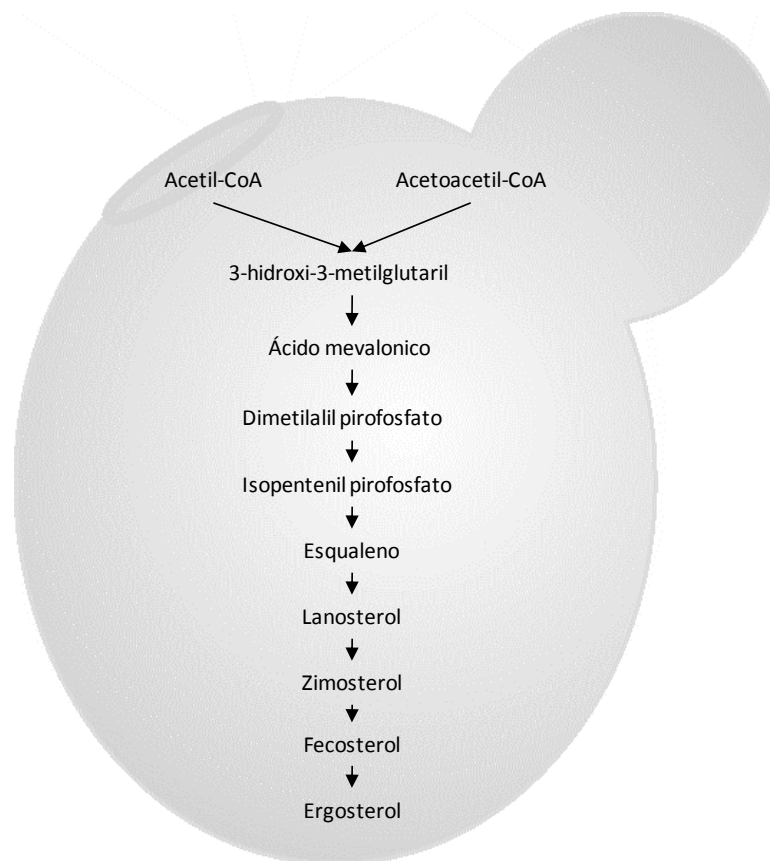


Figura 8. Biossíntese do ergosterol.
Fonte: Pretorius (2000).

3.5.3 Influência da adição de oxigênio no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

Em meio anaeróbio, as leveduras mantêm uma capacidade moderadamente alta para o consumo de oxigênio durante a fermentação alcoólica, que pode ser atribuído a diferentes vias metabólicas que dependem do tipo de substrato de fermentação (cerveja, vinho ou sidra) (SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998). A adição de oxigênio em fermentações em condições enológicas e na cervejaria é uma prática comum e legal, quando se suspeita de fermentação lenta, ou até mesmo, parada do processo fermentativo, a fim de melhorar a síntese de biomassa e, conseqüentemente, a velocidade de fermentação. Entretanto esta adição é eficiente no final da fase de crescimento (SABLAYROLLES, 1990; SABLAYROLLES; BARRE, 1986), e em concentrações que variam entre 5-10 mg/L. A adição de oxigênio é menos eficaz no momento do inóculo, uma vez que enzimas como a polifenoloxidase, podem ainda estar ativas, ocorrendo a oxidação de compostos. A quantidade de oxigênio necessária por uma levedura é variável e afetada por vários fatores como a cepa de levedura, a quantidade de inóculo, o método de crescimento, condições de fermentação e do momento da aplicação de oxigênio (O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1996).

O efeito da adição de oxigênio depende da composição do meio, principalmente da composição dos chamados fatores de crescimento em anaerobiose (FCA), ou seja, esteróis e ácidos graxos insaturados (ALEXANDRE et al., 1994; HOUTMAN; DU PLESSIS, 1986; JULIEN et al., 2000). Sob condições enológicas, quanto mais oxigênio ou esteróis exógenos estiverem disponíveis durante o crescimento, menor é a contribuição da síntese de esteróis no consumo de oxigênio (ROSENFELD et al., 2003; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998). Rosenfeld e colaboradores (2003), em mostos de uva, demonstraram que a síntese de lipídeos e um ótimo crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação alcoólica, requer entre 5,0 a 7,5 mg de oxigênio. Entretanto, no processamento de sidra os teores de oxigênio requeridos para que a fermentação transcorra sem interrupções são bem menores, entre 1,5 e 2,0 mg/L (NOGUEIRA et al., 2004).

No trabalho realizado por O'Connor-Cox, Lodolo e Axcell (1996) pode ser observado que o fornecimento de oxigênio dissolvido acarretou maior velocidade de crescimento da levedura e, conseqüentemente, rápida absorção de nitrogênio assimilável. Enquanto que a inibição da síntese de lipídeos, através do uso de inibidores, causa uma desaceleração significativa do crescimento.

Salmon, Fornairon e Barre (1998) demonstraram que um pulso de oxigênio dissolvido (1-10 mg/L) pode estimular a fermentação alcoólica, mesmo na presença de excesso de ergosterol e ácido oléico, sem a indução da cadeia respiratória mitocondrial. Esse fenômeno parecia contradizer exteriormente o efeito conhecido Pasteur (ou seja, inibição da glicólise pela respiração mitocondrial). No entanto, a adição de oxigênio estimula a fermentação apenas moderadamente, influenciando a longo prazo a capacidade fermentativa, ou seja, na sobrevivência da levedura, devido a maior tolerância ao etanol (ROSENFELD et al., 2003).

A adição de O₂ garante uma fermentação completa, especialmente em países como África do Sul, onde as uvas têm concentrações relativamente elevadas de açúcar. A adição de oxigênio ao mosto ocasiona a produção de maiores concentrações de ésteres, álcoois superiores pela *S. cerevisiae* (VALERO et al., 2002).

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, H.; NGUYEN VAN LONG, T.; FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. Contribution à l'étude des bourbes: influence sur la fermentescibilité des mouts. **Revue Française d'Œnologie**, v. 146, p. 11-19, 1994.
- ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BEATRIZ, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, B. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2938-2952, 2004.
- AWAD, M. A., DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 3, p. 249-263, 2000.
- BARON, A., G. BOHUON, DRILLEAU, J. F. Remarques sur l'indice formol des concentrés de jus de pomme. **Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique**, v. 70, n. 749, p. 19-26, 1977.
- BARON, A.; GOAS, M.; DRILLEAU, J. F. Évolution au cours de la maturation, des fractions azotées et des acides aminés dans la pomme et dans le moût correspondant. **Sciences des Aliments**, v. 2, n. 1, p. 15-23, 1982.
- BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000. p. 274-315.
- BATAILLON, M.; RICO, A.; SABLAYROLLES, I. M.; SALMON, J. M. BARRE, P. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.82, p. 101-106, 1996.
- BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 119-120.
- BELTRAN, G.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 996-1002, 2005.

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

BISSON, L. F. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 172-184, 1991.

BISSON, L. F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

BLATEYRON, L.; ORTIZ-JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M., Stuck fermentations: oxygen and nitrogen requirements – importance of optimising their addition. **Australian NZ Grapegrower & Winemaker**, v. 478, p. 73-79, 2003.

BRASIL. Resolução CNS/MS n. 04, de 24 de novembro de 1988. **Diário Oficial da União**, 19 dez. 1988.

BURROUGHS, L. F. The amino-acids of apple juices and ciders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.8, n.3, p.122-131. 1957.

CABRANES, C; BLANCO, D.; MANGAS, J. J. Characterization of fermented apple products using data obtained from GC analysis. **Analyst**, v. 123, n. 10, p. 2175-2179, 1998.

CASSELAS, G. B. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism**. Tese de doutorado. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, 2005.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 197-200, 1986.

DRILLEAU, J. F. La Sidra. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editotial Acirbia, 1995. p. 113-123.

DRILLEAU, J. F. Réunion annuelle Certec : azote et fermentation ; composés phénoliques et oxydation. **Pomme**, n. 33, p. 24-25, 1993.

DuTOIT, W. J. Oxygen in must and wine: a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 27, n. 1, p.76-104, 2006.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). **A cultura da Macieira**. Florianópolis: GMC/ Empresa de pesquisa Agropecuaria e Extensão Rural de Santa Catarina, v. 2, 2002. p. 743.

FERREIRA, P. Yes, nós temos maçãs. **Inovação em Pauta**, 5 ed., p. 43-47, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Statistical Databases**. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4018-4024, 1999.

GUYOT, S.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J. F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HEATHERBELL, D. A. Fruit juice clarification and fining. **Confructa Studien**. n. 28, p. 192-197, 1984.

HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts - metabolism of nitrogen compounds. In: FLEET, G. H. (Ed.) **Wine microbiology and biotechnology**. New York: CRC Press, 1992. p.77-164.

HOUTMAN, A. C.; DU PLESSIS, C.S. Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. **African Journal for Enology and Viticulture**, v. 7, p. 39-46, 1986.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. **Gráficos climatológicos**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/html/clima.php?lnk=http://www.inmet.gov.br/html/clima/graficos/index4.html>>. Acesso em 17/01/2011.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by-assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 461-467, 1995.

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.

KIRSOP, B. H.. Developments in beer fermentation. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, v. 6, p. 79-131, 1982.

LEA, A.; DRILLEAU, J. F. Cider-making. In: LEA, A. (Ed.). **Fermented Beverage Production**. London, v.2, 2003. p.59-87.

LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Revue des Œnologues**, n. 88, p. 17-20, 1998.

MANGAS, J. J.; RODRIGUEZ, R.; SUAREZ, B.; PICINELLI, A.; DAPENA, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivar at maturity by multivariate techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4046-4052, 1999.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 195-200, 1995.

MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. D. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 110-115, 2006.

MESAS, J. M.; ALEGRE, M. T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 4, p. 174-183, 1999.

MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144-148, 1961.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109-157, 1994.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidricola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 2003. Tese (Doutorado em Bioprocessos Tecnológicos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

NOGUEIRA, A., GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1025-1032, 2008b.

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

NOGUEIRA, A. ; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; SALMON, J. M. Competition entre microorganismes et PPO/polyphenols vis a vis de l'oxygène. In J. F. DRILLEAU (Ed.), **Cidre et polyphenols: les polyphenols natifs des pommes a cidre. Presence, devenir et rôle**. Rapport final Du Programme Interregional de Recherche Bretagne & Pays de la Loire (2001–2003) no. 691, operation no. AOCAZ3 (pp. 1–16). Le Rheu: INRA, 2004.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 113-139.

OH, H.; HOFF, J. E. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. **Journal of Food Science**. v. 52, p. 1267-1269, 1987.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N. F. F.; de PAULA, C. D.; VIANA, G. A. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

O'CONNOR-COX, E. S. C., LODOLO, E.J., AXCELL, B.C. Mitochondrial relevance to yeast fermentative performance: a review. **The Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 19-25, 1996.

OUGH C. S.; CROWELL E. A.; MOONEY L. A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, p. 243-249, 1988.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Inhibitory effect of phenolics on carotene bleaching in vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 688-690, 1990.

OSZMIANSKI, J.; WOJDYŁO, A. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. **European Food Research and Technology**, v. 224, n. 6, p. 755-762, 2007.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Aptidão industrial de seis cultivares de maçã (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PÉRÈS, P. N. O mercado da maçã no Brasil e no mundo. **I Frutivar**, 2009. Disponível em <www.abpm.org.br>. Acesso em 02/12/2010.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P. ; DUBOUDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d'oenologie. 1-Microbiologie du vin et vinifications**. Paris: La Vigne, v. 1. 1998. 617 p.

ROCHA, A. M.; MORAIS, A. M. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagored" apple. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 85-90, 2001.

ROGER, J. M.; SABLAYROLLES, J. M.; STEYER, J. P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n.7, p. 804-815, 2002.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. M. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 113-121, 2003.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; RIGOULET, M.; SALMON, J. M. Nonrespiratory oxygen consumption pathways in anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence and partial characterization. **Yeast**, v. 19, p. 1299–1322, 2002.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 13, p. 1115-1144, 2003.

ROSENFELD, E.; SCHAEFFER, J.; BEAUVOIT, B.; SALMON, J. M. Study of yeast promitochondria isolated during anaerobic stationary phase. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 85, p. 9–21, 2004.

SABLAYROLLES, J. M. Besoin en oxygène lors des fermentations oenologiques. **Revue Française d'oenologie**, v. 124, p.77-79, 1990.

SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Evolution de la solubilité de l'oxygène au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. **Sciences des Aliments**, n. 6, p. 177-184, 1986.

SALMON, J. M. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 953-958, 1989.

SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 2, p. 154-163, 1998.

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, p. 89-84, 1994.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol–protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80–85, 1996.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage—a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1478–1487, 1992.

TAJCHAKAVIT, S., BOYE, J. I.; BÉLANGER D.; COUTURE, R. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. **Food Research International**, v. 34, n. 5, p. 431-440, 2001.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

VALERO, E.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* (M330-9) in enological fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 33-38, 2001.

VALERO, E.; MOYANO, L.; MILLAN, M. C.; MEDINA, M.; ORTEGA, J. M. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, v. 78, p.57-61, 2002.

VÁAMOS-VIGYÁZÓ, L.; NÁDUDVARI-MÁRKUS, V. Enzymatic browning, polyphenol content, polyphenoloxidase and peroxidase activities in pear cultivars. **Acta Alimentaria**, v. 11, p. 157-160, 1982.

VANZANI, P., ROSSETTO, M. RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution peroxyl radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3377-3382, 2005.

VIVAS, N. Acquisitions récentes sur l'oxydoréduction des vins rouges lors de leur élevage. **Revue des oenologues**, v. 90, p. 15-20. 1999.

VIVAS, N. ; DEBEDA, H.; MENIL, F.; VIVAS DE GAULEJAC, N.; NONIER, M. F. Mise en évidence du passage de l'oxygène au travers des douelles constituants les barriques par l'utilisation d'un dispositif original de mesure de la porosité du bois. Premiers résultats. **Science des Aliments**, v. 23, p. 655-678. 2003.

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

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2 ed. New York: Marcel Oesker, 1994.

WOSIACKI, G.; CHERUBIN, R. A.; SANTOS, D. S. Cider processing in Brazil. **Fruit processing**, v. 7, n.7, p. 242-249, 1997.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apple cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 1, p. 9-22. 2008.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation of Paraná – Brazil. **Fruit processing**, v. 11, n. 5, p. 177-182, 2001.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. N. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçãs: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 347-352, 2004.

WOSIACKI, G.; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F. The apple and its fructose content cultivar sansa – a case study. **Publicatio**, v. 11, n. 2, p. 27-39, 2005.

CAPÍTULO II: Apple Wine Processing With Differents Nitrogen Contents.

APPLE WINE PROCESSING WITH DIFFERENTS NITROGEN CONTENTS

ABSTRACT

Nitrogen plays an important role in apple wine fermentation as a limiting factor, leading at low concentrations to "stuck" or sluggish fermentation. The objective of this work was to evaluate the nitrogen content in different varietal apple musts and to verify the effect of different nitrogen concentrations in apple wine fermentation. The total nitrogen content in 51 different apples juices samples were analyzed, and the average value was 155.81 mg/L, with 86.28 % of the values above 100 mg/L. The apple must with 59.0, 122.0 and 163.0 mg/L of total nitrogen content, showed the maximum population of 2.05×10^7 ; 4.42×10^7 and 8.66×10^7 cell/mL, respectively. Therefore, the maximum fermentation rates were dependent of the initial nitrogen level, corresponding to 1.4, 5.1 and 9.2 g/L.day, respectively. The nitrogen content in apple musts consists in an important factor of growth and fermentation velocity.

Key words: Fermented apple juice, fermentation rate, cider, yeast.

1 INTRODUCTION

The apple juice fermentation process used to obtain a pleasant alcoholic beverage was a current practice in the Eastern Mediterranean more than 2000 years ago (Laplace, J. M. et al., 2001) and today fermented apple juice is used as the basis for manufacturing cider, a sparkling and refreshing fruit flavored beverage, consumed in many countries in the world.

Apple juice, from commercial or industrial fruits, contains all necessary nutrients for yeast growth (Binnig, R. and Possmann, P., 1993; Downing, D. L., 1989; Smock, R. M. and Neubert, A. M., 1950). The main sources of carbon and energy are soluble sugars, and the concentration of 120 g/L is enough to allow the yeast growth to reach around

6.0×10^7 cell/mL (Nogueira, A. and Wosiacki, G., 2010).

However, sluggish apple juice fermentations seems to be associated with raw material when there are not sufficient levels of nutrients as available nitrogen, with technological factors like low dissolved oxygen due to enzymatic browning reactions before yeast exponential growth phase or phytosterol and unsaturated fatty acid elimination by excessive must clarification. It is also present the microbiological factor as the yeast competition with non-*Saccharomyces* yeasts towards essential nutrients (Drilleau, J. F., 1990; Lea, A. G. H. and Drilleau, J. F., 2003; Nogueira, A., 2003).

The available nitrogen content of the apple juice, usually ranging from 27 up to 574 mg/L, is considered the main limiting factor of yeast growth (Cruz, S. H. et al., 2002; Drilleau, J. F., 1990). In the alcoholic fermentation the available nitrogen content is need in the stationary phase (corresponding to 80 % of the alcoholic fermentation) to stimulate the protein synthesis particularly for the sugar transport systems (Bely, M. et al., 1994), improving the microbial metabolism and reaching up to 10 % of the yeast dry weight (Goñi, D. T. and Azpilicueta, C. A., 1999; Julien, A. et al., 2000; Julien, A. et al., 2001; Ribereau-Gayon, P. D. et al., 1998).

Some factors like the juice composition and the kind of the yeast strain can affect the assimilation of the nitrogen compounds (Colombié, S. et al., 2007; Julien, A. et al., 2000; Manginot, C. et al., 1998) as the metabolism of amino acids can affect the efficiency of the alcoholic fermentation and the quality of the product (Salmon, J. M. and Barre, P., 1998).

The nitrogen fraction in apple juice comprehends the amino acids asparagine, glutamine, aspartic acid, glutamic acid and serine, representing together from 86 to 95 % of total amino acids, and they are rapidly assimilated by yeasts. In harvested fruits from orchards with extremely high fertilizations, the concentration of nitrogen compounds in the juices may be up to 5 times higher (Lequéré, J. M. and Drilleau, J. F., 1998) than usual. The amount of nitrogen in apple juices can be low (<75 mg/L) or high (>150 mg/L) depending, mainly, on the age of the orchards and the amount of fertilization (Drilleau, J. F., 1993). These facts can explain the influence on yeast growth, decreasing or interrupting it, the relationship between the initial concentration and the maximum fermentation rate, the kinetic of aroma production and the microbiological instability in naturally gasified cider, with bottle explosions (Garde-Cerdán, T. and Ancin-Azpilicueta, C., 2008; Goñi, D. T. and Azpilicueta, C. A., 1999; Ingledew, W. M. and Kunkee, R. E.,

1985; Nogueira, A. and Wosiacki, G., 2010; Ough, C. S. et al., 1991; Pérez-Zúñiga, F. J. et al., 1997).

The nitrogen content in apples can vary when they are harvested in different orchards, and also in the same place, from crop to crop (Drilleau, J. F., 1996), because the values can be influenced by the area, amount and kind of nitrogen fertilizations and by the season (Baron, A. et al., 1977).

In Brazil the addition of nitrogen, as ammonium phosphate or thiamine is a common praxis in the apple juice fermented sector, to adjust the chemical composition of the juice before inoculation with commercial dry yeast. This procedure prevents the sluggish fermentations and ensures a rapid fermentation (5-10 days) associated with room temperature varying from 20-35 °C (Nogueira, A. and Wosiacki, G., 2010). However, as previous nitrogen analysis is not a usual practice; the nitrogen level can rise too much if the natural concentration is already high. The product becomes chemical and microbiological unstable, with a high production of ethyl carbamate and an excess of higher alcohols (above 400 mg/L) which can explain a negative effect on the quality of cider (Beltran, G. et al., 2005; Goñi, D. T. and Azpilicueta, C. A., 1999).

In Brazilian cider processing conditions the effect of nitrogen in the alcoholic fermentation and cider quality was not deeply studied and this work was done aiming to evaluate the influence of the nitrogen content in the apple must during processing on apple juice fermentation process and product.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Apple varieties

Samples of 51 apples varieties were used for juice production, harvested from 2003 up to 2006 from different places and producers of Southern States of Brazil, were used to determine the total nitrogen content. Apple samples (40 kg) of Gala, Fuji and Joaquina cultivars from the Experimental Station in São Joaquim (Epagri/SC) were used for kinetic fermentation experiments.

2.2 Apple juice processing

The fruits, selected and washed, were comminuted in a laboratory microprocessor (Processing Metvisa, Type MPA) and the mass, conditioned in superposed polyethylene screens packages were submitted to a pressure of 3 kgf/cm² (Hydraulic Press Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brazil) during 5 min. The resulting juice was depectinized with enzymes (Pectinex 3XL, Novozymes) in the proportion of 3 mL/hL (60 min at 45 °C) and after sedimentation and paper filtration, it was used in the fermentation trials.

2.3 Apple juice fermentation

The juice (450 mL) of each variety was conditioned in seven Erlenmeyers (500 mL). All fermentation systems were equipped with a bung and had been previously sterilized (Vertical Sterilizer Phoenix, Model AV75) for 20 min at 1 bar (121 °C). The starter culture, a commercial yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm CK - Danstar Ferment GAC, Denmark) used in Brazil cider processing, stored in its active dry form, and re-hydrated during 20 min in a glucose solution 3.0 g/100mL, had the initial population of 2.0×10^6 cell/mL. The yeast cells were counted in a Neubauer (XB-K-25, SMIC, China) chamber (Lee, S. S. et al., 1981). The contents of the seven micro-fermenters were analyzed after 12, 24, 36, 48, 200 and 360 hours, with an initial control at the beginning (0 h), and after this time the fermented apple juice was transferred and bottled, being stabilized by storing at low temperature (5°C).

2.4 Kinetic fermentation

The fermentation was monitored by the loss of mass from the system caused by CO₂ releasing (Bely, M. et al., 1990; Roger, J.-M. et al., 2002) and the weight was determined at every two hours at a sensibility of 0.001 g during 15 days (fermentation time) at room temperature (18-25 °C). The CO₂ production rate (dCO₂/dt) was calculated by polynomial smoothing.

Two other kinetic parameters were also determined by the loss of mass, maximum specific

CO₂ production rate $[(1/X \cdot dCO_2/dt)_{\max}]$ and maximum acceleration $[(d^2CO_2/dt^2)_{\max}]$. The fermentation was considered finished $[T_{\max}]$ when total sugar content was less than 1.0 g/L (Bely, M. et al., 1990). All others fermentation experiments were run in duplicate.

2.5 Physicochemical Analysis

The reducing sugars were quantified by the classic method of Somogyi, N. (1945) and Nelson N. (1944), as well as the total reducing sugars, after hydrolysis of sucrose with HCl 1 N (50 °C/ 5 min). Glucose was quantified by the enzymatic method of glucose oxidase and sucrose and fructose were calculated by difference. All sugars were expressed in g/100mL (Tanner, H. and Brunner, H. R., 1985). The total acidity was determined by neutralization with NaOH 0.1 N with phenolphthalein as an indicator and expressed as malic acid in g/100mL (IAL, 2008). The total phenolic compounds were quantified with the Folin Ciocalteu reagent using catechin as the standard, and the results were expressed as mg/L (Singleton, V. L. and Rossi, J. A., 1965). The ethyl alcohol content was determined by ebulliometry. The total nitrogen content was determined by the method of Kjeldhal (IAL, 2008) and that of N α -amine was calculated by the formol titration according to Julien et al. (2001).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Nitrogen content in apple must

The average value found for the nitrogen content in 51 analyzed samples was 155.81 mg/L (Table 1) and the distribution frequency of the results (Fig. 1) show that 86.28 % of the samples had more than 100 mg/L. Since the average value is enough to drive to an unstable end product with high residual nitrogen content due to the fact that *Saccharomyces* sp. does not assimilate all available nitrogen in the growth phase (Nogueira, A. and Wosiacki, G., 2010), it is possible to state that this element is not a nutrient factor for Brazilian apple must alcoholic fermentation. From

a practical point of view, as in Brazil the cider is made with blends of apple juices from different varieties, those with nitrogen content less than 100 mg/L (13.72 %) would be corrected by blending without any need of supplementation.

The same kind of analysis was made in industrial French apple must in the 60's and the average nitrogen content was of 80 mg/L. This value was increased up to 130 mg/L thirty years later, in the 90's, due to an extensive nitrogen fertilization in the soil and with the effect of keeping qualities, the color and the flavor of apples (Drilleau, J. F., 1990; EPAGRI, 2002). This increase of nitrogen causes some difficulty to control of the fermentation speed and the residual content of sugar in the final product, which show troubles as cloud or haze formation in the stored cider and also microbiological instability, leading to explosions of bottles naturally gasified. These problems conducted to modifications in the processing technology, in order to keep the standard of quality of the French cider.

Table 1 - Statistic descriptive of 51 total nitrogen analysis of the apple must.

Statistic parameters	Values
Minimum, mg/L	58.82
Average, mg/L	155.81
Maximum, mg/L	330.12
Standard deviation,	57.43
Variation coefficient, %	36.86

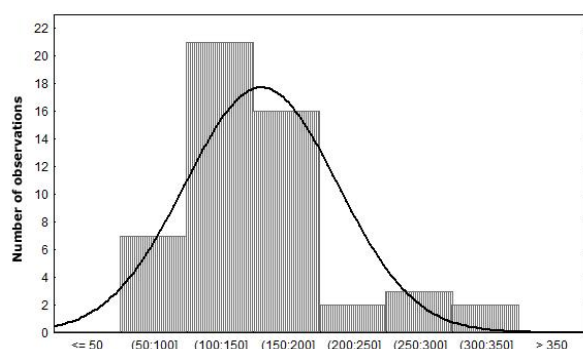


Figure 1 - Frequency distribution of the nitrogen determinations (mg/L) in 51 apple must.

3.2 Kinetic fermentation reproducibility.

The number and the precision of the loss of mass determination allowed obtaining the gas liberation rate accurately. The optimization of this system shows that the maximum fermentation rates $[(dCO_2/dt)_{max}]$ in five essays was 4.48 g/L.day with 0.072 g/L of standard deviation lead to a low variation coefficient of 1.51 % (Fig. 2). The maximum fermentation rate was reached when 4.50 ± 0.10 g/L of CO_2 was released.

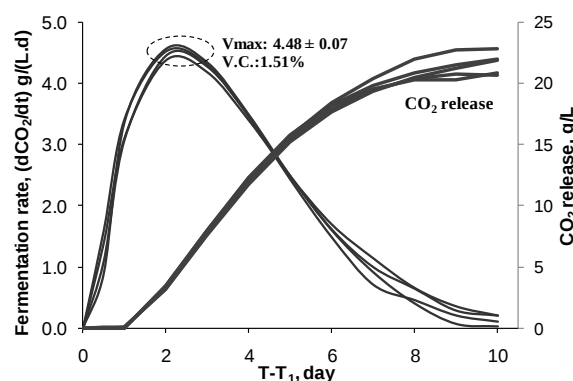


Figure 2 - Illustration of the precision of kinetic parameter in five 500 mL-flasks fermentation.

3.3 Nitrogen content and fermentation rate

For this assay were used three different apple juices. Gala and Fuji varieties that represents more than 94 % of the Brazilian apple production with participation significant in apple wine industry and apple juice of the Joaquina variety pointed with high enological aptitude for apple wine and cider (Wosiacki, G. et al., 2008). Table 2 depicts the results of the physicochemical parameters of the juices obtained from three apple cultivars.

The physicochemical composition of the juices had similar values in all analyses except in the total nitrogen level, 163.64 ± 2.41 , 122.39 ± 3.22 and 58.82 ± 6.18 mg/L, for Fuji, Gala and Joaquina cultivars, respectively, which are considered, according to (Nogueira, A. and Wosiacki, G., 2010), as high (>150 mg/L), normal (75 to 150 mg/L) and low (< 75 mg/L), respectively. The amine nitrogen content was 53.0, 30.0 and 29.0 % of the total nitrogen to Joaquina, Gala and Fuji, respectively, what is in agreement to (Burroughs, L. F., 1957) who state that the

proportion of both nitrogen in apple must corresponding from 15.2 up to 61.2 %. Asparagine accounted for up to 50 % of the soluble nitrogen content of the high nitrogen juices but was relatively less important in those of low nitrogen:

aspartic and glutamic acids were important constituents of all juices (Beech, F. W., 1993; Drilleau, J. F., 1993).

Table 2 - Physicochemical composition of three apple juices.

Physicochemical composition,	Apple juices		
	Fuji	Gala	Joaquina
Total sugar*	135.9 ± 0.61	128.6 ± 0.51	131.2 ± 0.55
Reducing sugar*	114.2 ± 0.50	104.9 ± 0.60	104.1 ± 0.19
Sucrose*	21.6 ± 0.68	23.7 ± 1.09	27.1 ± 0.54
Glucose*	23.5 ± 0.80	16.1 ± 0.26	19.7 ± 0.72
Fructose*	90.7 ± 0.54	88.8 ± 0.77	84.4 ± 0.88
Malic acid*	2.0 ± 0.02	2.5 ± 0.01	2.6 ± 0.01
Volatile acidity*	0.04	0.04	0.04
Total phenols**	309 ± 30	392 ± 60	330 ± 65
Total nitrogen**	163.64 ± 2.41	122.39 ± 3.22	58.82 ± 3.18
Amine nitrogen**	46.6 ± 0.03	37.3 ± 0.03	31.1 ± 0.01

Note: * g/L; **mg/L

In Fig. 3A, it is shown the growth profile of *S. cerevisiae* Uvaferm CK in all three authentic and varietal juices and in Table 3 are shown the kinetics values found. In the fermentation medium of Fuji cv. the yeast reached a maximum population (X_{max}) of 8.66×10^7 cell/mL in 1.56 days, which is higher than the number usually found (2 to 4×10^7 cell/mL) (Lequeré and Drilleau, 1998; Drilleau, 1996; Nogueira, A. et al., 2007a). In the case of cv. Gala the maximum population was lower (4.42×10^7 cell/mL), although still close of the usual population level at the same time (1.6 days). The fermentation medium of cv. Joaquina supported a population of 2.05×10^7 cell/mL is the usual, at longer time (1.8 days). The differences in yeast development are due to the effect of the initial nitrogen levels. In Fig. 3B it is possible to observe the consumption of available nitrogen by the yeast in all three varietal must during the fermentation. The

nitrogen consumption was 103; 86 and 27 mg/L for Fuji, Gala and Joaquina apple juice fermented, respectively. The consumption by yeast was coincident with the growth phase and the amount utilized is directly related to the maximum yeast population what is in agreement with (Drilleau, J. F., 1993) who stated that 80 to 90 % of the total nitrogen is consumed during exponential phase in cider fermentation.

The residual non-available nitrogen (lysine) or very low available nitrogen (leucine, phenylalanine, serine and tyrosine) by yeasts in apple juice fermentation may vary between from 20 up to 35 mg/L (Nogueira, A. et al., 2007b) and as the residual concentrations (Fig. 3B) are higher than these, it is probable that there is still some available nitrogen in the residue, as in the apple juice fermented Fuji, with around 60 mg/L of nitrogen residual (Fig. 3B).

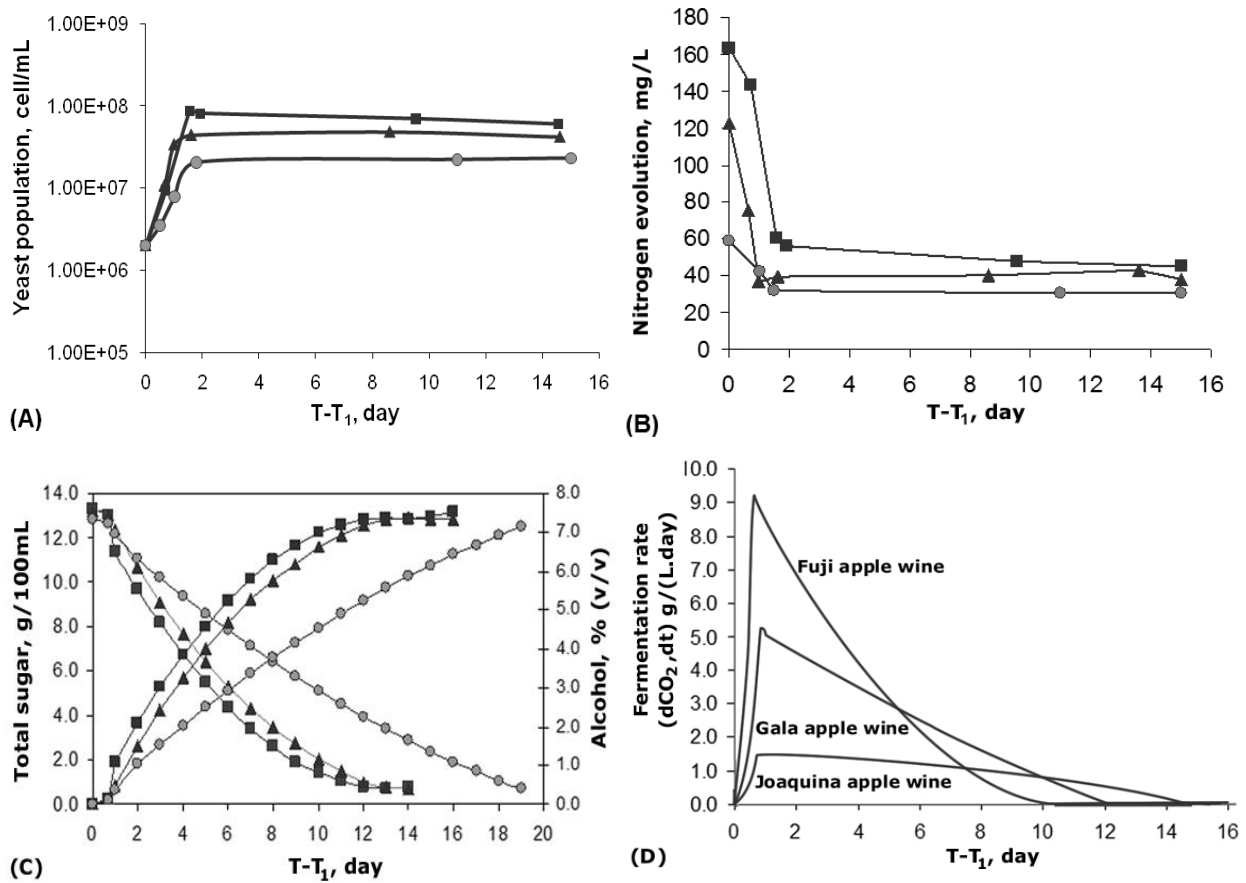


Figure 3 - Growth profile of *Saccharomyces cerevisiae* Uvaferm CK (A), nitrogen consumption (B), sugar consumption and alcohol production (C), fermentation rate (D) during cider fermentation in varietal apple must: Fuji (■); Gala (▲) and Joaquina (●).

There is a significant effect on the fermentation profile in all three varietal musts, which may be observed in Fig. 3C and 3D. Below of 2.0 g/L of sugars the fermentation speed reaches low values very near to zero. The sugar consumption and alcohol production show a straight relationship with assimilated nitrogen by yeast. The fermentation period ($T_{\max}$) determined with sugar content lower than 1.0 g/100mL was of 10.5 and 19.0 days for Fuji and Joaquina, respectively (Table 3). The nitrogen difference between these two varieties almost duplicates the fermentation time.

The fermentation rate (Fig. 3D) was calculated considering the loss of mass as measured every 2 hours. At the end of the process the results showed a theoretical tendency expressed as a 6th order polynomial equation with high correlation

coefficients: Fuji, $R^2 = 0.998$, Gala, $R^2 = 0.999$ and Joaquina, $R^2 = 0.999$. The kinetics parameters are shown in Tab. 3. Maximum fermentation rates $[(dCO_2/dt)_{\max}]$ were dependent on the initial nitrogen level, corresponding to 9.2, 5.1 and 1.4 g/(L.d), for the essays of cv. Fuji, Gala and Joaquina, respectively. The fermentation rates are coherent with the values of acceleration $[(d^2CO_2/dt^2)_{\max}]$ 7.9, 5.9 and 0.9 g/(L.d²), respectively. In Fuji cv. it was released 7.3 g/L of CO₂ during the growth phase with CO₂ /N of 0.07 g/mg and the nitrogen content was enough for biomass production and for starting the fermentation. In Joaquina cv it was released 0.8 g/L during growth phase with CO₂ /N (g/mg) of 0.03 g/mg and all the nitrogen was utilized only for biomass production and even so it was not enough for starting the fermentation.

Table 3 - Kinetic parameters of the three varietal apple juice fermentation.

Kinetic parameters	Varietal apple juice fermented		
	Fuji	Gala	Joaquina
$(dCO_2/dt)_{max}$ (g/L.day)	9.20	5.10	1.40
v_{max} (g.10 ⁻⁷ /d)	1.06	1.15	0.56
X_{max} (10 ⁶ /mL)	86.60	44.20	25.00
T_{max} (day)	10.50	12.00	19.00
$(d^2CO_2/dt^2)_{max}$ (g/L.d ²)	7.90	5.90	0.90
(g CO ₂ release / mg N) _{max} *	0.07	0.05	0.03

* end growth phase.

$(dCO_2/dt)_{max}$: maximum CO₂ production rate.

v_{max} : $(1/X.dCO_2/dt)_{max}$: maximum specific CO₂ production rate.

X_{max} : maximum cell production.

T_{max} : fermentation duration (sugar < 1.0 g/L).

$(d^2CO_2/dt^2)_{max}$: maximum acceleration.

4 CONCLUSIONS

Brazilian apple must show average nitrogen concentrations above 100 mg/L. In this concentration the alcoholic fermentation occurs without any interruption. The nitrogen contents in apple juice affects directly the yeast growth and fermentation kinetics. However, in must with low nitrogen content, the fermentation was slower but occurred until complete exhaustion of the fermentable sugars. The Brazilian apple must not need of nitrogen supplementation before alcoholic fermentation.

REFERENCES

- Baron, A.; Bohuon, G.; Drilleau, J. F. (1977). Note about formol index of apple juice concentrate. *Ann. Falsif. Expert. Chim. Tox.*, 70, 19-26.
- Beech, F. W. (1993). English Cidermaking: Technology, Microbiology and Biochemistry. In: F. W. Beech, *Progress in Industrial Microbiology* (pp. 133-213). Long Ashton: Beech.
- Beltran, G.; Rozès, N.; Mas, A.; Guillamón, J. M.; Esteve-Zarzoso, B. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agr. Food Chem.*, 53, 996-1002.
- Bely, M.; Sablayrolles, J.-M.; Barre, P. (1990). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Am. J. Enol. Viticult.*, 41, 319-324.
- Bely, M.; Salmon, J. M.; Barre, P. (1994). Assimilable nitrogen addition and hexose transport activity during enological fermentations. *J. Inst. Brew.*, 100, 279-282.
- Binnig, R.; Possmann, P. (1993). Apple Juice. In: Fruit Juice. *Processing Technology.*, ed. S. Nagy, C. S.
- Chen, P. E. Shaw. Agscience, Auburndale: pp. 271-317.
- Burroughs, L. F. (1957). The amino-acids of apple juices and ciders. *J. Sci. Food Agr.*, 8, 122-131.
- Colombié, S.; Latrille, E.; Sablayrolles, J.-M. (2007). Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. *J. Biosci. Bioeng.*, 103(3), 229-235.
- Cruz, S. H.; Cilli, E. M.; Ernandes, J. R. (2002). Structural complexity of the nitrogen source and influence on the yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.*, 108, 54-61.
- Downing, D. L. (1989). Apple cider. In: *Processed apple products*, ed. D. L. Downing, pp. 169-187.
- Drilleau, J. F. (1990). Fermentation of cider. *Rev. Pomme à cidre*, 21, 20-22.
- Drilleau, J. F. (1993). Cider processing: nitrogen and fermentation; phenol compounds and oxydation. *Rev. Pomme à cidre*, 33, 24-25.
- Drilleau, J. F. (1996). La cidrerie. In: C. M. Bourgeois, J. P. Larpent, *Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires*, pp. 138-161.
- EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (2002) *Cultura da maçã*. Florianópolis. p. 743.
- Garde-Cerdán, T.; Ancón-Azpilicueta, C. (2008). 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. *Food Sci. Technol. Int.*, 41(3), 501-510.
- Goñi, D. T.; Azpilicueta, C. A. (1999). Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. *J. Agr. Food Chem.*, 47, 4018-4024.

- IAL (2008). Métodos Físico químicos para análises de alimentos. In: IAL, *Normas Analíticas*. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.
- Ingledeu, W. M.; Kunkee, R. E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am. J. Enol. Viticult.*, 36, 65-76.
- Julien, A.; Roustan, J.-L.; Dulau, L.; Sablayrolles, J.-M. (2000). Comparison of Nitrogen and Oxygen Demands of Enological Yeasts: Technological Consequences *Am. J. Enol. Viticult.*, 51(3), 215-222.
- Julien, A.; Trioli, G.; Dulau, L. (2001). Alcoholic fermentation control: the yeast growth factors and arrest prevention. *Rev. Œnologues*, 101, 25-29.
- Laplace, J. M.; Jacquet, A.; Travers, I.; Simon, J. P.; Auffray, Y. (2001). Incidence of land and physicochemical composition of apples on the qualitative and quantitative development of microbial flora during cider fermentations. *J. Inst. Brew.*, 107(4), 227-233.
- Lea, A. G. H.; Drilleau, J. F. (2003). Cidermaking. In: *Fermented Beverage Production*, ed. A. G. H. Lea, J. R. Piggot. Blackie Academic & Professional, London. pp. 59-87
- Lee, S. S.; Robinson, F. M.; Wang, H. Y. (1981). Rapid determination of yeast viability. *Biotech. and Bioeng. Symposium*, 11, 641-649.
- Lequéré, J. M.; Drilleau, J. F. (1998). Microbiology and technology of cider. *Rev. Œnologues*, 88, 17-20.
- Manginot, C.; Roustan, J. L.; Sablayrolles, J. M. (1998). Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. *Enzyme Microb. Technol.*, 23(7-8), 511-517.
- Nelson, N. (1944). Photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 153(2), 375-380.
- Nogueira, A. (2003). Tecnologia de processamento de sidrícola: Efeito do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra. Processos Biotecnológicos. Tese. Curitiba: UFPR.
- Nogueira, A.; Mongruel, C.; Alberti, A.; Dantas, A. P.; Mongruel, C.; Wosiacki, G. (2007a). Influência da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* na cinética de fermentação do vinho de maçã. *Rev. Bras. Tecnol. Agroindustrial*, 1(1), 30-36.
- Nogueira, A.; Mongruel, C.; Simões, D. R. S.; Waszczynskyj, N.; Wosiacki, G. (2007b). Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 50(6), 1083-1092.
- Nogueira, A., Lequéré, J. M., Buldin, R. (2003) Oxygène et stabilité des cidres. *Rev. Pomme à cidre*, 5, 16 - 17.
- Nogueira, A.; Wosiacki, G. (2010) Sidra. In: W. G. Venturini Filho. *Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia*,. São Paulo: Blucher, pp. 113-139.
- Ough, C. S.; Huang, Z.; Stevens, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeast at two different temperatures of growth and fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. *Am. J. Enol. Viticult.*, 42, 26-40.
- Pérez-Zúñiga, F. J.; Abad, F. B.; Cartagena, L. G. (1997). Residual proteins and amino nitrogen in fermented wine and beer: must variety and yeast interactions. *Z Lebensm Unters Forsch*, 205, 165-169.
- Ribereau-Gayon, P. D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. (1998). *Treated of Oenology: Microbiology of wine and wine making*. Dunod.
- Roger, J.-M.; Sablayrolles, J.-M.; Steyer, J.-P.; Bellon-Maurel, V. (2002). Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, 79(7), 804-815.
- Salmon, J. M.; Barre, P. (1998). Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3831-3837.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic acid reagent. *Am. J. Enol. Viticult.*, 16, 144-158.
- Smock, R. M.; Neubert, A. M. (1950). Apples and apples products. New York: Interscience Publishers.
- Somogyi, N. (1945) A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, 160(1), 61-68.
- Tanner, H.; Brunner, H. R. (1985). *Analytics operating practice*. Wadenswill.
- Wosiacki, G.; Nogueira, A.; Silva, N.; Denardi, F.; Vieira, R. G. (2008). Quality profile of samples of 139 apples. Cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. *Acta Aliment.*, 37(1), 9-22.

CAPITULO III: Efeito do Oxigênio Dissolvido no Processamento de Mosto e Fermentado de Maçã.

EFEITO DO OXIGÊNIO DISSOLVIDO NO PROCESSAMENTO DE MOSTO E FERMENTADO DE MAÇÃ

RESUMO

O oxigênio consiste em um dos principais fatores limitantes para o crescimento da levedura *Saccharomyces*. A sua deficiência pode acarretar baixas populações de leveduras resultando em fermentações lentas. No processamento de mosto de maçã, o oxigênio dissolvido após as operações unitárias pode ser totalmente consumido na reação de escurecimento enzimático. Como prevenção, operações como a agitação do mosto, são efetuadas a fim de incorporar oxigênio dissolvido ao meio. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de operações unitárias na dissolução do oxigênio nas condições de processamento de fermentado de maçã, e seu efeito na fermentação do mosto. Foram analisadas as dissoluções de oxigênio após diferentes operações unitárias de processamento de mosto de maçã e o efeito da reação de escurecimento enzimático no consumo do oxigênio dissolvido. Experimentos de fermentação com diferentes teores iniciais de oxigênio foram avaliados na presença e ausência de maceração do triturado. Na prensagem ocorre a primeira e maior dissolução de oxigênio no mosto, em média (N=8) de $7,3 \pm 0,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$, mas, a reação de escurecimento enzimático, após 10 minutos, é responsável por um consumo de mais de 90 % deste oxigênio. Entretanto, a adição de dióxido de enxofre inibe a oxidação e consequentemente o mosto apresenta maior teor de oxigênio dissolvido no mosto de maçãs ($5,87 \pm 0,25 \text{ mgO}_2/\text{L}$). A maceração da maçã triturada resultou em uma menor redução (57 %, em média) do consumo de oxigênio dissolvido no mosto pela reação de escurecimento enzimático nos primeiros 10 minutos após a prensagem, possivelmente devido à oxidação prévia dos compostos fenólicos. Adição de oxigênio no mosto pode ser prejudicial para a atividade fermentativa das leveduras, em função de possíveis oxidações químicas de elementos nutritivos. O teor final de oxigênio resultante do processamento normal do mosto após trasfega e filtração (2,0 a 3,0 mg/L), foi suficiente para o desenvolvimento das leveduras e para uma completa fermentação dos açúcares nas condições brasileiras de processamento de fermentado de maçã.

Palavras chave: escurecimento enzimático, fermentação alcoólica, levedura, sidra.

1 INTRODUÇÃO

A sidra no Brasil é uma bebida frisanter, suave e de baixa graduação alcoólica obtida pela fermentação de mosto de maçãs provenientes do descarte comercial, que corresponde em aproximadamente 95 % das cultivares Gala (55 %) e Fuji (40 %) (ABPM, 2011; NOGUEIRA; WOSIACKI, 2010; PÉRÈS, 2009).

No processamento, as operações unitárias como prensagem, trasfegas e filtração são responsáveis pela dissolução de oxigênio no mosto (BLATEYRON et al., 1998; SALMON, 2006; VIDAL et al., 2001). Porém, assim que a fruta é triturada, o contato entre os compostos fenólicos e a enzima, polifenoloxidase (PPO), em presença de oxigênio desencadeia o processo de escurecimento enzimático (MIHALEV et al., 2004; NICOLAS et al., 1994; QUEIROZ et al., 2011). No centro ativo da enzima existem dois íons Cu^+ , cujos campos de ligação contêm dois resíduos de histidina cada um. A esses dois cobres se ligam átomos de oxigênio e em seguida o monofenol. Isto acarreta a mudança de valência dos íons cobre ($\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{++}$) provocando a formação de complexo enzima-substrato, no qual a ligação *orto* – *orto* fica tão polarizada que ocorre a hidroxilação, seguida da formação de um *o*-difeno (BELITZ; GROSCHE, 1997). A eliminação de um hidrogênio do *o*-difeno origina as quinonas (OSZMIANSKIT; LEE, 1990; WHITAKER, 1994), que são compostos altamente reativos e se polimerizam para formar compostos oxidados chamados de melanoidinas (WHITAKER, 1994). Como consequência, o mosto fica rapidamente sem oxigênio dissolvido, ou seja, em condições de anaerobiose, o que pode ser prejudicial para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (NOGUEIRA et al., 2004).

A fim de evitar fermentações lentas, em função de carências nutricionais, algumas empresas sidrícolas adicionam compostos nitrogenados e homogeneízam de tal forma a incorporar o oxigênio no mosto. Entretanto, Alberti et al. (2011) observaram que 80 % dos 51 mostos de maçãs analisados, apresentaram valores superiores a 100 mg/L de nitrogênio total, suficiente para a completa fermentação do mosto de maçãs, indicando que não há necessidade da adição este elemento.

No caso do oxigênio, a reação de escurecimento enzimático pode ser responsável pelo consumo total do oxigênio dissolvido em poucos minutos após a prensagem. A levedura *Saccharomyces* utiliza o oxigênio em várias vias metabólicas, sendo a principal delas a síntese de esteróis e ácidos graxos. Estes compostos têm papel importante na permeabilidade da célula, influenciando sua viabilidade (capacidade reprodutiva) e vitalidade (capacidade de

produzir energia) (SABLAYROLLES, 1990; SABLAYROLLES; BARRE, 1986; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998).

Trabalhos realizados em enologia e nas cervejarias demonstraram um efeito favorável de adições de oxigênio sobre as cinéticas de fermentações alcoólicas (FORNAIRON-BONNEFOND et al., 2002; LANGUET, et al., 2005; O'CONNOR-COX; LODOLO; AXCELL, 1993; SABLAYROLLES; BARRE, 1986), entretanto, o efeito destas operações no processamento da sidra, pouco foi estudado, principalmente nas condições de processamento nacionais.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do processamento no teor de oxigênio dissolvido no mosto e sua influência na fermentação alcoólica de mostos de maçã.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As amostras compreenderam lotes de cultivares de maçãs adquiridos no mercado local e fornecidas pela Agrícola Fraiburgo/SC, sendo cinco cultivares de maçãs (Eva, Fuji, Gala, Granny Smith e Red Delicious) provenientes de safras entre 2007 e 2010. A levedura utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* Fermol bouquet® (AEB group) na forma seca ativa.

2.2 Métodos

2.2.1 Efeito da absorção de oxigênio com escurecimento enzimático

Lotes de 2,5 kg dos cinco cultivares de maçãs foram utilizados. As frutas foram selecionadas, lavadas, trituradas (Multiprocessador Metvisa, faca nº 4) e prensadas durante 5 minutos a 3,0 kgf/cm² (Prensa hidráulica, Potente Brasil). O triturado foi submetido a tempos de maceração de 0 (sem maceração), 5, 10, 20 e 30 minutos em formas de polipropileno de 45x35x4,5cm, sendo posteriormente prensados e determinado o teor de oxigênio (Oxímetro DIGIMED - DM-4, Brasil; equipado com eletrodo composto por um ânodo de prata (Ag) e cátodo de platina (Pt) e membrana de politetrafluoretileno (PTFE)) durante 10 minutos. O mosto foi despectinizado com pectinase (Pectinex, Novozymes do Brasil), e após duas horas em temperatura ambiente (20-25°C), o sobrenadante foi trasfegado e filtrado (filtro de papel qualitativo, Qualy) (Figura 1). Em todas as etapas de clarificação o teor de oxigênio e a temperatura do mosto foram analisados.

Todos os ensaios foram realizados a 975 metros acima do nível do mar e com temperaturas entre 20 a 26°C.

2.2.2 Quantificação do oxigênio dissolvido nas operações unitárias do processamento

Lotes de 3 kg de maçãs de cada cultivar foram selecionadas, lavadas, trituradas (Multiprocessador Metvisa, faca nº 4) e prensadas (Prensa hidráulica, Potente Brasil) durante 5 minutos a 3,0 kgf/cm² (Figura 1). O teor oxigênio dissolvido (Oxímetro DIGIMED - DM-4, Brasil) e a temperatura foram medidos no mosto bruto no momento da prensagem (tempo zero, escorrendo da prensa e caindo 40 cm até o béquer, Figura1), no mosto prensado (em repouso de 1 a 10 minutos), e nas etapas seguintes da clarificação. Ao mosto foram adicionados 3,0 mL/hL de pectinase (Pectinex, Novozymes do Brasil), e após duas horas a temperatura ambiente (20-25°C), o sobrenadante foi trasfegado e determinado o teor de oxigênio e a temperatura.

Para avaliar o efeito do dióxido de enxofre, no teor de oxigênio dissolvido durante as operações unitárias, foi utilizado metabissulfito de potássio nas concentrações de 50, 100 e 150 mg/Kg de maçã, adicionados a fruta triturada. Nesta etapa foram utilizadas as cultivares Gala e Fuji.

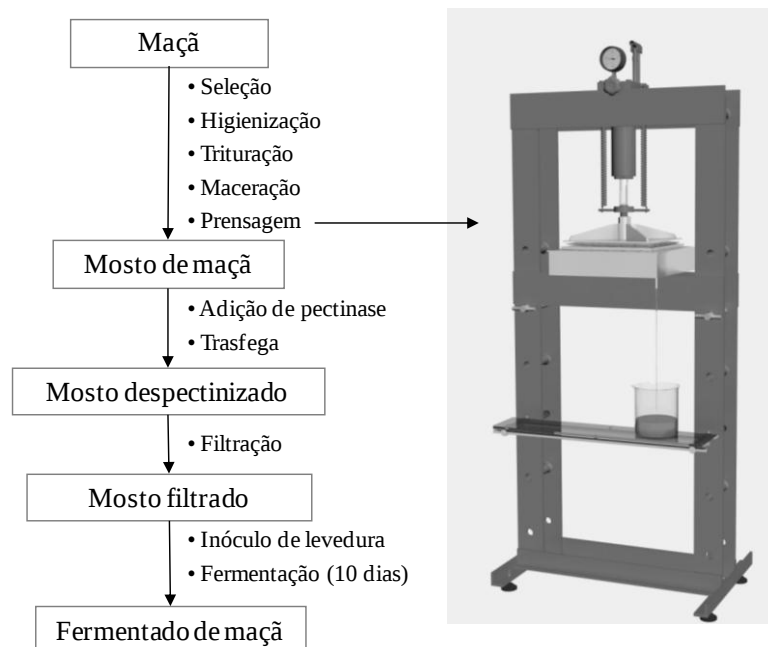


Figura 1. Fluxograma de processamento de fermentado de maçã e esquema do processo de prensagem do triturado de maçã.

2.2.3 Efeito do teor inicial de oxigênio na cinética de fermentação

Foram utilizados 8,0 kg de maçã da cultivar Gala para avaliar o efeito do teor de oxigênio no mosto (Figura 1) nos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica. Três mostos foram utilizados: [1] desoxigenado, [2] oxigenado e [3] controle onde não houve adição ou remoção de oxigênio. A desoxigenação foi efetuada pela injeção de CO₂ gasoso diretamente nos fermentadores por 10 minutos a baixa temperatura (0 °C). A oxigenação foi feita à baixa temperatura (0°C) com injeção de oxigênio (pureza de 99,9 %), utilizando difusor de porcelana, durante 12 horas. Após a obtenção do mosto filtrado, este foi acondicionado em erlenmeyers (500 mL) esterilizados munidos de batoque. Em seguida, foram inoculadas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Fermol bouquet® (20 g/hL), verificado o teor de oxigênio nos mostos e imediatamente tampados para início da fermentação. A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa dos fermentadores por liberação de gás carbônico (mosto oxigenado, desoxigenado com CO_{2(g)} e mosto controle) durante aproximadamente 15 dias (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990; ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; MALHERBE et al., 2004). Um fermentador foi equipado com um termômetro para monitoramento da temperatura.

2.2.4 Efeito da maceração na cinética de fermentação

Neste experimento foram utilizados 4 kg de maçã das cultivares Gala e Fuji. As frutas após serem trituradas, foram maceradas durante 20 minutos e prensadas. O mosto foi despectinizado e filtrado (Figura 1). Um ensaio sem maceração foi feito para cada cultivar. A cinética de fermentação foi calculada através da perda de massa dos fermentadores (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990; ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; MALHERBE et al., 2004). Todos os ensaios de fermentação foram realizados em triplicata.

2.2.5 Análises físico-químicas

Os teores de açúcares redutores totais foram determinados pela técnica clássica de Somogyi e Nelson (TANNER; BRUNNER, 1985), após hidrólise com HCl 1N a 65°C/5 min. A acidez foi determinada por titulação ao ponto final e expressa como ácido málico em g/100 mL. O teor alcoólico foi determinado por ebulliometria em % (v/v). O nitrogênio foi analisado por destilação por arraste após digestão total (Kjeldahl) (IAL, 2008).

2.2.6 Análise estatística dos dados

Os resultados foram analisados quanto à variância (ANOVA) e teste de diferenciação de médias (TUKEY) ao nível de significância de 5 % ($p \leq 0,05$) com uso do *software* Microsoft Office Excel 2010®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do escurecimento enzimático no teor de oxigênio dissolvido

O teor médio de oxigênio dissolvido no mosto bruto, no momento da prensagem, nas cinco cultivares de maçã utilizadas foi de $7,3 \pm 0,5$ mgO₂/L (Figura 2). Porém, com a reação de escurecimento enzimático, a enzima polifenoloxidase (PPO) utiliza o oxigênio do meio, para se ligar ao fenol, e a mudança de valência dos íons cobre no sítio ativo, desencadeia a oxidação dos compostos fenólicos do mosto originando as quinonas (BELITZ; GROSCH, 1997; WHITAKER, 1994). Os mostos das cultivares Fuji, Gala e Red Delicious apresentaram maior consumo bioquímico de oxigênio dissolvido, sendo que em 3 minutos a diminuição foi de 97,8; 96,9 e 93,1 % respectivamente, e manteve-se constante até 10 minutos de análise. Nos mostos com menor utilização bioquímica de oxigênio, Eva (82,8 %) e Granny Smith (86,1 %), a velocidade de consumo pela reação de escurecimento enzimático foi menor (Figura 2).

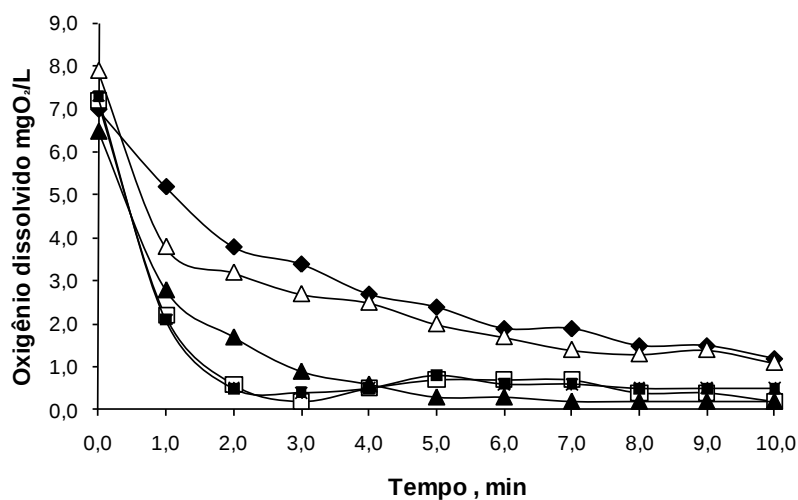


Figura 2. Consumo do oxigênio (mg/L) pela reação de escurecimento enzimático em mostos de maçã Eva (◆), Fuji (□), Gala (▲), Granny Smith (Δ) e Red Delicious (■), nos primeiros 10 minutos após a operação de prensagem.

Na Figura 3 pode ser observado que o oxigênio incorporado na prensagem é rapidamente consumido pela PPO. A quantidade de oxigênio consumido na reação de

escurecimento enzimático está relacionada à composição do mosto (LAURITA et al., 1998), principalmente ao perfil fenólico da cultivar (NOGUEIRA et al., 2004), uma vez que a polifenoloxidase oxida preferencialmente ácido clorogênico e catequina (AWAD et al., 2001; MURATA et al., 1992; PODSGDEK et al., 2002) e o ácido *p*-cumárico, outro composto fenólico, é um inibidor não-competitivo da polifenoloxidase de maçã (ALONSO-SALCES et al., 2004).

As etapas de homogeneização, após a adição de pectinase, trasfega e filtração foram responsáveis por aumentar o teor de oxigênio no mosto, que no final do processo ficou em média de $3,0 \pm 0,8$ mgO₂/L. Este perfil (Figura 3) é observado nas cultivares analisadas, com pequenas diferenças devido a composição de cada uma.

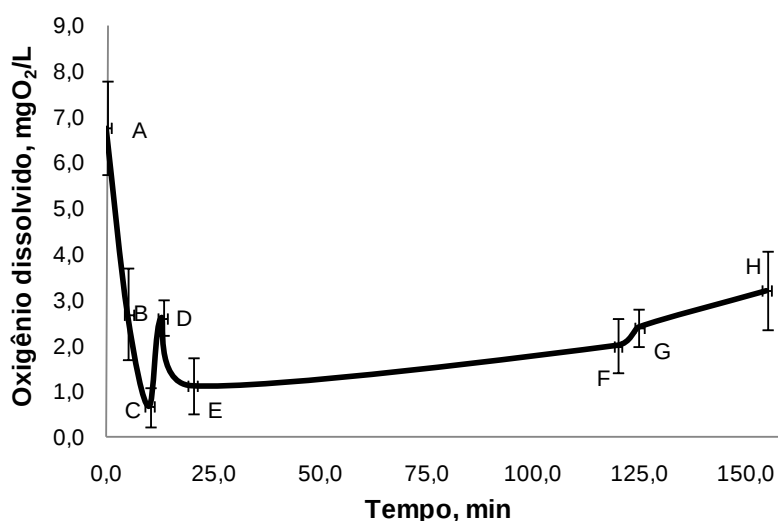


Figura 3. Evolução do oxigênio dissolvido durante o processamento do mosto de maçã sem maceração (N=8). Prensagem (A); 5 minutos após prensagem (B); 10 minutos após a prensagem (C); Adição de pectinase e homogeneização (D); aquecimento a 40°C para ação da enzima (E); Final do processo de despectinização (F); Trasfega (G); Filtração (H).

3.2 Efeito da maceração no teor de oxigênio dissolvido durante as operações unitárias

A maceração da maçã triturada resultou em uma menor redução do consumo de oxigênio dissolvido no mosto pelas reações de escurecimento enzimático. O teor médio de oxigênio logo após a prensagem ($7,4 \pm 0,45$ mgO₂/L) foi semelhante ao mosto sem o tratamento de maceração ($7,3 \pm 0,5$ mgO₂/L). Entretanto, após 10 minutos de repouso os teores foram superiores ao tratamento sem maceração (Figura 4), chegando a ser 18,5 vezes maior nos tratamentos de 5 e 20 minutos (Tabela 1). A operação de maceração causou a oxidação dos fenóis antes da prensagem. Isto fez com que menos oxigênio, incorporado na prensagem, fosse utilizado pela enzima para a reação de oxidação, uma vez que o teor de compostos fenólicos (substratos) passíveis de serem oxidados pela enzima era menor.

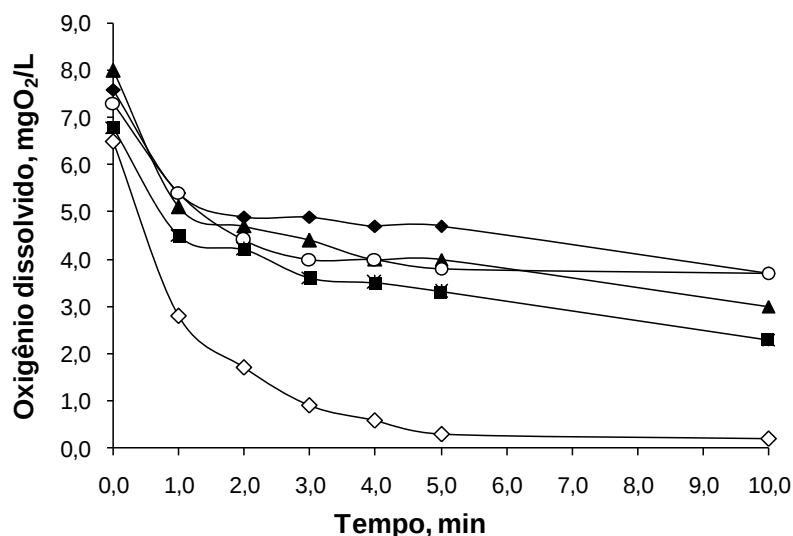


Figura 4. Consumo do oxigênio (mg/L) pela reação de escurecimento enzimático em mosto de maçã, nos primeiros 10 minutos após a operação de prensagem com diferentes tempos de maceração: sem maceração (◇); 5 minutos (◆); 10 minutos (▲); 20 minutos (○) e 30 minutos (■).

Na Tabela 1, pode ser observado o efeito de diferentes tempos de maceração e a dissolução de oxigênio nas operações unitárias pré-fermentação. Após a prensagem o teor de oxigênio no mosto nos diferentes tempos de maceração foi semelhante. Com 10 minutos de repouso a redução de oxigênio foi maior no tratamento sem maceração (96,9 %). Nos tempos de maceração 5, 10, 20 e 30 minutos as reduções variaram entre 49,3 a 66,2 % após os 10 minutos da prensagem. A maior redução, que corresponde ao mosto macerado durante 30 minutos, pode ter ocorrido devido à ação de enzimas endógenas da fruta que causam a liberação de fenóis, que no processamento normal (sem maceração) ficariam retidos no bagaço (MIHALEV et al., 2004; WILL et al., 2002). Com maior teor de fenóis a enzima tem mais substrato para a reação de oxidação e consequentemente mais oxigênio é utilizado na reação.

Com a transferência do mosto de um recipiente para outro (trasfega) ocorreu uma leve diminuição do teor de oxigênio dissolvido em alguns tempos e em outros se manteve (Tabela 1) possivelmente devido a uma atividade enzimática residual. Entretanto, com a filtração em papel filtro ocorreu uma maior dissolução de oxigênio em todos os tratamentos.

Tabela 1. Efeito de diferentes tempos de maceração (0, 10, 20 e 30 minutos), antes da prensagem, no teor de oxigênio dissolvido (mg/L) durante o processamento do mosto de maçã Gala.

Tempo de maceração (minutos)	Prensagem		10 minutos após prensagem		Mosto trasfegado ¹		Mosto filtrado ²	
	O ₂	T °C	O ₂	T °C	O ₂	T °C	O ₂	T °C
0	6,5 ^{CDa}	24,4	0,2 ^{Dc}	25,5	1,8 ^{Cb}	28,3	2,4 ^{Cb}	28,1
5	7,6 ^{Aa}	25,0	3,7 ^{Ab}	26,0	3,7 ^{Ab}	29,0	3,9 ^{Ab}	28,8
10	8,0 ^{Aa}	25,1	3,0 ^{Bb}	25,8	2,4 ^{Bbc}	28,5	3,4 ^{ABb}	28,0
20	7,3 ^{ABa}	24,8	3,7 ^{Ab}	25,5	2,5 ^{Bc}	28,8	3,5 ^{Ab}	28,4
30	6,8 ^{BCa}	25,3	2,3 ^{Cb}	26,4	2,6 ^{Bb}	29,0	2,8 ^{Cb}	28,7

Nota: (1) 130 minutos após prensagem; (2) 150 minutos após prensagem. ^{a, b, c, d} : letras diferentes, em linhas e colunas, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) no teor de oxigênio dissolvido. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre colunas; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre linhas.

Na Figura 5, pode ser observada a evolução do oxigênio no mosto de maçã com maceração, durante as operações unitárias do processamento do mosto. Os mostos na ausência e presença de maceração após a filtração ficaram com 3,0 mgO₂/L (Figura 3) e 3,5 mgO₂/L (Figura 5). Segundo, Nogueira (2003) o teor necessário para uma completa fermentação alcoólica em mostos de maçãs francesas é de 2,5 mgO₂/L. Desta forma, a fermentação do mostos de maçãs com e sem a operação de maceração apresentam oxigênio suficientes para uma completa fermentação alcoólica.

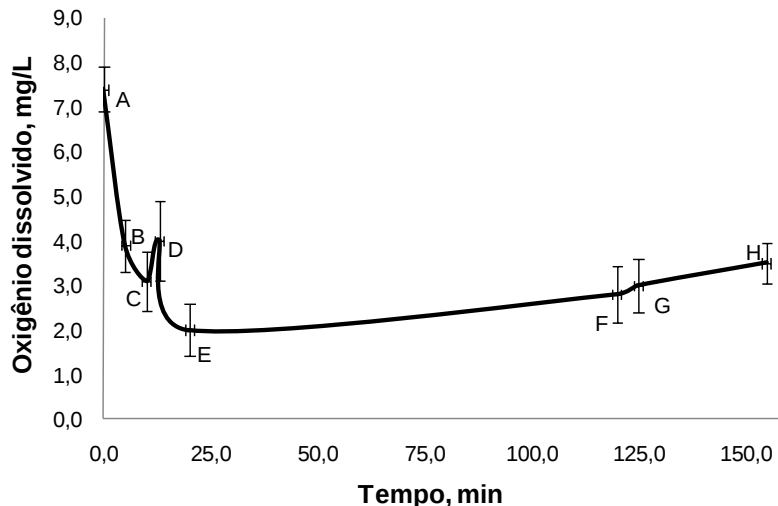


Figura 5. Evolução do oxigênio dissolvido durante o processamento do mosto de maçã com maceração (N= 6). Prensagem (A); 5 minutos após prensagem (B); 10 minutos após a prensagem (C); Adição de pectinase e homogeneização (D); aquecimento a 40°C para ação da enzima (E); Final do processo de despectinização (F); Trásfega (G); Filtração (H).

3.3 Efeito do dióxido de enxofre no teor de oxigênio dissolvido no processamento do mosto

Nos mostos onde ocorreu adição de dióxido de enxofre na maçã triturada (prática comum no Brasil) o teor de oxigênio dissolvido não apresentou redução devido à reação de

escurecimento enzimático (Tabela 2). E devido às operações unitárias seguintes, o teor de oxigênio aumentou nas três concentrações de metabissulfito (50, 100 e 150 mg/kg) utilizadas, sendo que após a filtração o teor variou de 6,05 a 6,15 mgO₂/L no mosto da cultivar Gala e de 5,55 a 5,80 mgO₂/L no mosto da cultivar Fuji.

O dióxido de enxofre, amplamente utilizado em enologia e sidrologia, como uma forma de controlar o crescimento de microrganismos indesejáveis. Além disso, possui atividade antioxidante, inibindo a ação da polifenoloxidase (BEECH, 1993), entretanto, seu mecanismo de inibição do escurecimento enzimático não é completamente elucidado. Alguns autores sugerem que ocorre inibição competitiva, por se ligar a um grupo sulfidril no sítio ativo da enzima (BILLAUD et al., 2003; SAYAVEDRA-SOTO; MONTGOMERY, 1986), o que pode explicar o perfil encontrado.

Tabela 2. Efeito da adição de dióxido de enxofre no teor de oxigênio dissolvido (mg/L) durante o processamento de mosto de maçã.

Cv.	Operação Unitária	Concentração de metabissulfito de potássio (mg/kg)							
		0		50		100		150	
		O ₂	T°C	O ₂	T°C	O ₂	T°C	O ₂	T°C
Gala	Prensagem	5,20 ^{Aa}	20,8	5,65 ^{Aa}	20,9	5,45 ^{Aa}	19,8	5,75 ^{Aa}	21,7
	10 minutos após prensagem	0,45 ^{BCb}	19,7	5,50 ^{Aa}	19,9	4,95 ^{Aa}	19,4	5,80 ^{Aa}	19,3
	Mosto despectinizado ¹	1,70 ^{BCb}	22,5	5,05 ^{Aa}	22,3	5,25 ^{Aa}	23,5	5,30 ^{Aa}	22,8
	Mosto trasfegado ²	2,10 ^{ABb}	22,0	5,35 ^{Aa}	24,1	5,75 ^{Aa}	23,5	5,65 ^{Aa}	23,1
	Mosto filtrado ³	3,90 ^{Ab}	22,6	6,10 ^{Aa}	21,8	6,05 ^{Aa}	22,5	6,15 ^{Aa}	20,6
Fuji		0		50		100		150	
		O ₂	T°C	O ₂	T°C	O ₂	T°C	O ₂	T°C
	Prensagem	5,30 ^{Aa}	22,2	5,45 ^{Aa}	21,7	5,40 ^{Aa}	20,3	5,20 ^{ABa}	20,5
	10 minutos após prensagem	0,00 ^{Eb}	19,9	5,20 ^{Aa}	20,7	4,35 ^{Aa}	19,2	5,35 ^{Aa}	19,6
	Mosto despectinizado ¹	1,70 ^{CDb}	22,6	4,85 ^{Aa}	23,6	4,45 ^{Aa}	22,8	4,60 ^{BCa}	22,9
	Mosto trasfegado ²	2,20 ^{C b}	22,8	4,85 ^{Aa}	23,6	5,10 ^{Aa}	22,9	5,00 ^{Ab a}	23,0
	Mosto filtrado ³	3,20 ^{Bb}	22,5	5,55 ^{Aa}	22,3	5,55 ^{Aa}	21,6	5,80 ^{Aa}	21,9

Nota: Cv.: cultivar de maçã; (1) 120 minutos após prensagem; (2) 130 minutos após prensagem; (3) 150 minutos após prensagem. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre colunas; letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre linhas.

3.4 Efeito do teor de oxigênio inicial na cinética de fermentação

No primeiro experimento de fermentação foram utilizados o mosto desoxigenado, 1,1 mgO₂/L, e o mosto com teor de oxigênio resultante do processamento padrão, 3,3 mgO₂/L. As velocidades máximas de fermentação (Tabela 3) foram semelhantes, 16,3 e 15,5 gCO₂/(L.d) para os teores de oxigênio de 3,3 e 1,1 mgO₂/L, respectivamente. Entretanto, após atingir a velocidade máxima, o tempo de fermentação foi maior no mosto com maior teor de oxigênio dissolvido, devido a uma maior liberação de gás carbônico, 62,6 contra 49,5 g/L, ou seja, a levedura apresentou uma vitalidade superior, uma vez que foi utilizado o mesmo mosto e as condições de fermentação foram padronizadas. Este resultado está de acordo com outros

trabalhos realizados em enologia que demonstram que, para desenvolver e conservar uma boa viabilidade (capacidade reprodutiva) e uma boa vitalidade (capacidade de produzir energia) as leveduras necessitam de baixas concentrações de oxigênio (SABLAYROLLES, 1990; SALMON; FORNAIRON; BARRE, 1998).

No segundo experimento, a fermentação do mosto controle (sem adição ou remoção do oxigênio), 2,2 mgO₂/L foi comparada a realizada no mosto onde foi adicionado oxigênio gasoso durante 12 horas, com um teor final de 7,6 mgO₂/L (Tabela 3). A velocidade de fermentação do mosto com 2,2 mgO₂/L de oxigênio dissolvido foi 32 % mais rápida (12,75 g/(L.d)) que no mosto mais oxigenado. Isto indica que este teor (2,2 mg/L) de oxigênio dissolvido, resultado do processamento normal do mosto é suficiente para o desenvolvimento da levedura. O microrganismo, no mosto onde houve adição de oxigênio, não apresentou a mesma vitalidade indicando alguma carência nutricional. Como as condições das duas fermentações foram semelhantes, o oxigênio adicionado ao mosto, além da oxidação de compostos fenólicos, pode ter sido responsável por reações de oxidação de elementos essenciais para o crescimento das leveduras, como por exemplo as vitaminas. Tiamina, biotina e ácido pantotênico são vitaminas essenciais para o crescimento das leveduras (WALKER, 1998), entretanto são instáveis a presença de oxigênio (CORREIA; FARAONI; PINHEIRO-SANT'ANA, 2008; DeMAN, 1999) e por isso, podem ter sido oxidadas durante a oxigenação do mosto, afetando o processo fermentativo.

Tabela 3. Parâmetros cinéticos de fermentados de mostos de maçã da cultivar Gala, provenientes de dois lotes, (experimento 1 e 2) com diferentes teores de oxigênio dissolvido no início da fermentação (momento do inóculo da levedura).

Parâmetros analíticos	Mosto			
	Gala (experimento 1)		Gala (experimento 2)	
Oxigênio dissolvido (mg/L)*	1,10**	3,30	2,20	7,60***
T _{max} (dias)	7,50	9,50	10,00	11,00
(dCO ₂ /dt) _{max} (g/L.dia)	15,56	16,34	12,75	9,66
Liberção de CO ₂ (g/L)	62,63	49,47	59,43	54,21

Nota: (*) oxigênio dissolvido (mg/L) no momento do inóculo; T_{max} (dias): tempo de fermentação; (dCO₂/dt)_{max}: velocidade máxima de fermentação; (**) mosto desoxigenado com injeção de CO_{2(g)}; (***) mosto oxigenado com injeção de oxigênio puro.

3.5 Efeito da maceração na cinética de fermentação

Maçãs das cultivares Gala e Fuji foram utilizadas para avaliar o efeito da maceração na cinética de fermentação. A variação nas velocidades de fermentação entre as cultivares está relacionado a composição dos mostos, principalmente, quanto ao teor de nitrogênio total (Tabelas 4 e 5), uma vez que a acidez e o teor de açúcar não apresentaram diferença

significativa ao nível de 5% de significancia ($p \leq 0,05$). Esses teores, estão dentro da média quando comparados aos teores encontrados por Wosiacki et al. (2008) analisando 139 amostras de suco de maçã.

O nitrogênio, é utilizado para a síntese de proteínas que serão consumidas pelas leveduras durante seu crescimento (PRETORIUS, 2000; RIBÉREAU-GAYON et al., 1998; WALKER, 1998). Enquanto a maçã Gala com teor considerado elevado de nitrogênio (>150 mg/L), teve velocidade máxima de 12,68 g/(L.d), a Fuji com teor normal (75 a 150 mg/L), apresentou velocidade máxima menor, 9,89 g/(L.d) (DRILLEAU, 1993), o que era esperado uma vez que sabe-se que o teor de nitrogênio afeta a velocidade da fermentação (ALBERTI et al., 2011; HENSCHKE; JIRANEK, 1992)

Tabela 4. Análises físico-químicas dos mostos de Gala e Fuji com e sem maceração.

Parâmetros Físico-químicos	Cultivar Gala		Cultivar Fuji	
	Com maceração	Sem maceração	Com maceração	Sem maceração
Acidez (g/100mL)	0,31 $\pm$ 0,01 ^a	0,30 $\pm$ 0,01 ^a	0,31 $\pm$ 0,01 ^a	0,29 $\pm$ 0,01 ^a
Açúcares (g/L)	141,53 $\pm$ 2,71 ^a	137,78 $\pm$ 2,84 ^a	155,42 $\pm$ 3,15 ^a	148,19 $\pm$ 3,13 ^a
Nitrogênio (mg/L)	161,55 $\pm$ 1,77 ^a	166,67 $\pm$ 1,77 ^a	128,83 $\pm$ 3,07 ^b	124,74 $\pm$ 1,77 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre linhas.

Os experimentos na presença e ausência de maceração apresentaram variação do teor de oxigênio dissolvido. Nos tratamentos com oxigenação, os mostos foram agitados, método utilizado pela indústria para dissolver nutrientes e incorporar oxigênio. Na cultivar Gala os mostos oxigenados tinham 7,7 e 7,9 mgO₂/L e na Fuji 5,7 e 6,0 mgO₂/L para os tratamentos na presença e ausência de maceração, respectivamente. Não foi observada diferença significativa nos parâmetros cinéticos entre as fermentações com e sem oxigenação (Tabela 5), confirmando que o teor de oxigênio resultante do processamento na ausência da maceração é suficiente para que a fermentação transcorra sem interrupções.

No mosto da cultivar Gala, o teor de oxigênio dissolvido foi de 4,7 e 4,8 mg/L para os tratamentos com e sem maceração, respectivamente, no momento do inóculo. O mosto sem maceração apresentou velocidade de fermentação maior, com diferença significativa ($p \leq 0,05$), em relação ao mosto com maceração. Entretanto, a liberação de CO₂ no mosto com maceração foi 10 % maior, sendo 59,0 g/L para o mosto com maceração e 53,6 g/L para o sem maceração, o que evidencia uma maior capacidade fermentativa da levedura neste mosto.

Na cultivar Fuji, a velocidade de fermentação, nos mostos com o tratamento de maceração e sem, foi semelhante, assim como o tempo de fermentação. Isto ocorreu

provavelmente porque a etapa de maceração não teve o mesmo efeito, devido a menor atividade enzimática da fruta ou perfil fenólico.

Tabela 5. Parâmetros analíticos fermentados de Gala e Fuji, com e sem maceração, com diferentes teores de oxigênio dissolvido no início da fermentação (momento do inóculo da levedura).

Parâmetros analíticos	Fermentado de maçã Gala			
	Sem maceração		Com maceração	
Oxigênio dissolvido (mg/L)*	4,80 ^b	7,90 ^a	4,70 ^b	7,70 ^a
T _{max} (dias)	8,80 ^b	8,80 ^b	10,40 ^a	10,50 ^a
(dCO ₂ /dt) _{max} (g/L.dia)	12,65 ^a	12,68 ^a	11,76 ^b	11,46 ^b
Liberação de CO ₂ (g/L)	53,60 ^b	53,70 ^b	59,00 ^a	58,30 ^a
Etanol (°GL)	6,75 ^b	6,90 ^b	7,10 ^a	7,20 ^a
	Fermentado de maçã Fuji			
	Sem maceração		Com maceração	
Oxigênio dissolvido (mg/L)*	3,80 ^b	6,00 ^a	4,40 ^b	5,70 ^a
T _{max} (dias)	12,70 ^a	12,60 ^a	11,80 ^b	11,90 ^b
(dCO ₂ /dt) _{max} (g/L.dia)	8,92 ^b	8,94 ^b	9,89 ^a	9,83 ^a
Liberação de CO ₂ (g/L)	55,15 ^b	54,90 ^b	57,45 ^a	57,00 ^a
Etanol (°GL)	7,20 ^b	7,10 ^b	7,45 ^a	7,30 ^a

Nota: (*) oxigênio dissolvido (mg/L) no momento do inóculo; T_{max} (dias): tempo de fermentação; (dCO₂/dt)_{max}: velocidade máxima de fermentação. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p ≤ 0,05) entre linhas.

4 CONCLUSÃO

A operação de prensagem possibilita a primeira e maior dissolução de oxigênio no mosto, porém a reação de escurecimento enzimático é responsável pelo consumo de mais de 90 % deste, e esta redução está relacionada ao perfil fenólico do mosto. A inibição desta oxidação, pela adição de dióxido de enxofre, deixa o mosto de maçã maior teor de oxigênio, ou seja, 60 % mais. A maceração do triturado foi responsável por um aumento no teor de oxigênio dissolvido devido à oxidação dos compostos fenólicos antes da prensagem, onde ocorre a maior incorporação.

A concentração de oxigênio nos mostos elaborados pelo processamento comum, sem adição ou remoção de oxigênio é suficiente para que a fermentação transcorra sem nenhuma interrupção.

REFERÊNCIAS

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**. 2011 (*in press*).

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BEATRIZ, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, B. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2938-2952. 2004.

ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J.-M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.23, n.9, p.677-681, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM.). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em : <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em 08 de fevereiro de 2009.

AWAD, M. A.; DE JAGER, A.; VANDERPLAS, L. H. W.; VANDERKROL, A. R. Flavonoid and chlorogenic acid changes in skin of "Elstar" and "Jonagold" apples during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, v.90, p.69-83, 2001.

BEECH, F. W. Yeasts in cider-making. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.) **The Yeasts, Yeast Technology (second edition)**: Academic Press Limited, v. 5, 1993. p. 169-213.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acríbia, 1997. p. 119-120.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, n. 4, p. 319-324, 1990.

BILLAUD, C.; ROUX, E.; BRUN-MÉRIMÉE, S.; MARASCHIN, C.; NICOLAS, J. Inhibitory effect of unheated and heated D-glucose, D-fructose and L-cysteine solutions and Maillard reaction product model systems on polyphenoloxidase from apple. I. Enzymatic browning and enzyme activity inhibition using spectrophotometric and polarographic methods. **Food Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 35-50, 2003.

BLATEYRON, L. AGUERA, E.; DUBOIS, C.; GERLAND, C.; SABLAYROLLES, J. M. Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. **Viticultural and Enological Sciences**, v. 53, p. 131-135, 1998.

DRILLEAU, J. F. Réunion annuelle Certec : azote et fermentation ; composés phénoliques et oxydation. **Pomme**, n.33, p.24-25. 1993.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, 2008.

DeMAN, J. M. **Principles of Food Chemistry**. Maryland, USA: Aspen Publishers, 1999.

FORNAIRON-BONNEFOND, C.; DEMARETZ, V.; ROSENFELD, E.; SALMON, J. M. Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 176-182, 2002.

HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V.. Yeasts - metabolism of nitrogen compounds. In: FLEET, G. H. (Ed.). **Wine microbiology and biotechnology**, 1992. p. 77-164

IAL. Métodos Físico químicos para análises de alimentos. In: IAL, **Normas Analíticas**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

LANGUET, P.; AGUERA, E.; SAMSON, A.; ORTIZ-JULIEN, A.; SALMON, J. M. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. **Revue des Oenologues**, v. 117, p. 31-33. 2005.

LAURITA, E.; KERVINEN, R.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, v. 4, p. 53-65, 1998.

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

MALHERBE, S.; FROMION, V.; HILGERT, N.; SABLAYROLLES, J. M. Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 261-272, 2004.

MIHALEV, K SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p.7306-7310, 2004.

MURATA, M.; KUROKAMI, C.; HOMMA, S. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 11, p.1705-1710, 1992.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109- 157, 1994.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidricola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 2003. Tese (Doutorado em Bioprocessos Tecnológicos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

NOGUEIRA, A.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; SALMON, J. M. Competition entre microorganismes et PPO/polyphenols vis a vis de l'oxygène. In J. F. DRILLEAU (Ed.), **Cidre et polyphenols: les polyphenols natifs des pommes a cidre. Presence, devenir et rôle**. Rapport final Du Programme Interregional de Recherche Bretagne & Pays de la Loire (2001–2003) no. 691, operation no. AOCAZ3 (pp. 1–16). Le Rheu: INRA, 2004.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 113-139.

O'CONNOR-COX, E. S. C.; LODOLO, E. J.; AXCELL, B. C. Role of oxygen in high-gravity fermentations in the absence of unsaturated lipid biosynthesis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, p. 97-107, 1993.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 5, p.1202–1204, 1990.

PÉRÈS, P. N. O mercado da maçã no Brasil e no mundo. **I Frutivar**, 2009. Disponível em <www.abpm.org.br>. Acesso em 02/12/2010.

PODSĘDEK, A.; WILSKA-JESZKA, J.; ANDERS, B.; MARKOWSKI, J. Compositional characterisation of some apple varieties. **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 4, p. 268-272, 2000.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEIROZ, C. DA SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

RIBÉREAU-GAYON, P. ; DUBOUDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d'oenologie. 1-Microbiologie du vin et vinifications**. Paris: La Vigne, v. 1. 1998. 617 p.

SABLAYROLLES, J. M. Besoins en oxygène lors des fermentations oenologiques. **R. Française d'oenologie**, França, v. 124, p. 77-79, 1990.

SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Evolution de la solubilité de l'oxygène au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. **Sciences des Aliments**, n. 6, p. 177-184, 1986.

SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 2, p. 154-163, 1998.

SALMON, J. M. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 959-965, 2006.

SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; MONTGOMERY, M. W. Inhibition of Polyphenoloxidase by Sulfite. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1531-1536, 1986.

TANNER, H., BRUNNER, H. R. **Getränke Analytik - Untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis**. Wädenswill: Verlag Helles, 1985.

VIDAL, J. C. ; DUFOURCQ, T.; BOULET, J. C.; MOUTOUNET, M. Les apports d'oxygène au cours des traitements des vins. Bilan des observations sur site, I^{ère} partie. **Revue Française d'Oenologie**, v. 190, p. 24-31, 2001.

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

WHITAKER, J. R. Polyphenol Oxidase.. In: WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2 ed. New York: Marcel Oesker, 1994.

WILL, F.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H.; SCHULZ, K.; OTTO, K. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apples cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 1, p. 9-22, 2008.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração de nitrogênio do mosto de maçãs brasileiras apresenta concentrações acima de 100 mg/L de nitrogênio total, que é suficiente para que a fermentação alcoólica transcorra sem interrupções.

O nitrogênio presente no mosto de maçã afeta diretamente o crescimento da levedura e a cinética de fermentação. A população máxima e velocidade de fermentação estão diretamente relacionadas à concentração de nitrogênio do mosto. Em baixas concentrações, a fermentação é mais lenta, mas ocorre até a exaustão dos açúcares fermentescíveis, com isso, não há necessidade de suplementação nitrogenada antes da fermentação.

O oxigênio dissolvido no mosto na prensagem, etapa onde ocorre maior incorporação, é quase totalmente consumido em alguns minutos na oxidação enzimática. Esta redução está relacionada à composição dos cultivares. Com a adição de inibidor enzimático (dióxido de enxofre), a reação não ocorre e consequentemente o oxigênio permanece no mosto, resultando em um teor 60 % superior. A maceração da maçã triturada constitui outro procedimento que reduz o consumo de oxigênio no escurecimento enzimático devido à oxidação prévia dos fenóis da maçã. O processamento do mosto sem inibidor e sem maceração resulta em mostos com teor de oxigênio suficientes para que a fermentação transcorra sem interrupções.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho em escala piloto, sugerem que a operação de adição de compostos nitrogenados e oxigenação para evitar fermentações lentas ou paradas do processo não são necessárias.

REFERÊNCIAS

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**, 2011 (*in press*).

ALONSO-SALCES, R. M.; BARRANCO, A.; BEATRIZ, A.; BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, B. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 2938-2952, 2004.

ALEXANDRE, H.; NGUYEN VAN LONG, T.; FEUILLAT, M.; CHARPENTIER, C. Contribution à l'étude des bourbes: influence sur la fermentescibilité des mouts. **Revue Française d'Œnologie**, v. 146, p. 11-19, 1994.

ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J. M. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.23, n. 9, p. 677-681, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ (ABPM.). **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em : <<http://www.abpm.org.br>>. Acesso em 08 de fevereiro de 2009.

AWAD, M. A., DE JAGER, A.; VAN WESTING, L. M. Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. **Scientia Horticulturae**, v. 83, n. 3, p. 249-263, 2000.

BARON, A.; BOHUON, DRILLEAU, J. F. Remarques sur l'indice formol des concentrés de jus de pomme. **Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique**, v. 70, n. 749, p. 19-26, 1977.

BARON, A.; GOAS, M.; DRILLEAU, J. F.. Évolution au cours de la maturation, des fractions azotées et des acides aminés dans la pomme et dans le moût correspondant. **Sciences des Aliments**, v. 2, n. 1, p. 15-23, 1982.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J. M.; SALMON, J. M. La levadura de fermentación alcohólica. In: FLANZY, C. **Enología: fundamentos científicos e tecnológicos**. Madrid: Mundi-Prensa e AMV, 2000. p. 274-315.

BATAILLON, M.; RICO, A.; SABLAYROLLES, I. M.; SALMON, J. M. BARRE, P. Early thiamin assimilation by yeasts under enological conditions: impact on alcoholic fermentation kinetics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 101-106, 1996.

BEECH, F. W. English Cidermaking: Technology, Microbiology and Biochemistry. In: Beech, F. W. **Progress in Industrial Microbiology**. Long Ashton: Beech, 1993. p. 133-213.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 119-120.

BELTRAN, G.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 996-1002, 2005.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J.-M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 319-324, 1990.

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

BINNIG, R.; POSSMANN, P. Apple Juice. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. **Fruit Juice. Processing Technology**. Auburndale: Agscience, 1993.

BISSON, L. F. Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 172-184, 1991.

BISSON, L. F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

BLATEYRON, L. AGUERA, E.; DUBOIS, C.; GERLAND, C.; SABLAYROLLES, J. M. Control of oxygen additions during alcoholic fermentations. **Viticultural and Enological Sciences**, v. 53, p.131–135, 1998.

BLATEYRON, L.; ORTIZ-JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M., Stuck fermentations: oxygen and nitrogen requirements – importance of optimising their addition. **Australian. NZ Grapegrower & Winemaker**, v. 478, p. 73-79, 2003

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 União**, Brasília, 4 de junho de 2009.

BURROUGHS, L. F. The amino-acids of apple juices and ciders. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, n. 3, p. 122-131, 1957.

CABRANES, C; BLANCO, D.; MANGAS, J. J. Characterisation of fermented apple products using data obtained from GC analysis. **Analyst**, v. 123, n. 10, p. 2175-2179, 1998.

CASSELAS, G. B. **Effect of low temperature fermentation and nitrogen content on wine yeast metabolism**. Tese de doutorado. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, 2005.

COLOMBIÉ, S.; LATRILLE, E.; SABLAYROLLES, J. M. Online estimation of assimilable nitrogen by electrical conductivity measurement during alcoholic fermentation in enological conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 229-235, 2007.

CORREIA, L. F. M.; FARAONI, A. S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Efeitos do processamento industrial de alimentos sobre a estabilidade de vitaminas. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 1, 2008.

CRUZ, S. H.; CILLI, E. M.; ERNANDES, J. R. Structural complexity of the nitrogen source and influence on the yeast growth and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 54-61, 2002.

DeMAN, J. M. **Principles of Food Chemistry**. Maryland, USA: Aspen Publishers, 1999.

DOMBEK, K. M.; INGRAM, L. O. Determination of the intracellular concentration of ethanol in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 197-200, 1986.

DOWNING, D. L. Apple cider. In: DOWNING, D. L. **Processed apple products**, 1989, p. 169-187.

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

DRILLEAU, J. F. La Sidra. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editotial Acribia, 1995. p. 113-123.

DRILLEAU, J. F. Réunion annuelle Certec : azote et fermentation, composés phénoliques et oxydation. **Pomme**, n. 33, p. 24-25. 1993.

DRILLEAU, J. F.. Fermentation of cider. **Pomme à cidre**, v. 21, p. 20-22, 1990.

DRILLEAU, J. F.. La cidrerie. In: BOURGEOIS C. M.; LARPENT J. P., **Microbiologie alimentaire, aliments fermentés et fermentations alimentaires**, p. 138-161, 1996.

Du TOIT, W. J. Oxygen in must and wine: a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, v. 27, n. 1, p.76-104, 2006.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA (EPAGRI). **A cultura da Macieira**. Florianopolis: GMC/ Empresa de pesquisa Agropecuaria e Extensão Rural de Santa Catarina., v. 2, 2002. p. 743.

FERREIRA, P. Yes, nós temos maçãs. **Inovação em Pauta**, 5 ed., p. 43-47, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Statistical Databases**. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 17 de novembro de 2010.

FORNAIRON-BONNEFOND, C.; DEMARETZ, V.; ROSENFELD, E.; SALMON, J. M Oxygen addition and sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 176-182, 2002.

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.

GOÑI, D. T.; AZPILICUETA, C. A. Use of nitrogen compounds in spontaneous and inoculated wine fermentations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4018-4024, 1999.

GUYOT, S.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J. F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997.

HEATHERBELL, D. A. Fruit juice clarification and fining. **Confructa Studien**. n. 28, p. 192-197, 1984.

HENSCHKE, P. A.; JIRANEK, V. Yeasts - metabolism of nitrogen compounds. In: FLEET, G. H. (Ed.) **Wine microbiology and biotechnology**. New York: CRC Press, 1992. p.77-164.

HOUTMAN, A. C.; DU PLESSIS, C.S. Nutritional deficiencies of clarified white grape juices and their correction in relation to fermentation. **African Journal for Enology and Viticulture**, v. 7, p. 39-46, 1986.

IAL. Métodos Físico químicos para análises de alimentos. In: IAL, **Normas Analíticas**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INGLEDEW, W. M.; KUNKEE, R. E. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 65-76, 1985.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P. A.. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by-assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 461-467, 1995.

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.

JULIEN, A.; TRIOLI, G.; DULAU, L. Alcoholic fermentation control: the yeast growth factors and arrest prevention. **Revue des Œnologues**, v. 101, p. 25-29, 2001.

KIRSOP, B. H.. Developments in beer fermentation. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**, v. 6, p. 79-131, 1982.

LANGUET, P.; AGUERA, E.; SAMSON, A.; ORTIZ-JULIEN, A.; SALMON, J. M. Valorisation aromatique des moûts par l'utilisation séquentielle de levure d'espèces non-*Saccharomyces* et *Saccharomyces*. **Revue des Œnologues**, v. 117, p. 31-33, 2005.

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. 227-233, 2001.

LAURITA, E.; KERVINEN, R.; AHVENAINEN, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, v. 4, p. 53-65, 1998.

LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Revue des Œnologues**, n. 88, p. 17-20, 1998.

LEQUÉRÉ, J. M.; HUSSON, F.; RENARD, C. M. G. C.; 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.; DRILLEAU, J. F. Cider-making. In: LEA, A. (Ed.). **Fermented Beverage Production**. London, v. 2, 2003. p.59-87.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

MALHERBE, S.; FROMION, V.; HILGERT, N.; SABLAYROLLES, J. M. Modeling the effects of assimilable nitrogen and temperature on fermentation kinetics in enological conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 261-272, 2004.

MANGAS, J. J.; RODRIGUEZ, R.; SUAREZ, B.; PICINELLI, A.; DAPENA, E. Study of the phenolic profile of cider apple cultivar at maturity by multivariate techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 4046-4052, 1999.

MANGINOT, C.; ROUSTAN, J. L.; SABLAYROLLES, J. M. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. Importance of the stationary phase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 8, p.511-517, 1998.

MARTINEZ, M. V.; WHITAKER, J. R. The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 195-200, 1995.

MELO, A. A. M.; VILAS BOAS, E. V. D. B. Inibição do escurecimento enzimático de banana maçã minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 110-115, 2006

MESAS, J. M.; ALEGRE, M. T. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 4, p. 174-183, 1999.

MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7306-7310, 2004.

MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p.144-148, 1961.

MURATA, M.; KUROKAMI, C.; HOMMA, S. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 11, p. 1705-1710, 1992.

NICOLAS, J. J.; RICHARD-FORGET, F. C.; GOUPY, P. M.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Y. Enzymatic browning reaction in apple and apple products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 109- 157, 1994.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidricola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 2003. Tese (Doutorado em Bioprocessos Tecnológicos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2003.

NOGUEIRA, A., GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1025-1032, 2008a.

NOGUEIRA, A.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F.; SALMON, J. M. Competition entre microorganismes et PPO/polyphenols vis a vis de l'oxygène. In J. F. DRILLEAU (Ed.), **Cidre et polyphenols: les polyphenols natifs des pommes a cidre. Presence, devenir et rôle**. Rapport final Du Programme Interregional de Recherche Bretagne & Pays de la Loire (2001–2003) no. 691, operation no. AOCAZ3 (pp. 1–16). Le Rheu: INRA, 2004.

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

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C.; SIMÕES, D. R. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p.1083-1092, 2007.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. p. 113-139.

OH, H.; HOFF, J. E. pH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins. **Journal of Food Science**. v. 52, p. 1267-1269, 1987.

O'CONNOR-COX, E. S. C.; LODOLO, E.J.; AXCELL, B.C. Mitochondrial relevance to yeast fermentative performance: a review. **The Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 19-25, 1996.

O'CONNOR-COX, E. S. C.; LODOLO, E.J.; AXCELL, B.C. Role of oxygen in high-gravity fermentations in the absence of unsaturated lipid biosynthesis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, p. 97-107. 1993.

OLIVEIRA, T. M.; SOARES, N. F. F.; de PAULA, C. D.; VIANA, G. A. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. Enzymic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 38, n. 5, p. 1202–1204, 1990.

OUGH C. S.; CROWELL E. A.; MOONEY L. A. Formation of ethyl carbamate precursors during grape juice (Chardonnay) fermentation. I. Addition of amino acids, urea and ammonia: effects of fortification on intracellular and extracellular precursors. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 39, p. 243-249, 1988.

OUGH, C. S.; HUANG, Z.; STEVENS, D. Amino Acid Uptake by Four Commercial Yeast at two Different Temperatures of Growth and Fermentation: effects on urea excretion and reabsorption. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 42, p. 26-40, 1991.

PAGANINI, C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. Aptidão industrial de seis cultivares de maçã (dados da safra 2001/2002). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, 2004.

PÉRÈS, P. N. O mercado da maçã no Brasil e no mundo. **I Frutivar**, 2009. Disponível em <www.abpm.org.br>. Acesso em 02/12/2010.

PÉREZ-ZÚÑIGA, F. J.; ABAD, F. B.; CARTAGENA, L. G. Residual proteins and amino nitrogen in fermented wine and beer: must variety and yeast interactions. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 205, p. 165-169, 1997.

PODSĘDEK, A.; WILSKA-JESZKA, J.; ANDERS, B.; MARKOWSKI, J. Compositional characterisation of some apple varieties. **European Food Research and Technology**, v. 210, n. 4, p. 268-272, 2000.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

QUEIROZ, C. DA SILVA, A. J. R.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase activity, phenolic acid composition and browning in cashew apple (*Anacardium occidentale*, L.) after processing. **Food Chemistry**, v. 125, n. 1, p. 128-132, 2011.

RIBÉREAU-GAYON, P. ; DUBOUDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. **Traité d'oenologie. 1-Microbiologie du vin et vinifications**. Paris: La Vigne, v. 1. 1998. 617 p.

ROCHA, A. M.; MORAIS, A. M. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagored" apple. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 85-90, 2001.

ROGER, J. M.; SABLAYROLLES, J. M.; STEYER, J. P.; BELLON-MAUREL, V. Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 7, p. 804-815, 2002.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; BLONDIN, B.; SALMON, J. M. Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 113-121, 2003.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B.; RIGOLET, M.; SALMON, J. M. Nonrespiratory oxygen consumption pathways in anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence and partial characterization. **Yeast**, v. 19, p. 1299-1322, 2002.

ROSENFELD, E.; SCHAEFFER, J.; BEAUVOIT, B.; SALMON, J. M. Study of yeast promitochondria isolated during anaerobic stationary phase. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v. 85, p. 9–21, 2004.

ROSENFELD, E.; BEAUVOIT, B. Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 13, p. 1115-1144, 2003.

SABLAYROLLES, J. M. Besoin en oxygène lors des fermentations oenologiques. **Revue Française d'oenologie**, v. 124, p. 77-79, 1990.

SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Evolution de la solubilité de l'oxygène au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. **Sciences des Aliments**, n. 6, p. 177-184, 1986.

SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 2, p. 154-163, 1998.

SALMON, J. M. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 953-958, 1989.

SALMON, J. M.; BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3831-3837, 1998.

SALMON, J. M.; FORNAIRON, C.; BARRE, P. Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, p. 154–163, 1998.

SALMON, J. M. Interactions between yeast, oxygen and polyphenols during alcoholic fermentations: Practical implications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 9, p. 959-965, 2006.

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, p. 89-84, 1994.

SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; MONTGOMERY, M. W. Inhibition of Polyphenoloxidase by Sulfite. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1531-1536, 1986.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing Co., 1995.

SIEBERT, K. J.; TROUKHANOVA, N. V.; LYNN, P. Y. Nature of polyphenol-protein interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 80-85, 1996.

SMOCK, R. M.; NEUBERT, A. M. **Apples and apples products**. New York: Interscience Publishers, 1950.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage—a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 1478-1487, 1992.

TAJCHAKAVIT, S., BOYE, J. I.; BÉLANGER D.; COUTURE, R. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. **Food Research International**, v. 34, n. 5, p. 431-440, 2001.

TANNER, H., BRUNNER, H. R. **Getränke Analytik - Untersuchungsmethode für die Labor- und Betriebspraxis**. Wädenswill: Verlag Helles, 1985.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

VALERO, E.; MILLÁN, C.; ORTEGA, J. Influence of oxygen addition during growth phase on the biosynthesis of lipids in *Saccharomyces cerevisiae* (M330-9) in enological fermentations. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 1, p. 33-38, 2001.

VALERO, E.; MOYANO, L.; MILLAN, M. C.; MEDINA, M.; ORTEGA, J. M. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, v. 78, p. 57-61, 2002.

VÁMOS-VIGYÁZÓ, L.; NÁDUDVARI-MÁRKUS, V. Enzymatic browning, polyphenol content, polyphenoloxidase and peroxidase activities in pear cultivars. **Acta Alimentaria**, v. 11, p. 157-160, 1982.

VANZANI, P., ROSSETTO, M. RIGO, A.; VRHOVSEK, U.; MATTIVI, F.; AMATO, E.; SCARPA, M. Major phytochemicals in apple cultivars: Contribution peroxyl radical trapping efficiency. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3377-3382, 2005.

VIDAL, J. C.; DUFOURCQ, T.; BOULET, J. C.; MOUTOUNET, M. Les apports d'oxygène au cours des traitements des vins. Bilan des observations sur site, 1ère partie. **Revue Française d'Oenologie**, n. 190, p. 24-30, 2001.

VIVAS, N. Acquisitions récentes sur l'oxydoréduction des vins rouges lors de leur élevage. **Revue des oenologues**, v. 90, p. 15-20, 1999.

VIVAS, N. ; DEBEDA, H.; MENIL, F.; VIVAS DE GAULEJAC, N.; NONIER M. F.; Mise en évidence du passage de l'oxygène au travers des douelles constituants les barriques par l'utilisation d'un dispositif original de mesure de la porosité du bois. Premiers résultats. **Science des Aliments**, v. 23, p. 655-678, 2003.

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

WHITAKER, J. R. Polyphenol Oxidase.. In: WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2 ed. New York: Marcel Oesker, 1994.

WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2 ed. New York: Marcel Oesker, 1994.

WILL, F.; LUDWIG, M.; DIETRICH, H.; SCHULZ, K.; OTTO, K. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 653-660, 2002.

WOSIACKI, G.; CHERUBIN, R. A.; SANTOS, D. S. Cider processing in Brazil. **Fruit processing**, v. 7, n. 7, p. 242-249, 1997.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C.; DENARDI, F.; VIEIRA, R. G. Quality profile of samples of 139 apple cultivars harvested in Brazil from 1982 to 2006. **Acta Alimentaria**, v. 37, n. 1, p. 9-22, 2008.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation of Parana – Brazil. **Fruit processing**, v. 11, n. 5, p. 177-182, 2001.

WOSIACKI, G.; SILVA, N. C. C.; NOGUEIRA, A.; DENARDI, F. The apple and its fructose content cultivar sansa – a case study. **Publicatio**, v. 11, n. 2, p. 27-39, 2005.

ANEXO I

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o artigo: "**Apple wine Processing with Different Nitrogen Contents**" de autoria de Aline Alberti, Renato Giovanetti Vieira, Jean Françoise Drilleau, Gilvan Wosiacki e Alessandro Nogueira, foi aceito e está em processo de publicação no **Brazilian Archives of Biology and Technology - BABT**, tendo como código de identificação o número 2852.

Curitiba, 01 de novembro de 2010.


Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol
Editor