

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *strictu sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NO PERFIL AROMÁTICO DE FERMENTADO
DE MAÇÃ**

PONTA GROSSA
2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *strictu sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

**INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NO PERFIL AROMÁTICO DE FERMENTADO
DE MAÇÃ**

Dissertação apresentada à banca examinadora como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Alessandro Nogueira
Co-orientador: Gilvan Wosiacki

PONTA GROSSA
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S237 SANTOS, CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS
INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NO PERFIL
AROMÁTICO DE FERMENTADO DE MAÇÃ/ CAROLINE
MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS. Ponta
Grossa, 2011.
118

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro
Nogueira.

Co-Orientador: Prof. Dr. Gilvan
Wosiacki.

1.Hanseniaspora uvarum. 2.Hanseniaspora
guilliermondii. 3.Saccharomyces cerevisiae.
4.fermentação. 5.maçã. I.Nogueira,
Alessandro. II. Wosiacki, Gilvan. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos. IV. T.

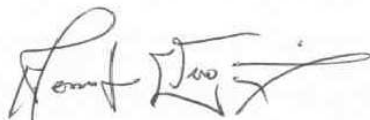
CDD: 660.62

TERMO DE APROVAÇÃO

CAROLINE MONGRUEL ELEUTÉRIO DOS SANTOS

INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA NO PERFIL AROMÁTICO DE FERMENTAÇÃO DE MAÇÃ.

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



Profa. Dra. Eliana Beleski Borba Carneiro - UEPG



Profa. Dra. Renata Dinnies Santos - UEPG



Profa. Dra. Elenise Sauer - UTFPR

Ponta Grossa, 02 de março de 2011.

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por ter me capacitado em
mais esta conquista.

Ao meu marido, Junior, pelo amor e
compreensão.

Ao meu filho, João Vitor, pela alegria de sua
existência.

Aos meus pais e sogros pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Alessandro Nogueira, pela dedicação, paciência, conhecimentos transmitidos e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Gilvan Wosiacki, co-orientador desta dissertação, por sua ajuda, sabedoria e por sempre me incentivar a buscar o conhecimento.

À Prof. Msc. Giovana de Arruda Moura Pietrowski pela parceria neste trabalho, amizade conquistada, pelas palavras de conforto e pela dedicação extrema desde o início.

À colega Aline Alberti pela ajuda imediata sempre que foi necessário e pelo companheirismo.

À Cintia Maia Braga pela dedicação nas análises e pelo companheirismo.

Aos estagiários Frederico e Renan pela competência no desenvolvimento de análises.

Aos coordenadores do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de crescimento.

À Prof. Adriana B. P. Medeiros da Universidade Federal do Paraná, pela disponibilidade nas análises por cromatografia gasosa.

À CAPES pelo auxílio financeiro durante os dois anos de pós-graduação.

À Denise Milleo pelo apoio, palavras de conforto e prontidão para ajudar.

À Prof. Dr Deise que contribui com as análises sensoriais realizadas neste trabalho.

À Denise Mendes que sempre fornece auxílio com uma imensa tranquilidade.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A sidra brasileira, bebida frisanse de maçã de baixo grau alcoólico, apresenta cor pouco intensa e baixa qualidade aromática, necessitando de correção do teor de açúcar final. A bebida francesa é considerada a melhor do mundo devido às suas características físico-químicas e qualidade aromática, através de processo que valoriza a fermentação oxidativa, etapa que contribui intensivamente para a formação de compostos aromáticos da bebida. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de compostos voláteis de fermentados de maçã elaborados sob ação de diferentes leveduras oxidativas e fermentativas. Foi utilizado mosto de maçã da cultivar Gala e monitorado o crescimento das cepas, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de processo fermentativo. A técnica de *headspace* foi utilizada para a coleta dos voláteis que foram identificados e quantificados por cromatografia gasosa. As leveduras oxidativas, *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, quando mantidas no mosto sem adição de outras cepas, apresentaram atividade fermentativa e mantiveram açúcares residuais no produto final, podendo assim serem usadas na elaboração de produtos fermentados com baixa graduação alcoólica. Os compostos voláteis foram captados em baixa quantidade, no entanto todos com aromas frutais e florais que contribuem para a qualidade aromática da bebida. As cepas fermentativas utilizadas foram: *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet, *Saccharomyces cerevisiae* Arome Plus, *Saccharomyces cerevisiae* Fermol Aromatic e *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA-11. As cepas fermentativas apresentaram atividade de fermentação desejada com manutenção de açúcares residuais mas os compostos voláteis não apresentaram qualidade aromática agradável. As fermentações mistas foram realizadas sob ação de *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet com *Hanseniaspora uvarum*, e de *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet com *Hanseniaspora guilliermondii*, utilizando-se de inoculações sequenciais. Os resultados evidenciaram que houve uma boa interação entre as leveduras fermentativas e oxidativas, pois os fermentados obtidos além de apresentarem grau alcoólico adequado, mantiveram a presença de açúcares residuais e os compostos voláteis que contribuíram para a qualidade aromática da bebida. Neste trabalho foi possível perceber que a técnica de *headspace* utilizada não foi eficiente para compostos voláteis com altos pontos de volatilização, detectando assim uma pequena quantidade de compostos em cada produto. A bebida elaborada que mais agradou em relação ao perfil aromático na análise sensorial foi a elaborada sob ação de processo puro com a cepa *Hanseniaspora guilliermondii*, sendo esta considerada uma boa opção a ser utilizada na produção de fermentados de maçã, pois foi altamente produtora de ésteres, compostos que contribuem para aromas frutados e doces em processos fermentativos.

Palavras chave: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação, maçã, compostos voláteis.

ABSTRACT

Brazilian cider, sparkling apple wine with low-alcohol content, has little color and low aromatic quality, requiring correction of the final sugar content. French cider is considered the best in the world due to its physical-chemical and aromatic sensations, through the fermentation process that enhances oxidative step that contributes intensively to the formation of aromatic compounds. Thus, this study aimed to evaluate the profile of volatile compounds of fermented apple prepared under action of different oxidative and fermentation yeasts. We used apple juice from Gala and monitored the growth of the strains, the physico-chemical and kinetic aspects over 10 days of fermentation. The technique of headspace was used for collect of volatiles that were identified and quantified by gas chromatography. Oxidative yeasts used, *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii*, when kept with no other strains in the wort, showed fermentation activity and remained residual sugar in the finished product, so thus can be used in the preparation of fermented products with low alcohol content. The volatile compounds were obtained in small amounts, but all have floral and fruity aromas that contribute to the aromatic quality of the product. Fermentative strains used were *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet, *Saccharomyces cerevisiae* Arome Plus, *Saccharomyces cerevisiae* Fermol Aromatic and *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA-11. These showed expected fermentation activity with maintenance of residual sugar but the volatile compounds were not pleasant aromatic quality. The mixed fermentations were carried out under action of *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet whit *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet with *Hanseniaspora guilliermondii*, using different sequential inoculations. The results showed that there was good interaction between fermentative and oxidative yeasts, because in addition to presenting appropriate alcoholic, maintained the presence of residual sugar, the volatile compounds contributed to the aromatic quality. In this study it was observed that the headspace technique is not efficient for volatile compounds with high points of volatilization, thereby detecting a small amount of compounds in each product. The beverage prepared most appreciated in relation to the aromatic profile in the sensory analysis was prepared under the exclusive action of *Hanseniaspora guilliermondii*, which is considered a good choice of strain to be used in the fermented apple production because it was highly producing esters, compounds that contribute to fruity and sweet aromas in fermentation processes.

Keywords: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, apple, volatile compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1.	Diferenças destacadas em negrito entre o processamento do fermentado brasileiro e francês de maçã.....	22
Figura 2.	Esquema simplificado da geração de energia nas leveduras a partir de glucose.....	30
Figura 3.	Sequência de reações que convertem glucose a etanol.....	30

Capítulo II: Avaliação do efeito de leveduras não-*Saccharomyces* nos compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã.

Figura 1.	Esquema dos fermentadores em anaerobiose.....	48
Figura 2.	Resultados de contagem de células de duas leveduras oxidativas diferentes em mosto de maçã.....	53
Figura 3.	Evolução de açúcares e etanol nos fermentados de maçã realizados sob a ação de diferentes leveduras oxidativas. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.....	54
Figura 4.	Resultados de perda de massa por liberação de CO ₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes concentrações de SO ₂ no mosto. (A) Resultados para a cepa <i>H. uvarum</i> . (B) Resultados para a cepa <i>H. guilliermondii</i>	57
Figura 5.	Resultados de perda de massa por liberação de CO ₂ nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes temperaturas durante o processo fermentativo. (A) Resultados para a cepa <i>H. uvarum</i> . (B) Resultados para a cepa <i>H. guilliermondii</i>	57
Figura 6.	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura <i>H. guilliermondii</i>	59

Capítulo III: Efeito de diferentes cepas de *Saccharomyces* nos compostos aromáticos do *headspace* de fermentados de maçã.

Figura 1.	Esquema dos fermentadores em anaerobiose.....	67
Figura 2.	Resultados de contagens de células dos fermentados de maçã sob ação de quatro diferentes leveduras fermentativas.....	71
Figura 3.	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	75

Capítulo IV: Avaliação dos compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã produzidos por fermentações mistas e sequenciais.

Figura 1.	Esquema dos fermentadores em anaerobiose.....	85
Figura 2.	Contagem de células nos diferentes fermentados de maçã realizados com	90

	diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. uvarum</i> . A) Contagem de células de <i>H. uvarum</i> . B) Contagem de células de <i>S. cerevisiae</i>	
Figura 3.	Contagem de células nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. guilliermondii</i> . A) Contagem de células de <i>H. guilliermondii</i> . B) Contagem de células de <i>S. cerevisiae</i>	90
Figura 4.	Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. uvarum</i> . A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.....	91
Figura 5.	Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa <i>S. cerevisiae</i> sobre a cepa <i>H. guilliermondii</i> . A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.....	91
Figura 6.	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação seqüencial de <i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 3° dia.....	98
Figura 7.	Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação seqüencial de <i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 0 dia.....	99

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.	Classe de compostos voláteis aromáticos existentes na natureza e seus limiares de percepção.....	20
Tabela 2.	Compostos voláteis majoritários do fermentado de maçã e sidra.....	29

Capítulo II: Avaliação do efeito de leveduras não-*Saccharomyces* nos compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã.

Tabela 1.	Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala.....	52
Tabela 2.	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzido sob ação de duas diferentes cepas oxidativas.....	54
Tabela 3.	Concentração de compostos voláteis detectados em dois fermentados de maçã elaborados com cepas de leveduras <i>Hanseniaspora uvarum</i> e <i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	56
Tabela 4.	Concentração de compostos voláteis no mosto de maçã.....	56
Tabela 5.	Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas oxidativas.....	58

Capítulo III: Efeito de diferentes cepas de *Saccharomyces* nos compostos aromáticos do *headspace* de fermentado de maçã.

Tabela 1.	Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala.....	70
Tabela 2.	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de quatro diferentes cepas fermentativas.....	72
Tabela 3.	Concentração de compostos voláteis detectados em quatro fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas comerciais de leveduras <i>S. cerevisiae</i>	73
Tabela 4.	Resultado do teste ordenação por preferência aromática das amostras de quatro fermentados de maçãs elaborados com diferentes cepas comerciais de leveduras <i>S. cerevisiae</i>	74

Capítulo IV: Efeito de inóculos mistos e sequenciais de leveduras não-*Saccharomyces* e *Saccharomyces* nos aromas do *headspace* de fermentados de maçã.

Tabela 1.	Resultados das análises físico-químicas do mosto de maçã da cultivar Gala.....	89
Tabela 2.	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	92
Tabela 3.	Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	92
Tabela 4.	Resultados das análises físico-químicas (10ºdia) dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	93
Tabela 5.	Resultados das análises físico-químicas (10ºdia) dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> Bouquet.....	93
Tabela 6.	Concentração dos compostos voláteis detectados nas amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	95
Tabela 7.	Concentração dos compostos voláteis detectados nas amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	96
Tabela 8.	Concentração de compostos voláteis no mosto de maçã.....	96
Tabela 9.	Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. uvarum</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	97
Tabela 10.	Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de <i>H. guilliermondii</i> com diferentes tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	98
Tabela 11.	Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados pela ação de fermentações sequenciais com diferentes cepas oxidativas e tempos de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	99

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO LITERÁRIA	18
3.1 A MAÇÃ E SEUS AROMAS	18
3.2 FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA	20
3.2.1 Processamento do fermentado de maçã e sidra	21
3.2.1.1 Fase oxidativa	23
3.2.1.2 Fase fermentativa	26
3.2.2 Fermentação mista e sequencial	27
3.2.3 A formação de aromas secundários: metabolismo das leveduras	30
3.2.4 Efeito da adição de dióxido de enxofre (SO₂) sobre os compostos voláteis do fermentado de maçã	32
3.2.5 Impacto de processos térmicos e não térmicos	33
4. REFERÊNCIAS	34
 CAPÍTULO II: Avaliação do efeito de leveduras não – <i>Saccharomyces</i> nos compostos voláteis do <i>headspace</i> de fermentado de maçã	 44
RESUMO	45
ABSTRACT	45
1. INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS	47
2.2 MÉTODOS	47
2.2.1 Processos	47
2.2.2 Experimentos	49
2.2.3 Análises Instrumentais	50
2.2.4 Análises físico-químicas	51
2.2.5 Análises microbiológicas	51
2.2.6 Análise sensorial	51
2.2.7 Análises estatísticas	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÃO	59
5. REFERÊNCIAS	59

CAPÍTULO III: Efeito de diferentes cepas de *Saccharomyces* nos compostos aromáticos do *headspace* de fermentado de maçã. _____ 63

RESUMO	64
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 MATERIAIS	66
2.2 MÉTODOS	66
2.2.1 Processos	66
2.2.3 Análises físico-químicas	69
2.2.4 Análises microbiológicas	69
2.2.5 Análise sensorial	69
2.2.6 Análises estatísticas	70
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4. CONCLUSÃO	75
5. REFERÊNCIAS	75

CAPÍTULO IV: Avaliação dos compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã produzidos por fermentações mistas e sequenciais. _____ 80

RESUMO	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS	83
2.2 MÉTODOS	83
2.2.1 Processos	83
2.2.2 Experimentos	86
2.2.3 Análises Instrumentais	86
2.2.4 Análises físico-químicas	87
2.2.5 Análises microbiológicas	87
2.2.6 Análise sensorial	88
2.2.7 Análises estatísticas	88
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4. CONCLUSÃO	100
5. REFERÊNCIAS	100
CAPÍTULO V	103
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
2. REFERÊNCIAS	105
ANEXO A – Modelos de fichas para Análise Sensorial Olfativa	118

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Avaliação sensorial dos alimentos é um processo de extrema importância para os consumidores, sendo um dos fatores determinantes de escolha por diferentes marcas e/ou produtos. O mercado tem se tornado cada vez mais exigente em relação aos atributos de qualidade dos alimentos, como por exemplo: sabor, textura, aroma, qualidade nutricional, propriedades funcionais e custo. Por isso a preocupação em melhorar estes atributos tem tomado espaço dentro das áreas de pesquisas das empresas e centros de pesquisa em alimentos.

Os aromas desempenham um papel importante nas características sensoriais dos alimentos, pois são eles que fazem com que o consumidor se interesse pelo produto uma vez que as primeiras sensações percebidas de um alimento vêm da sua aparência e aroma. A percepção dos aromas é complexa, pois o olfato humano consegue discriminar milhares destes compostos, de maneiras diferenciadas.

A maçã, fruta com elevado consumo no Brasil, tem uma taxa de descarte de 10 a 30% em virtude de defeitos físicos e/ou microbiológicos. Essas frutas são encaminhadas ao setor agroindustrial de processamento a fim de agregar valor em produtos nobres como sucos, produtos fermentados ou produtos destilados. Atualmente os produtos fermentados têm um consumo restrito a festas de final de ano devido principalmente à baixa qualidade da bebida, resultado de um produto doce e pouco aromático.

Em algumas pesquisas foram encontrados mais de 80 compostos voláteis diferentes em maçã e produtos derivados, responsáveis pelo aroma característico dos mesmos, comprovando que a qualidade do fermentado pode ser melhorada se um processo que realce a formação destes compostos for valorizado; entretanto no Brasil pouco tem sido pesquisado em relação a estes compostos.

Alguns processos que têm sido pesquisados objetivando esta melhora são: a redução de biomassa que aumenta o tempo de fermentação proporcionando aromas frutados, e o uso de fermentação mista com leveduras oxidativas e fermentativas. As leveduras oxidativas estão sendo propostas devido a uma ampla contribuição em compostos químicos como ésteres e álcoois superiores que contribuem com notas frutais, doce e florais em termos aromáticos. O método francês de processamento é considerado como um dos melhores do mundo porque considera a etapa oxidativa da fermentação como parte do processo microbiológico.

As leveduras oxidativas mais comumente encontradas em processos de elaboração de bebidas fermentadas são *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Cândida*. Estas leveduras quando

utilizadas em fermentações mistas ou sequenciais com *Saccharomyces cerevisiae* resultam num processo fermentativo mais lento, com graduação alcoólica, teor de açúcares residuais e formação de voláteis ideais para a qualidade do produto final (XUFRE et al., 2006; ROMANO et al., 2003; XU et al., 2006).

Desta forma o trabalho visa caracterizar os aromas de fermentados de maçãs obtidos com diferentes leveduras a fim de indicar processos que possam valorizar os aromas na bebida.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil dos compostos voláteis em fermentados de maçãs desenvolvidos em condições brasileiras de processamento .

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito de diferentes leveduras comerciais *Saccharomyces cerevisiae* no perfil volátil de fermentados de maçãs Gala nas condições brasileiras de processamento;

Avaliar o efeito de leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* no perfil volátil de fermentados de maçãs Gala nas condições brasileiras de processamento;

Avaliar o efeito da fermentação sequencial entre leveduras *Hanseniaspora* e *Saccharomyces* no perfil volátil de fermentados de maçãs nas condições brasileiras de processamento;

Analisar sensorialmente os aromas dos produtos obtidos pela ação de diferentes leveduras *Saccharomyces* e *Hanseniaspora*.

3. REVISÃO LITERÁRIA

3.1 A MAÇÃ E SEUS AROMAS

A maçã é, dentre as frutas de clima temperado cultivadas no Brasil, aquela que apresentou maior expansão em área plantada e em volume de produção nos últimos vinte anos. Na safra 2009/2010 foram produzidas 1.274.705 toneladas de frutas correspondendo a 39.154 ha de área plantada. A maior concentração do cultivo está na Região Sul, sendo Santa Catarina o maior produtor, com aproximadamente 53% do total da área plantada. O Rio Grande do Sul é o segundo estado produtor, com aproximadamente 42% do total da área plantada, sendo seguido pelo Paraná com 4%. A maior parte da produção provém de duas cultivares: Gala e Fuji, representado 55% e 40% da produção respectivamente (ABPM, 2011).

A porção comestível das maçãs é composta basicamente de água, açúcares, ácidos orgânicos e substâncias pécticas com alguns outros compostos minoritários. O conteúdo de açúcares e ácidos possui grande influência na qualidade sensorial da fruta. Os açúcares majoritários são frutose, sacarose e glucose e os teores de ácido málico estão ao redor de 90% do total de ácidos da fruta, no restante contém traços de cítrico, succínico e outros (BERTITER, 1985; HULME e RHODES, 1971).

A matéria prima disponível para ser processada pela indústria de transformação provém de maçãs de descarte, oriundas do rigoroso processo de seleção e classificação comercial das maçãs de mesa, necessário para satisfazer as exigências do consumidor brasileiro. Aproximadamente 70% dos frutos rejeitados nestes processos de seleção e classificação, são adequados para o processamento industrial, recebendo o nome de maçãs industriais, sendo que estas mantêm suas propriedades intrínsecas com relação à parâmetros de qualidade como teor de açúcares, ácidos e compostos fenólicos (ABPM, 2011; WOSIACKI, 2001; WOSIACKI et. al, 1991).

Nogueira et al. (2003) declaram não haver preocupações em relação ao desenvolvimento de cultivares de interesse comercial voltadas aos procedimentos industriais, pois afirmam que nem todas as cultivares de mesa são recomendáveis para obtenção de sucos concentrados ou produtos vinificáveis.

De acordo com Drilleau (1993) a maçã recebe a seguinte classificação quanto à acidez e o conteúdo de polifenóis:

- doce (teor de ácido málico $< 0,45 \text{ g.100mL}^{-1}$ e de polifenóis $< 200 \text{ mg.L}^{-1}$);
- levemente amarga (teor de ácido málico $< 0,45 \text{ g.100mL}^{-1}$ e de polifenóis entre 200 e 700 mg.L^{-1});

- amarga (teor de ácido málico $> 0,45\text{mg.100mL}^{-1}$ e de polifenóis entre 200 e 700mg.L^{-1});
- levemente ácida ($0,35 - 0,45 \text{ g.100mL}^{-1}$ e polifenóis $< 200 \text{ mg.L}^{-1}$);
- ácida (teor de ácido málico $> 0,45 \text{ g.100mL}^{-1}$ e polifenóis $< 200 \text{ mg.L}^{-1}$).

Os compostos voláteis são responsáveis pelo sabor característico dos alimentos, caracterizando o aroma, que é a sensação percebida pelo sentido do olfato, sendo um dos mais importantes atributos dos alimentos e bebidas (SIMÕES, 2008; THOMAZINI e FRANCO, 2000; BASTOS et al., 2002). Segundo Gatfield (1995) e Pinheiro e Pastore (2003), os compostos químicos responsáveis pelos aromas característicos são: alcóois, ácidos, ésteres, cetonas, lactonas, aldeídos e outras moléculas complexas que resultam do metabolismo secundário de plantas ou podem ser obtidas de fontes animais.

Os fatores que afetam a composição e concentração dos compostos voláteis nas frutas são: ambientais, cultivar, grau de maturação da matéria-prima, etapas do processamento (prensagem, tratamento enzimático, clarificação, tratamentos térmicos) e condições de armazenamento. As diferentes etapas do processamento podem causar mudanças no perfil aromático do produto final quando comparado com a fruta fresca (JANZANTTI et al., 2003).

A contribuição de um composto ao aroma depende do seu limiar de odor (nível no qual um composto pode ser detectado pelo cheiro) e da sua concentração na fruta. O valor de atividade de odor (VAO) define a razão entre a concentração de um composto e seu limiar de percepção. De fato, a volatilidade e a percepção de compostos aromáticos são significativamente afetadas pela composição química de diferentes produtos, que podem mascarar o odor devido a alguns compostos de impacto presentes em concentrações acima de seus limiares de percepção e favorecer a percepção de outras moléculas presentes em concentrações menores do que seus limiares de percepção (BALDWIN et al., 2000; FERREIRA et al., 2003).

A Tabela 1 apresenta algumas classes de compostos voláteis responsáveis pelo aroma descrito e seus limiares de percepção.

Tabela 1. Classes de compostos voláteis aromáticos existentes na natureza e seus limiares de percepção.

<i>CLASSE</i>	<i>COMPOSTO</i>	<i>AROMA</i>	<i>LIMIAR DE PERCEPÇÃO</i> (mg.hL ⁻¹)
Álcoois	(R) 2-metil-1-butanol	Fermentado, gorduroso, fresco, éter	ND
	Trans-2-hexenol	Fruta	ND
	Cis-hexenol	Grana fresca cortada	400
Aldeídos	Etanal (acetaldeído)	Pungente, nota de noz, alcoólico quando diluído	15 – 120
	(S) 2-metil-butanal	Pungente, fruta, fresco	ND
Ácidos carboxílicos	Hexanal	Fruta não amadurecida	4,5 – 5,0
	n-octanal	Amargo, fruta cítrica	0,7
	(S) ácido-2-metil-butanóico	Fruta, doce	ND
	(R) ácido-2-metil-butanóico	Queijo, doce	ND
Ésteres	Butanoato de etila	Fruta de abacaxi	1
	Acetato de etila	Éter, conhaque	5000
	Propionato de etila	Fruta, nota de rum, doce	10
	Valerato de etila	Forte, fruta, maçã	1,5 – 5,0
	Octanoato de etila	Fruta, doce	15
	Dodecanoato de etila	Gordura, óleo, floral	2000

Fonte: Pinheiro e Pastore (2003), citado por Simões (2008).

Young et al. (1996) identificaram na maçã Royal Gala 30 compostos voláteis aromáticos, e Mattheis et al. (1998) encontraram na maçã intacta de cultivar Gala 20 ésteres voláteis, entretanto somente uma pequena parte destes compostos tem efeito na qualidade sensorial aromática da fruta. Em outros trabalhos realizados com a cultivar Gala, foi verificado que os compostos majoritários desta cultivar são butanoato de etila, acetato de butila, acetato de 2-metil-butila, butanol, hexanoato de etila e hexanol (YOUNG et al., 1999).

3.2 FERMENTADO DE MAÇÃ E SIDRA

A sidra pode ser definida como uma bebida frisanter de baixo grau alcoólico, obtida pela extração do suco de maçãs através de prensagem mecânica, seguida por dois processos microbiológicos de grande importância: a fermentação alcoólica e a conversão malolática (LAPLACE et al., 2001).

Durante a conversão de açúcar a etanol na produção de bebidas fermentadas, as leveduras também produzem compostos minoritários que definem o aroma e as propriedades sensoriais da bebida. Estes incluem álcoois superiores, ésteres, compostos carbonílicos, ácidos graxos voláteis e compostos sulfúricos, são derivados do metabolismo de açúcares e aminoácidos e suas produções são espécie e cepas dependentes (ROMANO et al., 2003; SWIEGERS et al., 2005).

Mesmo em pequenas concentrações, os ésteres, metabólitos secundários de bebidas fermentadas, são efetivos para a qualidade sensorial final de bebidas. Existem dois grupos principais de ésteres com aromas ativos em bebidas fermentadas. O primeiro grupo contém os ésteres de acetato (no qual o grupo acetato provém do ácido acético e o grupo alcoxila provém

do etanol ou álcool complexo derivado do metabolismo de aminoácidos), como acetato de etila (aroma de solvente agradável), acetato de isoamila (banana) e acetato de etil-fenila (rosas e mel). O segundo grupo são os ésteres de etila (no qual o grupo alcoxila provém do etanol e o grupo acila provém de ácidos graxos de cadeia média) e incluem hexanoato de etila (anis e maçã), octanoato de etila (maçã) e decanoato de etila (floral). Destes dois, o grupo dos acetatos é o que recebe mais atenção, não porque são mais importantes, mas porque são produzidos em níveis muito maiores e mais fáceis de serem quantificados (SAERENS et al., 2008).

3.2.1 Processamento do fermentado de maçã e sidra

A fermentação de suco de maçã visando à obtenção de uma bebida alcoólica já era conhecida no Mediterrâneo Oriental há mais de 2000 anos. Este processo é o resultado da ação de uma microbiota complexa sobre um substrato também complexo (LE QUERE e DRILLEAU, 1993).

No Brasil, as frutas destinadas ao processamento da sidra são provenientes do descarte comercial, frutas que não apresentaram aspectos desejáveis para o consumo *in natura* no momento da colheita ou após um período de armazenamento em câmaras frias. Existem diferenças em inúmeras etapas do processo que tornam a sidra brasileira uma bebida de baixa qualidade, ao contrário da francesa que é considerada um produto nobre (Figura 1).

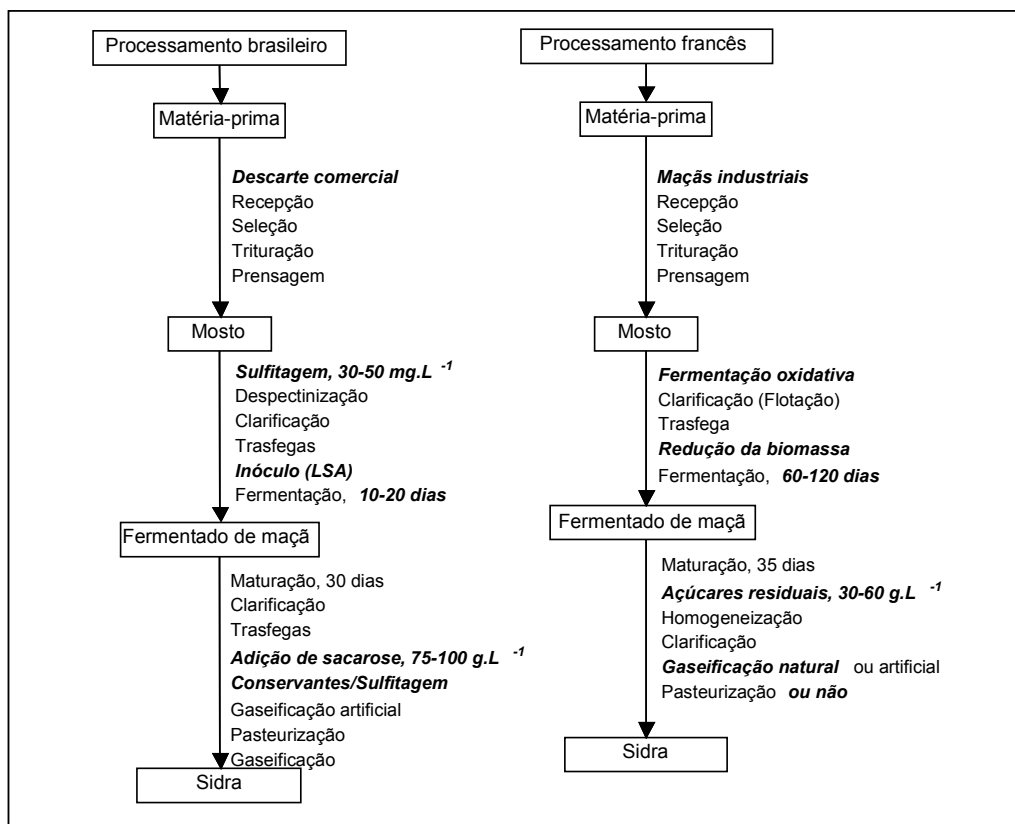


Figura 1. Diferenças destacadas em negrito entre o processamento do fermentado brasileiro e francês de maçã.
Fonte: Nogueira e Wosiacki (2010).

No Brasil este produto é suave, pouco aromático e com baixa acidez, por ser produzido essencialmente de maçãs de mesa consideradas não adequadas para o consumo *in natura*. Poucos trabalhos vêm sendo realizados sobre o processamento e a qualidade da sidra no Brasil (NOGUEIRA et al., 2007).

O processo de fabricação brasileiro inicia com a seleção para eliminação das maçãs contaminadas ou deterioradas, sendo que em seguida as frutas são lavadas com água potável por aspersão ou imersão e, posteriormente, trituradas em moinhos de martelos. Então é realizada a operação de prensagem em prensas de pistão ou de esteiras e na sequência o suco recebe adição de enzimas pectinolíticas nas dosagens recomendadas pelos fabricantes, além da primeira sulfitagem com 30-50 mg.L⁻¹ de anidrido sulfuroso. Após despectinização e precipitação (24 horas) o mosto é trasfegado e a borra encaminhada para nova prensagem (filtro prensa). Na sequência o mosto recebe o inóculo sob a forma de levedura seca ativa (LSA) a uma concentração de 20 g.hL⁻¹. A fermentação alcoólica ocorre em dornas metálicas à temperatura ambiente durante os meses de fevereiro, março e abril. Ao final do processo de fermentação, com a transformação total dos açúcares em etanol e CO₂, o fermentado de maçã

é filtrado e transferido para outros tanques, onde permanece durante o período de maturação. Após esse período é adicionada a sacarose (75 - 100 g.L⁻¹) e, se necessário, é corrigida a acidez com a adição de ácido láctico, e adicionados os conservantes metabissulfito de potássio (20 a 80 mg.L⁻¹ de SO₂ livre) e sorbato de potássio na concentração permitida pela legislação (WOSIACKI et al., 1997).

O cenário europeu de produção é diferente: a bebida é produzida com maçãs geneticamente selecionadas e exclusivas, com elevados teores de fenóis e ácidos, apresenta uma fermentação alcoólica lenta, obtida pela redução de biomassa, que promove a formação de aromas “frutados e/ou florais” por leveduras não-convencionais, muito desejados e procurados pelos consumidores. Além disso, a fermentação não é conduzida até a exaustão, permanecendo açúcares residuais da própria fruta na bebida.

De acordo com Nogueira et al. (2003), a disponibilidade de maçãs com baixo valor comercial aumenta a cada ano com o crescimento da produção nacional. Isso leva o setor agroindustrial a se preocupar com a agregação de valor econômico visando à obtenção de produtos nobres como sucos e bebidas fermentadas. Autores indicam a necessidade de aprimoramento da qualidade da sidra para apresentar perfil definido e aceitação pelo consumidor brasileiro, podendo estender seu consumo durante todo o ano e não mais apenas nos finais de ano, e almejar a comercialização internacional, já que a quantidade de matéria-prima disponibilizada ao setor industrial é significativa.

As principais espécies de leveduras encontradas na fermentação da sidra francesa foram *Brettanomyces* sp., *Hanseniaspora valbyensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* entre as 500 cepas de leveduras isoladas do mosto e de equipamentos na produção artesanal e industrial de sidra na região da Bretanha e Normandia (LE QUERE e DRILLEAU, 1993; MICHEL, 1988). Beech (1993) confirmou esses resultados analisando a microbiota natural dos mostos de maçãs na Inglaterra e observou a presença de *Saccharomyces cerevisiae* e espécies como *Pichia*, *Torulopsis*, *Hansenula* e *Kloeckera apiculata*, que é uma variação da *Hanseniaspora valbyensis*.

3.2.1.1 Fase oxidativa

A fase oxidativa, realizada por leveduras de baixa ação fermentativa, denominadas de não-convencionais, não-*Saccharomyces* ou oxidativas, pode durar de 5 a 15 dias após a preparação do mosto e corresponde de forma geral ao consumo de cerca de 10 g.L⁻¹ de açúcares e 30 a 40 mg.L⁻¹ de nitrogênio. As leveduras encontradas nesta fase dominam o meio de fermentação por alguns dias antes de serem suplantadas pelas leveduras fermentativas,

Saccharomyces cerevisiae var. *uvarum* e, às vezes, *S. cerevisiae* (LE QUERE e DRILLEAU, 1998; MICHEL, 1988; NOGUEIRA, 2003).

Esta atividade inicial das leveduras oxidativas é considerada importante para o perfil aromático dos vinhos, devido ao fato destas serem responsáveis por diferentes reações enzimáticas desenvolvendo ampla quantidade de produtos finais voláteis e não voláteis. Ao contrário de *S. cerevisiae*, leveduras não-*Saccharomyces* produzem e secretam muitas enzimas (esterases, β -glucosidases, lipases, proteases, entre outras) que interagem com os precursores de aromas presentes na uva para produzir compostos ativos de aroma nos vinhos (CHAROENCHAI et al., 1997; JOLLY et al., 2006; HERNÁNDEZ-ORTE et al., 2008; ROMANO et al., 2003; CIANI et al., 2006; DOMÍZIO et al., 2007).

O tempo de ação das cepas oxidativas varia em função da espécie do microrganismo, da população inicial e da disponibilidade de oxigênio durante a fase de crescimento. A fermentação da sidra realizada somente com leveduras fermentativas proporciona resultados sensoriais como aroma neutro e/ou pouco típico, porém com a presença da cepa *Hanseniaspora* aparecem notas como “sidra frutada”, ou seja, com aroma de frutas, e ésteres como acetato de etila e fenil-etila. Entretanto, algumas vezes, a fermentação alcoólica é realizada unicamente sob a influência de leveduras oxidativas (apiculadas) o que resulta em uma importante produção de acetato de etila, podendo ser prejudicial ao aroma do produto se a sua concentração estiver entre 150 – 200 mg.L⁻¹. Os microrganismos oxidativos e leveduras fracamente fermentativas podem ser completamente inibidos pela adição de anidrido sulfuroso, prática corrente em vários países (DRILLEAU, 1990; CIANI et al., 2006).

As leveduras oxidativas não são tolerantes ao etanol, ao contrário da *S. cerevisiae*, e algumas do gênero *Torulaspora* e *Kloeckera* são menos tolerantes a condições de baixa viabilidade de oxigênio (HANSEN et al., 2001; TAHÍA et al., 1983).

Pesquisas com microbiologia de vinhos têm indicado que as leveduras oxidativas mais comumente encontradas em mostos em fermentação são as dos gêneros: *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Cândida*, *Phichia*, *Schizosaccharomyce*, *Torulaspora*, *Debaromyces*, *Bretanomyces* (*Dekkera*), *Kluyveromyces*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*. Estas são capazes de produzir compostos aromáticos e afetar positivamente a qualidade do produto final (ROJAS et al., 2003; ROMANO et al., 2003; ZOHRE e ERTEN, 2002; XUFRE et al., 2006).

No estudo de Romancino (2008) analisando diferentes safras de uva da região da Sicília (Itália) foram encontradas 2575 colônias de leveduras. Apenas 11 espécies foram identificadas correspondendo a *C. stellata*, *H. guilliermondii*, *H. osmophila*, *H. uvarum*, *I. terricola*, *K. thermotolerans*, *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, *T. delbueckii*, *Zygoascus*

hellenicus e *Z. bailii*. As populações aumentadas de *S. cerevisiae* foram atribuídas à presença de danos nas bagas das uvas. Neste estudo, a levedura *H. guilliermondii* estava presente em maiores quantidades do que *H. uvarum*. A espécie *H. guilliermondii* é a predominante do gênero *Hanseniaspora* em áreas de clima quente (CASTELLI, 1954; ZAMBONELLI, 1998).

No estudo realizado por Chavan et al. (2008) analisando mostos de diferentes cultivares de uva para produção de vinho, encontraram predominantemente a levedura *Hanseniaspora guilliermondii*, enquanto que a *S. cerevisiae* foi observada em menores quantidades. A cepa de *H. guilliermondii* é capaz de consumir maiores quantidades de açúcar (127 g.L^{-1}) do que cepas de *H. uvarum* (105 g.L^{-1}). Durante a fermentação *H. uvarum* consome de maneira similar os açúcares glucose e frutose, entretanto *H. guilliermondii* apresenta um comportamento diferente (frutofílico), consumindo frutose mais rapidamente que glucose. O conteúdo máximo de etanol encontrado neste trabalho foi de 5,4% para *H. uvarum* e 7,2% para *H. guilliermondii* (MOREIRA et al., 2008).

Com relação aos metabólitos de fermentação, normalmente é descrito que os ésteres são os melhores contribuintes para características de odor frutado no *bouquet* do vinho. Ésteres de acetato como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de 2-fenil-etila são conhecidos como importantes compostos do *flavour* dos vinhos e outras bebidas alcoólicas, e podem ser formados em concentrações relativamente altas por leveduras oxidativas, como as do gênero *Hanseniaspora*. Estas leveduras são as melhores produtoras de ésteres de acetato, principalmente acetato de 2-fenil-etila, quando comparada com os gêneros *Cândida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (RAPP e MANDERY, 1986; ROJAS et al., 2003; CIANI et al., 2006; VIANA et al., 2008).

Culturas puras de *H. uvarum* e *H. guilliermondii* levam a um conteúdo total de álcoois superiores de 143 mg.L^{-1} e 257 mg.L^{-1} , respectivamente. Estes valores são significativamente menores do que os obtidos em vinhos produzidos a partir de culturas puras de *S. cerevisiae* (574 mg.L^{-1}). Leveduras apiculadas produzem concentrações menores de 3-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. Estas concentrações menores podem ser positivas ao produto final, pois alguns estudos concluíram que em concentrações menores de 300 mg.L^{-1} os álcoois superiores contribuem positivamente para o aroma do produto, e o inverso ocorre em concentrações acima de 400 mg.L^{-1} (MOREIRA et al., 2008; RAPP e MANDERY, 1986).

H. uvarum possui características enzimáticas interessantes à produção de vinhos, devido aos seus efeitos tecnológicos e contribuição ao aroma. Pectinases, proteases e glucosidases são algumas das enzimas secretadas por *H. uvarum* que melhoram a clarificação, estabilização e o aroma dos vinhos (CIANI et al., 2006).

Moreira et al. (2005) analisaram a produção de álcoois, ésteres e compostos sulfúricos pesados em culturas puras e mistas com leveduras apiculadas em vinhos. *H. guilliermondii* produziu altos níveis de acetato de 2-fenil-etila, 2-fenil-etanol e ácido acético. Concentrações de compostos sulfúricos pesados foram mais altas em culturas puras de *H. uvarum* do que em culturas puras de *Saccharomyces*.

Muitos fatores afetam a população das leveduras oxidativas presentes na flora natural das frutas, como: chuva, temperatura, tipo de solo, maturidade dos frutos, danos causados pelos pássaros, inseticidas e fungicidas, e localização geográfica (COMBINA et al., 2005). A temperatura de fermentação é um fator importante da vinificação que afeta a taxa de crescimento das leveduras e da fermentação alcoólica. O número de diferentes espécies, assim como, a resistência delas durante a fermentação alcoólica, é condicionada tanto pela temperatura do mosto quanto pela temperatura de fermentação (ambiente). Estas alterações determinam a qualidade química e organoléptica do vinho (FLEET e HEARD, 1993).

No trabalho realizado por Mendoza et al. (2008), descobriu-se que determinadas cepas de leveduras oxidativas têm seu crescimento máximo a uma temperatura de fermentação de 15°C. Nestes ensaios a população máxima destas leveduras foi alcançada com 24 horas. Nesta mesma temperatura as leveduras demonstraram uma menor taxa de consumo de açúcares e, conseqüentemente uma menor produção de etanol.

Ciani et al. (2006), analisando fermentação oxidativa, verificaram que as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam uma cinética de fermentação reduzida quando comparadas com cepas fermentativas, ou seja, ocasionam uma fermentação mais lenta e menor teor de etanol.

3.2.1.2 Fase fermentativa

No início da fase fermentativa, as leveduras oxidativas são suplantadas pelas cepas fermentativas. Este fenômeno pode estar associado ao mecanismo de contato célula-célula resultando em maiores concentrações de *S. cerevisiae*. A fermentação alcoólica acontece, quase sempre, sob ação da microbiota selvagem presente na fruta e material de processamento, entretanto é possível seu desenvolvimento pela adição de levedura seca-ativa disponível ao setor agroindustrial (NOGUEIRA, 2003; NISSEN e ARNEBORG, 2003; NISSEN et al., 2003).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* apresentam crescimento durante a fase oxidativa com população inicial de aproximadamente $6,0 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, estabilizando sua população após um consumo de 10 a 15 g.L⁻¹ de açúcares e apresentando população máxima

de cerca de $1,0$ a $4,0 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹, onde a velocidade de fermentação atinge seu valor máximo (LE QUERE e DRILLEAU, 1998).

3.2.2 Fermentação mista e sequencial

Apesar de a fermentação com culturas puras de *S. cerevisiae* prover vantagens de facilidade de controle e fermentações homogêneas, a produção de vinhos com estas monoculturas puras resultam em falta de complexidade nos aromas e de novidade no produto final, o que é causado pela flora silvestre. A inclusão de leveduras oxidativas como parte de culturas mistas juntamente com *S. cerevisiae* para melhorar a qualidade dos vinhos tem sido sugerida como uma maneira de se aproveitar uma fermentação espontânea (LAMBRECHTS e PRETORIUS, 2000; ROMANO et al., 2003; JOLLY et al., 2003; ROJAS et al., 2003; CIANI et al., 2006).

A fermentação mista de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* (oxidativas) tem recebido muita atenção devido à sua habilidade de prover características individuais de *flavour* ao produto final, assim como representa um meio viável para melhoramento das características gerais de bebidas (XU et al., 2006; CIANI e COMOTINI, 2010).

As leveduras oxidativas têm sido associadas à alta produção de ácidos voláteis, acetato de etila, *off-flavours* e deterioração, mas o papel positivo que elas desempenham nas características organolépticas de vinhos tem sido destacado em numerosos estudos. Interações metabólicas entre leveduras não-*Saccharomyces* e *S. cerevisiae* durante a fermentação, podem interferir positivamente ou negativamente no crescimento e comportamento das espécies de leveduras. Um exemplo de interação positiva que ocorre é a relação entre o comportamento frutofílico das cepas não-*Saccharomyces* com o comportamento glucofílico das cepas *S. cerevisiae*. Em contrapartida, uma interação negativa pode ser causada pela produção de compostos que inibem a *S. cerevisiae*, como ácidos graxos de cadeia média (SPONHOLZ, 1993; FLEET, 2003; CIANI e PICCIOTTI, 1995; CIANI e FATICHENTI, 1999; BISSON, 1999).

O efeito da interação de levedura oxidativa e fermentativa na fermentação da sidra se mostrou eficiente na produção de aromas se for ajustado o tempo de inóculo das duas leveduras. A interação levedura-levedura influencia o crescimento das cepas, impactando na eficiência do processo e qualidade do produto final. A fermentação mista com tempos de inoculação corretamente ajustados resulta em uma melhor eficiência de conversão alcoólica (3,47%), com teores de açúcares residuais (3,88%) agradáveis para o produto final e tempo de fermentação viável para o processo (31 dias). As diferenças na fermentação de culturas puras

residem não apenas na conversão etanólica e redução de açúcares, mas também em uma melhor concentração de compostos voláteis majoritários produzidos por cada cepa individualmente na fermentação mista (XU et al., 2006).

No processo brasileiro a fermentação é rápida e total, ou seja, com consumo total de açúcares. Dessa forma, existe uma grande intensidade de aroma indesejável ao final da fermentação, uma vez que os microrganismos oxidativos haviam sido eliminados pela ação do SO₂ ou suplantados pelo inóculo de leveduras comerciais. O teor de compostos fenólicos diminui devido às associações com a parede celular da levedura e em função das reações de oxidação, o que resulta em um produto com pouca cor e adstringência (RENARD et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2004).

Vinhos feitos com culturas puras ou mistas de *S. cerevisiae* apresentam concentrações de 2-fenil-etanol entre 43,1 e 58,1 mg.L⁻¹, concentrações menores foram observadas em vinhos produzidos com culturas puras de leveduras apiculadas. O feniletanol, assim como seu acetato, possui um papel positivo no aroma do vinho trazendo notas frutais e florais (MOREIRA et al., 2008).

O gênero *Hanseniaspora* tem sido descrito como a levedura oxidativa mais presente em mostos de uva no início da fermentação, e por muito tempo tem sido reconhecido por ter uma influência negativa na qualidade do vinho, podendo causar deterioração ao produzir altas quantidades de ácido acético, acetoína e acetato de etila. Mas quando são usadas culturas mistas de *Hanseniaspora* com *S. cerevisiae* esta produção é consideravelmente reduzida, e substâncias aromáticas, como baixos níveis de acetato de etila e acetato de 2-fenil-etila, contribuem positivamente para a qualidade geral do *flavour* dos vinhos (PRETORIUS, 2000; ROJAS et al., 2003; ROMANO et al., 2003; CIANI et al., 2006).

Como um resultado de fermentações mistas, Xu et al. (2006) encontraram que as cepas de *Hanseniaspora valbyensis* produzem altos teores de etil-ésteres e as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produzem altas quantidades de álcoois, e o resultado final destes teores é uma contribuição positiva no produto final. Os principais ésteres formados são acetato de etila e acetato de fenil-etila (considerados os maiores impactantes no aroma); e os álcoois são álcool isoamílico e álcool isobutílico. Dentro do gênero *Hanseniaspora*, a espécie *H. uvarum* produz acetato de etila nos níveis positivos ao aroma, mas diferentemente de outras leveduras, produz acetoína em ensaios de multi-culturas. Esta espécie não causa aumento na acidez volátil em culturas mistas, e tanto em fermentações sequenciais quanto mistas não mantém açúcares residuais e utiliza menores teores de nitrogênio, indicando com isso ausência de competição (BILBAO, 1997; ROJAS, 2003; CIANI et al., 2006).

Segundo Ciani et al. (2006), fermentações sequenciais de *Hanseniaspora uvarum*, *Torulaspora delbrueckii* e *Kluyveromyces thermotolerans* com *Saccharomyces cerevisiae* realizadas em mostos de uvas com altos teores de açúcar podem apresentar um comportamento de fermentação e um perfil analítico de vinho comparável ou melhor do que o exibido pela cultura pura de *S. cerevisiae*. Todas as cepas não-*Saccharomyces* revelaram uma cinética de fermentação reduzida quando comparadas à cultura pura de *S. cerevisiae*. Fermentações sequenciais mantêm uma maior quantidade de células (persistem mais no meio) do que as fermentações mistas (células inoculadas juntas).

As diferentes temperaturas de crescimento necessárias para leveduras fermentativas e não-fermentativas afetam suas contribuições de ácidos, açúcares e etil-acetatos na sidra. A habilidade de formar ésteres de acetato é de fato considerada como um critério para uma seleção adequada das cepas, pois estes compostos são majoritários na contribuição aromática do produto final (BILBAO, 1997).

No trabalho realizado por Vidrih e Hribar (1999) sobre a formação de compostos voláteis em fermentado de maçã foi detectado que a maioria dos álcoois superiores analisados tem origem na própria fruta, com exceção apenas dos álcoois isoamílico e 2-fenil-etanol, os quais foram metabolizados predominantemente durante a fermentação como um resultado da atividade das leveduras. O 2-fenil-etanol foi sintetizado principalmente durante a fase inicial de fermentação, sendo que a maceração provocou um aumento deste composto. Este fato também ocorreu com o isobutanol, e a influência da maceração é explicada pela difusão do O₂ no mosto.

Na Tabela 2 podem ser observados os compostos voláteis mais encontrados em fermentado de maçã e sidra contribuintes para o aroma do produto.

Tabela 2. Compostos voláteis majoritários do fermentado de maçã e sidra.

<i>Composto aromático</i>	<i>Descrição</i>
Álcoois isoamílicos	Frutado
Etanal	Pungente, alcoólico
2-fenil-etanol	Rosas, mel
Hexanol	-
Álcool isobutílico	Fermentado
Acetato de etila	Abacaxi
Acetato de 2-fenil-etila	Rosas, floral
Acetato de hexila	Frutado, floral
Acetato de isoamila	Frutado
Butirato de etila	Abacaxi
Lactato de etila	-
Octanoato de etila	Frutado, doce
Succinato de dietila	-
Decanoato de etila	Frutado, uva
Dodecanoato de etila	Gordura, óleo, floral
Ácido butírico	Ranço, queijo
Ácido octanóico	Doce, queijo

Fonte: Xu et al. (2007); Madrera et al. (2008); Xu et al. (2006); Janzantti et al. (2003).

O acetaldeído é um dos compostos voláteis mais importantes da produção de vinhos, normalmente conhecido como um subproduto da fermentação alcoólica e seu conteúdo pode ser influenciado pela cepa utilizada. Em concentrações menores o acetaldeído contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações ($>200 \text{ mg.L}^{-1}$) este composto influencia negativamente o aroma do vinho (GIL et al., 2006).

3.2.3 A formação de aromas secundários: metabolismo das leveduras

As leveduras são microrganismos quimiorganotróficos, derivam sua energia química na forma de ATP, da degradação de compostos orgânicos. A maioria das leveduras utiliza o açúcar (glucose) como fonte de carbono e energia preferido (Figura 2) (WALKER, 1998).

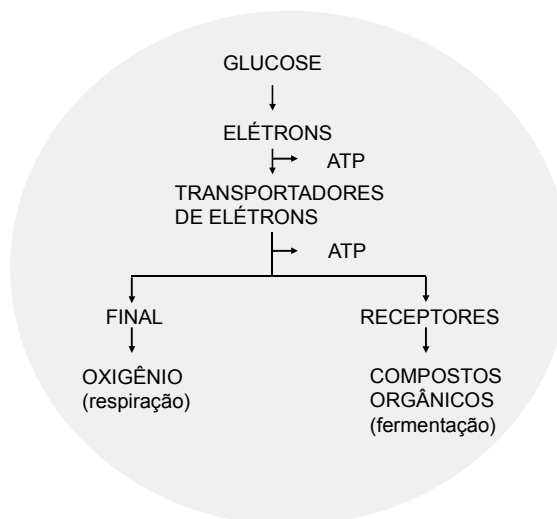


Figura 2. Esquema simplificado da geração de energia nas leveduras a partir de glucose.
Adaptado de Walker (1998).

A sequência de reações catalizadas por enzimas, que oxidativamente convertem glucose a ácido pirúvico no citoplasma das células é conhecido como glicólise (Figura 3).

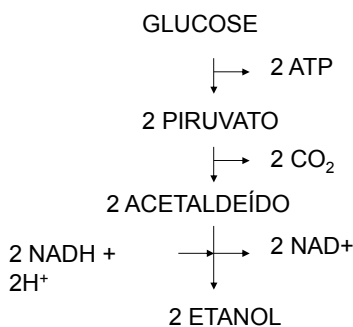


Figura 3. Sequência de reações que convertem glucose a etanol.
Adaptado de Walker (1998).

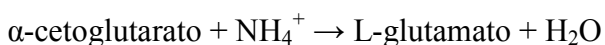
Durante a fermentação alcoólica as leveduras sintetizam um grande número de compostos aromáticos. A maior parte destes compostos sintetizados consistem de álcoois superiores, ácidos graxos e ésteres. Estes produtos dependem da cepa de levedura usada e das condições da cultura, e são muito importantes no desenvolvimento do *flavour* de bebidas como cerveja, vinho e *whisky*. Exemplo: álcoois (álcool isoamílico), ésteres (acetato de etila), ácidos orgânicos (citrato, succinato, acetato) e aldeídos (acetaldeído).

Muitos fatores contribuem para a síntese de compostos aromáticos pelas leveduras, que normalmente incluem alterações nas condições de fermentação como temperatura, pH, aeração, agitação e a natureza e concentração de substratos utilizados. Odores e aromas derivados de leveduras são produtos primários na aplicação de leveduras para bebidas alcoólicas e não-alcoólicas. Pesquisas recentes indicam que a complexidade dos aromas em bebidas alcoólicas envolve mais de 400 diferentes compostos químicos que incluem ésteres, ácidos, compostos carbonílicos, fenóis, hidrocarbonetos, compostos nitrogenados, compostos sulfúricos, lactonas, açúcares e outros (BERRY, 1989; DICKINSON, 2001; GARAFOLLO 1992; SUOMALAINEN e LEHTONEN 1978, 1979).

Metabolismo do nitrogênio

Leveduras são capazes de usar fontes de nitrogênio inorgânico e orgânico para incorporação estrutural e funcional da célula. No meio de fermentação industrial o nitrogênio disponível está na forma de complexas misturas de aminoácidos e sais de amônio. E muitas vezes o meio é suplementado com formas inorgânicas de nitrogênio, como sulfato de amônio (WALKER, 1998).

Os íons de amônio, suplementados no meio ou derivados do catabolismo de outros compostos nitrogenados, são transportados e rapidamente assimilados pela levedura. Estes íons podem também ser diretamente assimilados por alguns aminoácidos, mais comumente pelo glutamato ou pela glutamina. Estes compostos são precursores na síntese de outros aminoácidos. Esta assimilação dos íons amônio pelo α -cetoglutarato ocorre pela ação de glutamato desidrogenase NADP-dependente:



O catabolismo de aminoácidos, pertinente em fermentações industriais, ocorre pela via Ehrlich. Isto é, um processo de desaminação e descarboxilação que resultam na formação de álcoois superiores como isobutanol e isopentanol a partir dos aminoácidos leucina, isoleucina,

valina e treonina. Estes álcoois, que são constituintes do *flavour* em bebidas fermentadas, são formados pela via Ehrlich quando tem altos teores de aminoácidos disponíveis no meio, ou pela via de biossíntese quando são deficientes (OSHITA et al., 1995; LARGE, 1986).

Villatoro et al. (2008) relataram que os ácidos graxos são os maiores precursores dos voláteis aromáticos na maioria das frutas, os caminhos envolvidos incluem β -oxidação e sistemas via enzima lipoxigenase, levando à formação de aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres.

Riberau – Gayon et al. (1975) reportaram que 10 % do total de álcoois superiores é sintetizado a partir de aminoácidos correspondentes, 65 % de outros aminoácidos e 25 % de açúcares. *Saccharomyces cerevisiae* produz somente álcool isoamílico a partir do aminoácido isoleucina, às vezes produz álcool isoamílico e n-propanol a partir do aminoácido treonina (REAZIN et al., 1973).

São fatores que afetam o teor de álcoois superiores em bebidas fermentadas: tipo de clarificação usada no processamento do suco (espontânea ou enzimática), teor de nitrogênio total do mosto em fermentação, cepas de leveduras empregadas durante fermentação, temperatura de fermentação e pressão parcial do CO₂ (OUGH e BELL, 1980; GIUDICI e KUNKEE, 1994; KUNKEE e VILAS, 1994; LEGUERINEL et al., 1989; RENGGER et al., 1992).

3.2.4 Efeito da adição de dióxido de enxofre (SO₂) sobre os compostos voláteis do fermentado de maçã

O dióxido de enxofre é usado na produção de fermentado de maçã como um antioxidante. Previne escurecimento e algumas deteriorações, e também age como um inibidor de muitos microrganismos (BEECH et al., 1993).

Em pesquisas anteriores constatou-se que apenas uma quantidade mínima de SO₂ deveria ser usada, sendo que esta quantidade necessária depende do pH do suco e da concentração de compostos com pontes dissulfeto presentes. O SO₂ é tóxico para a maioria das leveduras oxidativas, enquanto que as cepas fermentativas são resistentes. A concentração total deste composto no suco de uva durante a fermentação consiste em formas ligadas e formas livres. A forma livre consiste na maioria em ânion bissulfito e em pequena proporção na forma molecular. A forma molecular não dissociada é importante como agente antimicrobiano (BENDA, 1982; ROMANO e SUZZI, 1993; WEDZICHA, 1984).

A quantidade permitida legalmente pela *Food and Drug Administration* (FDA) é de 200 mg.L⁻¹ de SO₂ total (BEECH et al., 1977). Segundo este autor, as concentrações a serem adicionadas podem ser:

- pH 3,0 a 3,3 = 75 mg.L⁻¹;
- pH 3,3 a 3,5 = 100 mg.L⁻¹;
- pH 3,5 a 3,8 = 150 mg.L⁻¹.

Com o objetivo de eliminar ou reduzir o uso do SO₂ existem alguns métodos alternativos para melhorar a estabilidade microbiológica: atmosfera controlada com N₂ e uso de ácido ascórbico. A ação deste composto ainda não é completamente compreendida, mas sabe-se que reage diretamente com a tiamina, reduzindo os níveis desta vitamina aos microrganismos. Sabe-se também que age como um inibidor das bactérias lácticas, afetando a fermentação malolática (HERRERO et al., 2003; BISSON, 1999).

Os compostos de enxofre nos vinhos têm um papel importante no sabor. Eles contribuem principalmente com aromas indesejáveis mesmo em baixas concentrações, estando relacionados com os principais defeitos organolépticos dos vinhos. O aroma destes compostos pode ser descrito como de batata, couve-flor, repolho, alho, etc, que levam a um efeito negativo no aroma do vinho (BELOQUI e BERTRAND, 1995; DARRIET et al., 1999; MESTRES et al., 2000). Segundo Herrero et al. (2003), o SO₂ não exerce influência significativa nos compostos voláteis de fermentados. O acetato de etila e 2-metil-1-propanol não recebem influência nenhuma com a adição, já os compostos 1-propanol e álcoois 2- e 3-metil-butilícos são levemente afetados.

3.2.5 Impacto de processos térmicos e não térmicos

O processamento térmico é a técnica mais comumente utilizada para reduzir deterioração e microrganismos patogênicos, assim como inativar enzimas em sucos. Infelizmente, a pasteurização pode causar mudanças indesejáveis na qualidade dos sucos, como perda de cor e aromas, e redução da qualidade nutricional (CHOI E NIELSEN, 2005; ROUSEFF et al., 2001; VIKRAM et al., 2005).

Processos não térmicos alternativos como campo elétrico pulsado e ultravioleta têm sido pesquisados quanto a sua eficácia em aumentar a vida de prateleira dos alimentos e realçar a segurança destes, minimizando perdas de qualidade e nutricionais (CSERHALMI et al., 2006; DONAHUE et al., 2004).

4. REFERÊNCIAS

- ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>> Acesso em: 10 fev, 2011.
- BALDWIN, E. A.; SCOTT, J. W.; SHEWMAKER, C. H. K.; SCHUCH, W. Flavour trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **Horticultural Science**, v. 35, p. 1013–1021. 2000.
- BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; MARQUES, M. O. M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 122-129. 2002.
- BEECH, F. W.; ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. Yeast in cider-making. **Yeast Technology**, Academic Press: London, U.K, v. 5, p. 169-214. 1993.
- BEECH, F. W.; CARR, J. G.; ROSE, A. H. Cider and Perry. **Alcoholic Beverages**. Ed.; Academic Press: London, U.K, v. I, p. 139-313. 1977.
- BELOQUI, A.; BERTRAND, A. Study of sulfur compounds in wine: preliminary results. **Italian Journal of Food Science**, v. 3, p. 279–288. 1995.
- BENDA, I. Wine and brandy. In: REED, G. **Prescott and Dunn's industrial microbiology**. 4. ed. Westport: AVI Publishing Co., 1982. p 293–402.
- BERRY, D. R. Manipulation of flavor production by yeast: physiological and genetic approaches. In: PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. **Distilled beverage flavour**. Chichester/UK: Harwood, 1989. p. 299–307.
- BERTITER, J. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of the apple fruit. **Journal of Plant Physiology**, v. 121, p. 331-341. 1985.
- BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**. v. 24, p. 37-39. 1997.
- BISSON, L. F. Stuck and sluggish fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 107-119. 1999.

CASTELLI, T. Les agents de la fermentation vinaire. **Archives of Microbiology**, v. 20, p. 323–342. 1954.

CHAROENCHAI, C.; FLEE, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, p. 2–8. 1997.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNIC, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, p. 1–8. 2008.

CHOI, L. H.; NIELSEN, S. S. The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. **Journal of Food Quality**, v. 28, p. 13–29. 2005.

CIANI, M.; PICCIOTTI, G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1247–1250. 1995.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. **Letter of Applied Microbiology**, v. 28, p. 203–206. 1999.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245. 2006.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annual Microbiology**. 2010.

COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Yeast associated to Malbec grapes berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1055–1061. 2005.

CSEHALMI, Z.; SASS-KISS, A.; TOTH-MARKUS, M.; LECHNER, N. Study of pulsed electric field treated citrus juices. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 7, p. 49–54. 2006.

DARRIET, P.; LAVIGNE-CRUEGE, V.; TOMINAGA, T. A Paradox: the Volatile Sulphur Compounds Responsible for both Defects and Qualities in Wines. **Vigne et Vin Publications International**, Bordeaux, France, v. 127. 1999.

DICKINSON, J. R. The formation of higher alcohols. In: SMART, K. A. **Brewing yeast fermentation performance**. 2. ed. Oxford/UK: Blackwell, 2001. p. 196–205.

DONAHUE, D. W.; CANITEZ, N.; BUSHWAY, A. A. UV inactivation of E-coli O157:H7 in apple cider: quality, sensory and shelf-life analysis. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 28, p. 368–387. 2004.

DRILLEAU, J. F. La fermentation en cidrerie: Quelques généralités et principes d'elaboration. **Pomme**, n. 21, p. 20-22. 1990.

DRILLEAU, J. F., Elaboration artisanale du cidre: Les généralités du schéma de principe. **Pomme**, v. 30, p. 29-30. 1993.

FERREIRA, V.; PET'KA, J.; AZNAR, M.; CACHO, J. Quantitative gas chromatography–olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. **Journal of Chromatography**, v. 1002, p. 169–178. 2003.

FLEET G. H.; HEARD, G. M. Yeast growth during fermentation in wine. In: FLEET, G.H. **Microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 27–54.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 11–22. 2003.

GARAFOLO, A. The ester synthesizing activity of yeast under different nutrient conditions. **Review of Viticulture and Enology**, v. 45, n. 3, p. 41–58. 1992.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 5-14. 1995.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos deMadrid” (Spain). **Analitical Chemical Acta**, v. 563, p. 145–153. 2006.

GIUDICI, P.; KUNKEE, R. E. The effect of nitrogen deficiency and sulphur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 1, p. 107 – 112. 1994.

HANSEN, E. H.; NISSEN, P.; SOMMER, P.; NIELSEN, J. C.; ARNEBORG, N. The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 541 – 547. 2001.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CERSOSIMO, M.; LOSCOS, N.; CACHO, J.; GARCIA-MORUNO, E.; FERREIRA, V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeast of different genera. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1064–1077. 2008.

HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3455–3459. 2003.

HULME, A. C.; RHODES, M. J. C. The Biochemistry of Fruits and their Products. In: ____ **Chapter 10**. 2. ed.; Academic Press: London, 1971.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523 – 528. 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, p. 63–69. 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 15–39. 2006.

KUNKEE, R. E.; VILAS, M. R. Toward an understanding of the relationship between yeast strain and flavour production during vinifications: flavour effects in vinifications of a nondistinct variety of grapes by several strains of wine yeast. **Viticultural and Enologica Sciences**, v. 49, p. 46 – 50. 1994.

LAPLACE, J. M. et al. 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**, London, v. 107, n. 4, p. 227-233. 2001.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeasts and its importance to wine aroma - a review. **South Africa Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97–129. 2000.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. **FEMS Yeast Research**, 2. ed, p. 1-34. 1986.

LE QUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Review of Enologues**, v. 88, p. 17-20. 1998.

LE QUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Fermentation of french cider, the process and yeast species. **Fermentation - Food, Drink and Waste Management, the Future**. Brittanica Atlantic Conference, England. 1993.

LEGUERINEL, I.; MAFART, P.; CLERET, J. J.; BURGEIOIS, C. Yeast strain and kinetic aspects of the formation of flavour components in cider. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, n. 6, p. 40 – 409. 1989.

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

MATTHEIS, J. P.; BUCHANAN, D. A.; FELLMAN, J. K. Volatile compounds emitted by ‘Gala’ Apples following dynamic atmosphere storage. **Journal American Society of Horticultural Science**, v. 123, p. 426-432. 1998.

MENDOZA, L. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; BRU, E.; FARIAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 229–237. 2008.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 569–581. 2000.

MICHEL, A. Production du cidre a la ferme. **Pomme**, v. 17, n. 9, p. 12. 1988.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 285–294. 2005.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 231–238. 2008.

NISSEN, P.; ARNEBORG, N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 5, p. 65–71. 2003.

NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by cell–cell contact-mediated mechanism. **FEMS Yeast Research**, v. 20, p. 331–341. 2003.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C. N.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 51, n. 5. 2007.

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

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 02, p. 274-280. 2003.

NOGUEIRA, A.; PHOLMAN, B. C.; WOSIACKI, G. Características de qualidade de maçãs. Avaliação físico-química e sensorial de 15 variedades. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 347-352. 2004.

OUGH, C. S.; BELL, A. A. Effects of nitrogen fertilization of greapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, n. 2, p. 122 – 123. 1980.

OSHITA, K. K. M.; UCHIDA, M.; ONO, M. Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using C-labelled amino acid. European Brewery Convention Proceedings. **25th Convention. Press at Oxford University Press**, Oxford, p. 387-394. 1995.

PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, p. 195-206. 2003.

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. **FEMS Yeast Research**, v. 16, p. 675–729. 2000.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884. 1986.

REAZIN, G.; SCALES, H.; ANDREASEN, A. Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentations of different types of grain mash. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, p. 50 – 54. 1973.

RENGER, R. S.; VAN HATEREN, S. H.; LUYBEN, K. C. A. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation: the effect of carbon dioxide pressure. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, n. 6, p. 509 – 513. 1992.

RENARD, C. et al. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 115-125. 2001.

RIBEREAU-GAYON, J. ; PEYNAUD, E. ; RIBEREAU-GAYON, P. ; SUDRAUD, P. *Traité d'oenologie*: **Sciences et techniques du vin**. Paris: Dunod. 1975.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181 – 188. 2003.

ROMANCINO, D. P.; DI MAIO, S.; MURIELLA, R.; OLIVA, D. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 2248–2254. 2008.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulfur dioxide and wine microorganism. In: FLEET, G.H. **Wine microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 373–393. 1993.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169–180. 2003.

ROUSEFF, R.; BAZEMORE, R.; GOODNER, K.; NAIM, M. GC-olfactometry with solid phase microextraction of aroma volatiles from heated and unheated orange juice. In: ROUSEFF, R. L.; CADWALLADER, R. K. **Headspace Analysis of Foods and Flavors**:

Theory and Practice - Advances in Experimental Medicine and Biology. 1. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. p. 488. p. 101-112.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 454–46. 2008.

SIMÕES, D. R. S. **Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã: suco, fermentado e sidra**. 2008, 174f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SPONHOLZ, W. Wine spoilage by microorganisms. In: FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 395–420.

SUOMALAINEN H.; LEHTONEN M. Yeast as a producer of aroma compounds. **Dechema Monogrofy**, v. 82, p. 207–220. 1978.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 85, n. 3, p. 149–156. 1979.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape Wine**, v. 11, p. 139–173. 2005.

TAHÍA, B.; LUCAS, D. C.; ANDRÉS, A.; JAIME, C.; CERDÁOLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. **Applied Enviroment Microbiology**, v. 45, p. 1429 – 1436. 1983.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, SBCTA, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59. 2000.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778– 785. 2008.

VIDRIH, R.; HRIBAR, J. Synthesis of higher alcohols during cider processing. **Food Chemistry**, v. 67, p. 287 – 294. 1999.

VIKRAM, V. B.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 31–40. 2005.

VILLATORO, C.; ALTISENT, R.; ECHEVERRÍA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L. ; LARA, I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of “Pink Lady” apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 286–295. 2008.

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

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

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 376–384. 2006.

YOUNG, H.; GILBERT, J. M.; MURRAY, S. H.; BALL, R. D. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 71, p. 329–336. 1996.

YOUNG, H.; ROSSITER, K.; WANG, M.; MILLER, M. Characterization of royal gala apple aroma using electronic nose technologys potential maturity indicator. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 47, p. 5173–5177. 1999.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and Biotechnology**. 1. ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 1998.

WEDZICHA, B. Chemistry of sulfur dioxide in foods. **Elsevier Applied Science**, London. 1984.

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

WOSIACKI, G. Apple varieties growing in subtropical areas: the situation in Paraná - Brazil. **Fruit Processing**, v. 5, p. 177-182. 2001.

WOSIACKI, G.; KAMICOGA, A. T. M.; NEVES, J. F. Características do suco clarificado de maçãs. **Alimentos e Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 37, p. 76-79. 1991.

ZAMBONELLI, C. Microbiologia e biotecnologia dei vini. Bologna: **Edagricole**. 1998.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 319 – 324. 2002.

CAPÍTULO II: Avaliação do efeito de leveduras não – *Saccharomyces* nos compostos voláteis do *headspace* de fermentado de maçã.

AValiação DO EFEITO DE LEVEDURAS NÃO – *Saccharomyces* NOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO *HEADSPACE* DE FERMENTADO DE MAÇÃ

EVALUATION OF THE EFFECT OF NON-*Saccharomyces* YEAST IN VOLATILE HEADSPACE OF APPLE WINE PROCESSING

RESUMO

A sidra brasileira consiste em um fermentado de maçã frisanter de baixo teor alcoólico, com cor pouco intensa e aromas, necessitando de correção do teor de açúcar final. O método francês de fabricação desta bebida valoriza a fermentação oxidativa natural, realizada pelas leveduras não-*Saccharomyces*, que contribuem com os compostos aromáticos, valorizando assim o produto final. Neste trabalho foram avaliadas duas cepas de leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* com relação à cinética, os atributos físico-químicos e evolução aromática durante a fermentação de mosto de maçã. Foi utilizado mosto de maçã da cv. Gala e as cepas foram repicadas antes do inóculo. Foi monitorado o crescimento das cepas, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação. Ambas as cepas apresentaram atividade fermentativa em mosto de maçã, porém os açúcares não foram totalmente consumidos. A técnica de *headspace* identificou poucos compostos, no entanto de excelente qualidade aromática. Desta forma, ambas as cepas apresentam atividade fermentativa em mosto de maçãs e podem ser usadas na elaboração de fermentados de maçãs.

Palavras-chaves: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, fermentação, compostos voláteis.

ABSTRACT

The Brazilian cider consists in an sparkling apple wine with low-alcohol content and a little color and scent, that requires correction in the final sugar content. The French method of this beverage fabrication values the natural oxidative fermentation, made by the yeast non-*Saccharomyces*, which contributes to the fruity and floral aromatics compounds adding value to the final product. In this work it was measured two types of oxidative yeast strains *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* in what concerns to kinetic, physical-chemical attributes and aromatic evolution during the apple must fermentation. It

was used apple juice from Gala and monitored the growth of the strains, the physico-chemical and kinetic aspects over 10 days of fermentation. Both strains showed fermentative activity, however the sugars were not completely consumed. The technique of headspace identify a few compounds, however excellent aromatic quality. Thus, both strains showed activity in fermenting apple must and can be used in the preparation of fermented apples.

Keywords: *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, fermentation, volatile compounds.

1. INTRODUÇÃO

Sidra, uma bebida frisanse obtida da fermentação alcoólica do mosto de maçãs, com baixo teor alcoólico, consiste em um dos principais produtos da indústria de processamento da maçã em países da Europa como a França, país que recebe o título de melhor produtor mundial. A diferença mais expressiva do produto francês está no fato de que os produtores deste país valorizam a fermentação oxidativa devido à grande contribuição desta etapa em termos de compostos aromáticos (NOGUEIRA et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2003).

A fase oxidativa, realizada por leveduras de baixa ação fermentativa, denominadas de não-convencionais, não-*Saccharomyces* ou oxidativas, pode durar de 5 a 15 dias após a preparação do mosto, quando dominam o meio de fermentação por alguns dias antes de serem suplantadas pelas leveduras fermentativas, *Saccharomyces cerevisiae* (NOGUEIRA, 2003).

Ciani et al. (2006), analisando fermentação oxidativa verificaram que as leveduras não-*Saccharomyces* apresentam uma cinética de fermentação reduzida quando comparadas com cepas fermentativas, ou seja, ocasionam uma fermentação mais lenta. Este fato resulta em um produto de melhor qualidade, devido à presença de açúcares residuais na bebida, manutenção e produção de compostos aromáticos e menor conteúdo alcoólico (NOGUEIRA et al., 2007).

Diversos trabalhos têm sido realizados em vinho, utilizando cepas não-*Saccharomyces*, do gênero *Hanseniaspora*, obtendo resultados que evidenciam uma melhora na qualidade aromática do produto (VIANA et al., 2009; MOREIRA et al., 2005; MOREIRA et al., 2008; XU et al., 2006; XUFRE et al., 2006). No entanto, faltam dados a esse respeito com relação à utilização destas cepas na fermentação do mosto de maçã, nas condições de processamento brasileiro, para tornar a Sidra mais aromática.

A levedura *Hanseniaspora* é considerada excelente produtora de ésteres, a maioria deles contribuintes para aromas frutais e florais nos vinhos. Entretanto o éster majoritário é o

acetato de etila, que em altas concentrações pode ser prejudicial ao aroma, dando notas de cola ou solvente. Outro resultado do excessivo crescimento de *Hanseniaspora* durante a fermentação dos vinhos é o aumento na acidez volátil como resultado da síntese de ácido acético e acetato de etila (CSOMA e SIPIKZKI, 2008).

A cepa de *Hanseniaspora guilliermondii* é capaz de consumir maiores quantidades de açúcar (127 g.L^{-1}) do que cepas de *H. uvarum* (105 g.L^{-1}). Durante a fermentação, *H. uvarum* consome de maneira similar os açúcares glucose e frutose, entretanto *H. guilliermondii* apresenta um comportamento diferente (frutofílico), consumindo frutose mais rapidamente que glucose. O conteúdo máximo de etanol encontrado neste trabalho foi de 5,4% para *H. uvarum* e 7,2% para *H. guilliermondii* (MOREIRA et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de leveduras não-convencionais na elaboração de fermentado de maçã nas condições de processamento brasileiras, com relação aos aspectos de cinética, parâmetros físico-químicos e compostos voláteis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg) obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

Os microrganismos utilizados foram: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*, doadas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina que depois de identificadas foram conservadas em tubos inclinados contendo *yeast malt agar* (YMA) à temperatura de $7-10^{\circ}\text{C}$. Os meios de cultura, reativos e padrões utilizados nas análises foram de pureza comprovada.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Processos

Processamento do mosto de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas mantendo-as submersas por 40 minutos em solução de bicarbonato de sódio a 6000 mg.L^{-1} e depois por 5 minutos a 5°C em solução de hipoclorito a 150 mg.L^{-1} . Depois de enxaguadas em água corrente foram trituradas em multiprocessador de alimentos (Processador Metvisa, Tipo MPA) e a massa ralada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que após superpostas, foram submetidos a uma pressão de $3,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase

(Pectinex Ultra SP, Novozymes do Brasil), a uma concentração de $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$ (120 minutos a $20\text{-}25^\circ\text{C}$) e, após sedimentação, trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro âmbar de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado (98°C / 30 min) (WOSIACKI et al., 1989).

Processamento do Fermentado de Maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL, esterilizados em autoclave (121°C / 15 min) (Figura 1). No mosto foi adicionado 0,01% do antibiótico cloranfenicol (99%, Fornecedor Henrifarma) para controle do crescimento bacteriano. As leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente $4,0 \times 10^6 \text{ ufc.mL}^{-1}$.

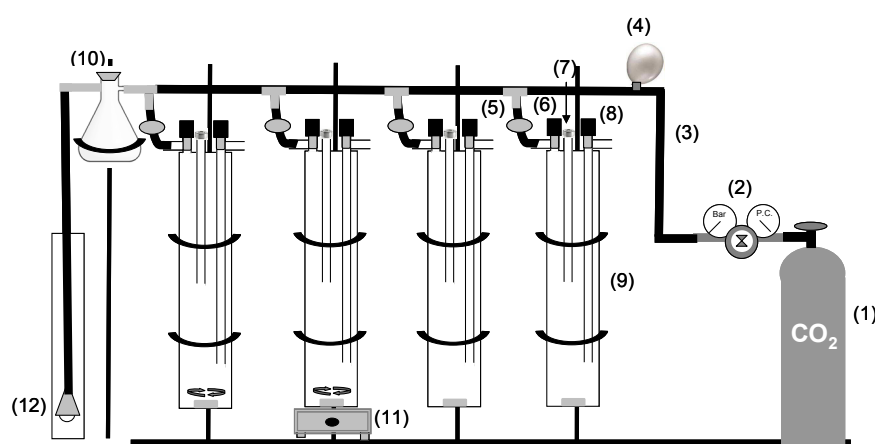


Figura 1. Esquema dos fermentadores em anaerobiose.

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de $0,20 \mu\text{m}$. (6): Tampa rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Válvula de rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quinis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

Para atingir a população das leveduras do gênero *Hanseniaspora* foi utilizada uma colônia isolada em YMA (Merck) e inoculada em 5 mL de Caldo GPBY - *glucose peptone broth yeast* (Merck) e depois de 24h de incubação a 25°C , esta cultura foi inoculada em 100 mL do mesmo caldo, passando pelo mesmo binômio tempo/temperatura atingindo a população de aproximadamente $10^{12} \text{ ufc.mL}^{-1}$. A partir desta população foi coletado um volume suficiente para obter a população desejada nos fermentadores. Ao final, o mosto em fermentação foi centrifugado a 10200 g e 5°C (Centrifuga Himac CR21GII) durante 20 minutos sendo em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado em baixa temperatura (-18°C).

Pontos de amostragem. Nos tempos de fermentação com 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias foram retirados 10 mL de amostras do fermentado para contagem de células; e nos dias 3, 5, 7 e 10 foram retirados 40 mL para análises físico-químicas.

Antes da coleta das amostras o fermentado de cada fermentador (Figura 1) era colocado sob agitação na velocidade 3 do agitador (11) durante 20 minutos. A seguir, a saída do fermentador destinada à coleta era desinfetada com álcool 70%, seguida de lavagem com 40 mL de água destilada para retirada do álcool residual, sempre com a válvula rosca (8) fechada.

Para a retirada das amostras, o manômetro (2) do cilindro de gás carbônico (1) era aberto para que o aumento da pressão interna de gás carbônico nos fermentadores proporcionasse condições para o fermentado subir no tubo de coleta ligado à válvula de rosca (8) que era aberta. Os primeiros 7 mL do fermentado correspondentes ao volume total do tubo interno do fermentador eram desprezados para afastar a possibilidade de coletar amostra não homogeneizada e permanente no interior de tal tubulação; a seguir realizava-se a coleta do volume acima mencionado em tubos estéreis.

A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado através da liberação de gás carbônico (CO₂), com pesagens dos fermentadores em balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante a temperatura de 20°C (BELY et al.1990; ROGER et al. 2002). A velocidade de fermentação foi obtida através da Equação 1:

$$V = \Delta \text{CO}_2 / \Delta t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = Velocidade de fermentação.

ΔCO_2 = Variação de produção de CO₂ corrigida por equação de gráfico.

Δt = Variação de tempo.

2.2.2 Experimentos

Verificação do efeito do SO₂ na cinética de fermentação oxidativa. As leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram inoculadas em fermentadores (erlenmeyers de 250 mL) simples com rolha e batoque numa população inicial de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 200 mL de mosto de maçã despectinizado, filtrado e pasteurizado, com as seguintes concentrações de SO₂: 0, 44, 150, 256 e 300 mg.L⁻¹. Foi monitorada a cinética de fermentação, nas diferentes concentrações de SO₂, por perda de massa dos

fermentadores. A avaliação pela perda de peso foi validada no trabalho descrito por Alberti et al. (2011).

Verificação do efeito da temperatura na cinética de fermentação oxidativa. As leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram inoculadas em fermentadores (erlenmeyers de 250 mL) simples com rolha e batoque numa população inicial de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 200 mL de mosto de maçã despectinizado, filtrado e pasteurizado, nas temperaturas de 10°, 15°, 20°, 25° e 30° C. Foi monitorada a cinética de fermentação, nas diferentes temperaturas, por perda de massa dos fermentadores.

Avaliação de diferentes leveduras oxidativas no perfil volátil de fermentados de maçãs. Para avaliar o perfil de compostos voláteis de leveduras oxidativas foram testadas cepas de *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*. A população inicial foi de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. Foram avaliados os compostos voláteis do fermentado final (10° dia de fermentação).

2.2.3 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis. A coleta foi realizada pelo método de *headspace*. O frasco para *headspace* de capacidade de 40 mL, contendo 20 mL do fermentado já centrifugado e congelado, foi colocado em banho-maria a 25°C, onde permaneceu por pelo menos 30 minutos. Antes de utilizar a seringa para cromatografia gasosa (Seringa microliter de 1000 µl – Hamilton) a mesma foi lavada por três vezes com ar e após agitação manual do frasco, o primeiro *headspace* coletado foi desprezado. Os compostos voláteis capturados na segunda coleta do *headspace* foram injetados diretamente no cromatógrafo gasoso. Após cada injeção a seringa foi lavada com ar por pelo menos 20 vezes.

Análise de compostos voláteis. Para identificação e quantificação dos compostos voláteis de sucos e fermentados de maçã foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso da marca Shimadzu modelo GC-17A equipado com detector por ionização de chama-FID e coluna Capilar (Dimensões: 0,32 mm x 1,0 µm x 30 m, Supelco) localizado na Universidade Federal do Paraná, departamento de Processos Biotecnológicos. O nitrogênio foi usado como gás carreador com fluxo na coluna de 1,5 mL.min⁻¹, a técnica de injeção foi split 1:5, a temperatura do forno foi programada para 40 °C (durante 5 minutos) com aumento de 20 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 230 °C. Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os picos obtidos dos padrões.

Os compostos padrões utilizados são de pureza comprovada e foram os seguintes: acetaldeído, etanol, laurato de etila, álcool isoamílico, acetato de etila, acetato de isopropila, acetato de propila, 2-metil-1-butanol, etil-isobutirato, acetato de isobutila, hexanona, etil-butirato, 2-hexanol, lactato de etila, acetato de butila, ácido butírico, 1-hexanol, acetato de isoamila, propionato de isobutila, 2-heptanona, etil-propionato, 2-octanona, 2-octanol, etil-3-hexanoato, acetato de hexila, 2-fenil-etanol, ácido caprílico, succinato de dietila, octanoato de etila e decanoato de etila.

2.2.4 Análises físico-químicas

Nos pontos 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram realizadas análises de **açúcares redutores** quantificados pelo método químico clássico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1 N (50 °C / 5 min) e **álcool** através do uso do ebuliômetro. A **acidez titulável total** foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,33 com fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g.100 mL⁻¹, e a **acidez volátil** foi calculada como ácido acético e expressa em g.100 mL⁻¹. O **nitrogênio total** foi determinado pelo método de Kjeldhal (BARON et al., 1977; IAL, 2008).

2.2.5 Análises microbiológicas

As amostras dos fermentados de maçã foram coletadas e preparadas para contagem microbiológica conforme recomendado por Silva et al. (2010). Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%, e semeadas em superfície, com alça de Drigalski, no meio seletivo para leveduras oxidativas YA-LYS (*Yeast agar* – lisina) (NOGUEIRA, 2003). As placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Para a contagem foram consideradas as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias típicas da levedura considerada, respeitando a diluição correspondente. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Ponta Grossa.

2.2.6 Análise sensorial

Nos produtos fermentados obtidos a partir da ação de leveduras oxidativas *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram realizadas análise olfativa de preferência pareada, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002), sendo as

planilhas de avaliação conforme Anexo A. O número de participantes para esta análise foi igual a 50 pessoas.

2.2.7 Análises estatísticas

Foram feitas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão descritos os valores de análises físico-químicas do mosto de maçã utilizado no processo. Pelo teor de nitrogênio, que na maçã estão na forma de aminoácidos, o mosto é classificado como alto teor ($>150 \text{ mg.L}^{-1}$), pois as leveduras *Hanseniaspora valbyensis* utilizam no seu crescimento teores entre $30\text{-}40 \text{ mg.L}^{-1}$ de nitrogênio (NOGUEIRA, 2003). Desta forma, esta concentração de nitrogênio total não caracteriza este nutriente como um fator limitante de crescimento de leveduras, porém o seu residual pode afetar a estabilidade microbiológica durante o armazenamento em bebidas que não receberam tratamento térmico, podendo ocorrer alterações na qualidade do produto final (LEA e DRILLEAU, 2003).

Pode ser observado (Tabela 1) que o mosto de maçã da cultivar Gala, utilizado como meio de fermentação por leveduras apiculadas, apresentou baixo teor de açúcares ($9,78 \text{ g.100mL}^{-1}$), quando comparado com os resultados de Wosiacki et al. (2008) que encontrou um valor médio para a mesma cultivar de $11,78 \pm 2,24 \text{ g.100mL}^{-1}$. Isto atesta que o grau de maturidade da fruta utilizada para o processamento do suco não estava no seu estágio completo de maturação o que pode afetar o rendimento de etanol. Com relação á acidez total, expressa em ácido málico, o resultado encontrado está próximo ao encontrado por Wosiacki et al. (2008) o que o classifica com baixa acidez (PAGANINI et al., 2004).

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala.

Parâmetros físico-químicos	Mosto cv. Gala	Leveduras oxidativas	
		<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>
Nitrogênio (mg.L^{-1})	$153,47 \pm 0,02$	$106,32 \pm 5,70^a$	$118,34 \pm 3,46^a$
AT* (g.100mL^{-1})	$0,34 \pm 0,004$	$0,41 \pm 0,00^a$	$0,36 \pm 0,01^b$
AV** (g.100mL^{-1})	$0,02 \pm 0,008$	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^a$
AR (g.100mL^{-1})	$9,23 \pm 0,09$	$3,86 \pm 0,04^a$	$2,47 \pm 0,11^b$
ART (g.100mL^{-1})	$9,78 \pm 0,05$	$3,70 \pm 0,07^a$	$2,82 \pm 0,02^b$
Etanol ($^{\circ}\text{GL}$)	-	1,9	1,3

NOTA: *Acidez total; ** Acidez volátil; ^{a,b} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 1, após 10 dias de fermentação pode ser observada a evolução de compostos presentes no mosto da cultivar Gala durante a fermentação com as cepas de leveduras apiculadas *H. uvarum* e *H. guilliermondii*. A fermentação foi realizada em condições próximas às observadas no processamento de fermentado de maçã. As frutas foram selecionadas eliminando aquelas com pontos de podridão. Não foi adicionado metabissulfito ao mosto em virtude das duas cepas apresentarem baixa resistência a este composto. A temperatura variou de 18-21°C, oscilação e temperaturas comuns, uma vez que o fermentado de maçã é elaborado no verão. As duas cepas aumentaram a acidez total do fermentado atingindo valores de 0,41 e 0,36 g.100mL⁻¹ expresso em ácido málico para *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente. O consumo de nitrogênio foi de 47,15 mg.L⁻¹ e 35,15mg.L⁻¹ para as cepas *H. uvarum* e *H. guilliermondii*, respectivamente, estando próximo aos valores citados por Nogueira (2003). As duas cepas apresentaram atividade fermentativa com produção de etanol. Porém o consumo de açúcares não foi total após 10 dias de fermentação o que pode estar relacionado com uma baixa resistência a determinadas concentrações de etanol (FLEET 1999; GIL et al., 1996).

Verifica-se que a cepa *H. uvarum* atingiu a mesma população máxima de leveduras do que a cepa *H. guilliermondii*, alcançando ao redor de 10¹¹ ufc.mL⁻¹, sendo no 3º e no 2º dias de fermentação, respectivamente (Figura 2).

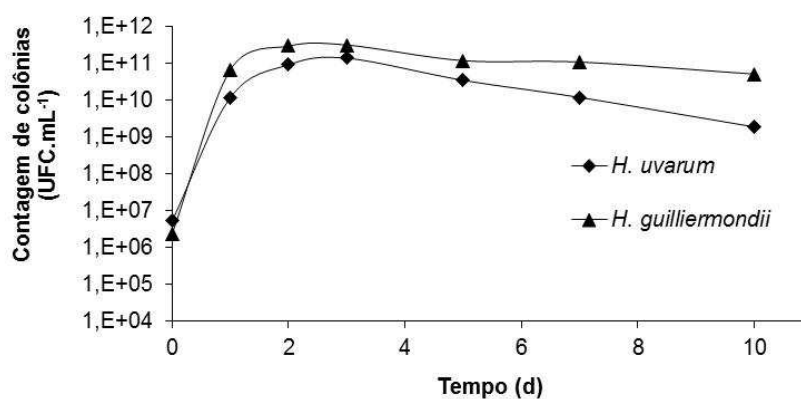


Figura 2. Resultados de contagem de células de duas leveduras oxidativas diferentes em mosto de maçã.

Ambas as cepas mantiveram açúcares residuais no produto final (Figura 3A), sendo o teor de 3,53 g.100mL⁻¹ para a cepa *H. guilliermondii* e 4,63 g.100mL⁻¹ para *H. uvarum*. No gráfico de evolução de etanol das duas cepas, é possível observar que há uma tendência de aumento do teor de etanol provavelmente devido à existência de açúcares residuais no

processo. A cepa *H. uvarum* apresentou maior teor no produto final (1,9°GL) do que a cepa *H. guilliermondii* (1,3°GL). Assim percebe-se que a cepa *H. guilliermondii* consumiu maior quantidade de açúcares durante o processo, mas produziu menor teor de etanol, este fato poder ser devido a produção de compostos secundários ao metabolismo deste microrganismo.

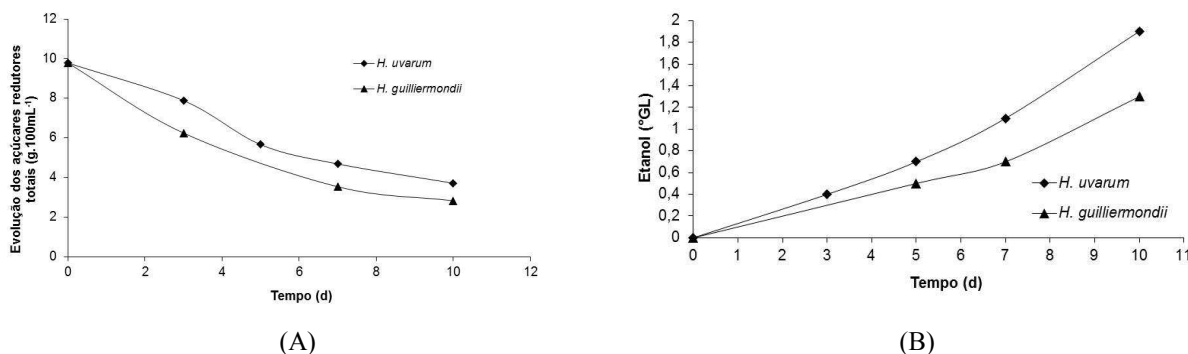


Figura 3. Evolução de açúcares e etanol nos fermentados de maçã realizados sob a ação de diferentes leveduras oxidativas. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.

A cepa *H. uvarum* apresentou maior $V_{\max}$ no processo fermentativo mais rapidamente que *H. guilliermondii* (Tabela 2). Este dado comprova uma maior atividade fermentativa para primeira cepa, visto que foi a maior produtora de álcool.

Tabela 2. Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzidos sob ação de duas diferentes cepas oxidativas.

Cepas	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo V máx (dias)
<i>H. uvarum</i>	3,85	4,25
<i>H. guilliermondii</i>	2,33	4,75

O método de *headspace* permitiu captar poucos compostos quando comparado com dados da literatura, que comentam que cepas de leveduras oxidativas são altamente produtoras de ésteres e álcoois superiores (Tabela 3). É também perceptível que a cepa de levedura utilizada influencia o perfil de voláteis, pois foram encontrados resultados que diferenciaram significativamente uma cepa da outra. Para a cepa de *H. uvarum* foi quantificado um maior teor de etanol em comparação com a cepa *H. guilliermondii*, confirmando o resultado já encontrado por ebulliômetro. Porém este resultado é contrário ao trabalho desenvolvido por Moreira et al. (2008) que encontraram teor maior para a cepa *H. guilliermondii*. Xu et al. (2006) perceberam que *Saccharomyces* mostra uma conversão de açúcar para álcool de 11,5%, enquanto *Hanseniaspora valbyensis* produz álcool com uma conversão que não ultrapassa 6%, configurando um teor de aproximadamente 90,24 mg.L⁻¹, enquanto neste estudo encontramos um teor de 15,98 mg.L⁻¹ para *H. uvarum* e 2,12 mg.L⁻¹ para

H. guilliermondii. Oliveira et al. (2005) tendo realizado fermentação de caldo de cana com diversas cepas diferentes de *Saccharomyces sp* e também com cepas não- *Saccharomyces*, considerou o perfil na formação de voláteis da espécie *Hanseniaspora occidentalis* muito semelhante ao das *Saccharomyces sp*, tendo encontrado 59 mg.L⁻¹ de etanol para esta cepa.

O acetaldeído foi quantificado nas duas cepas de leveduras encontradas, e este é o aldeído mais importante na produção de vinhos, normalmente conhecido como um subproduto da fermentação alcoólica e sua produção pode ser influenciada pela cepa de levedura. Em concentrações menores, o acetaldeído contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações (>200 mg.L⁻¹) este composto influencia negativamente o aroma do vinho (GIL et al. 2006).

Segundo Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2006), as cepas selvagens ou não-*Saccharomyces* pouco contribuem para a formação de álcool isoamílico (composto que contribui para o aroma frutal), o que é contraditório ao resultado encontrado para a cepa *H. uvarum* que demonstrou ser capaz de produzir uma concentração de 3,47 mg.L⁻¹ deste composto. Xu et al. (2006) verificaram que a cepa de *H. valbyensis* foi capaz de produzir 45,35 mg.L⁻¹ de álcool isoamílico em fermentações de culturas puras e quando combinada com *Saccharomyces sp*, esta produção chegou a atingir 232,05 mg.L⁻¹, dependendo do tempo de inóculo.

Romano et al. (2003) relatam que a cepa *Hanseniaspora* produziu uma menor quantidade de álcool isoamílico (40 mg / L) e uma maior concentração de ácido acético (2,100 mg.L⁻¹) e acetato de etila (100 mg.L⁻¹) do que a cepa *Saccharomyces* (250, 400 e <10 mg.L⁻¹, respectivamente), evidenciando que *S. cerevisiae* produziu uma concentração muito maior de álcoois superiores.

A cepa de *H. uvarum* não apresentou teores detectáveis de laurato de etila e propionato de isobutila que podem colaborar com aroma frutado e floral. Já a cepa de *H. guilliermondii* não apresentou teores de 2-hexanol, acetato de isoamila e etil propionato, destacando que o acetato de isoamila e o etil propionato conferem um aroma doce e frutal ao fermentado (Tabela 4).

Tabela 3. Concentração de compostos voláteis detectados em dois fermentados de maçã elaborados com cepas de leveduras *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii*.

Compostos Voláteis *	<i>H. uvarum</i>	<i>H. guilliermondii</i>
Ésteres		
Acetato de isoamila	0,18	nd
Etil propionato	0,12	nd
Laurato de etila	nd	15,65
Propionato de isobutila	nd	0,16
Aldeídos		
Acetaldeído	0,13 ^a	0,11 ^a
Álcoois		
Álcool isoamílico	3,47 ^a	0,23 ^b
Etanol	15,98 ^a	2,12 ^b
2-hexanol	0,06	nd
Não identificados		
1	nd	0,20
2	0,06	nd
TOTAL	20	18,47

NOTA: nd = não detectado; * mg equivalente de etanol.L⁻¹ de *headspace*; ^{a,b} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras (p < 0,05).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados de compostos voláteis do mosto usando como método de coleta o *headspace*. Foram quantificados 3 compostos mas estes não foram identificados, o que pode ser devido à falta de padrões analisados destes compostos, ou pelo próprio processo de pasteurização. Isto comprova que todos os compostos que foram identificados nos produtos fermentados foram provenientes do metabolismo secundário das leveduras. Diversos estudos tem demonstrado que o processo de pasteurização pode causar perdas de compostos voláteis tanto no suco de maçã quanto na sidra. Nesse sentido Janzantii et al.(2003), registraram perda total de octanoato de isoamila e de mais de 15 compostos não identificados em seus experimentos em suco clarificado de maçã Fuji. Já Boylston et al. (2003) realizaram estudos em sidra e concluíram que a pasteurização realmente afeta os atributos sensoriais da bebida.

Tabela 4. Concentração de compostos voláteis no mosto de maçã

Composto volátil	Concentração*
N	0,09
N	0,08
N	0,16

NOTA: N = não identificado; * mg eq.de etanol.L⁻¹ de *headspace*.

Na Figura 4 encontram-se os resultados da análise de diferentes concentrações de SO₂ no mosto para fermentação de leveduras oxidativas. Percebe-se que em concentrações

maiores que 44 mg.L^{-1} de SO_2 a fermentação não ocorreu até o 9º dia de processo. Na concentração de 44 mg.L^{-1} , a fermentação aconteceu de maneira mais lenta e, na ausência de SO_2 o processo fermentativo ocorreu de maneira mais rápida, consumindo maiores teores de CO_2 . Assim, considerando a sensibilidade a este composto pelas cepas de *Hanseniaspora*, optou-se por não utilizá-lo no mosto dos demais ensaios de fermentação realizados neste trabalho.

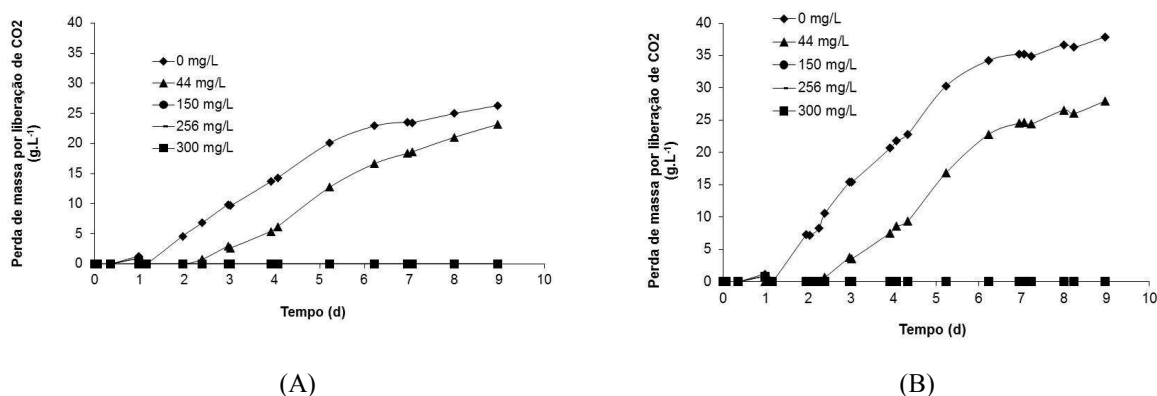


Figura 4. Resultados de perda de massa por liberação de CO_2 nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes concentrações de SO_2 no mosto. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*.

Na Figura 5 estão apresentados os valores de liberação de CO_2 das duas cepas oxidativas analisadas em diferentes temperaturas. Percebe-se que na temperatura de 10°C a liberação de CO_2 foi muito pequena até o 9º dia de processo, isto pode ser devido ao fato de baixas temperaturas inativarem a atividade fermentativa da levedura. A temperatura ideal para o processo fermentativo foi de 25°C , seguida de 20°C . Este ensaio determinou a temperatura a ser utilizada nos outros ensaios de fermentação realizados neste trabalho.

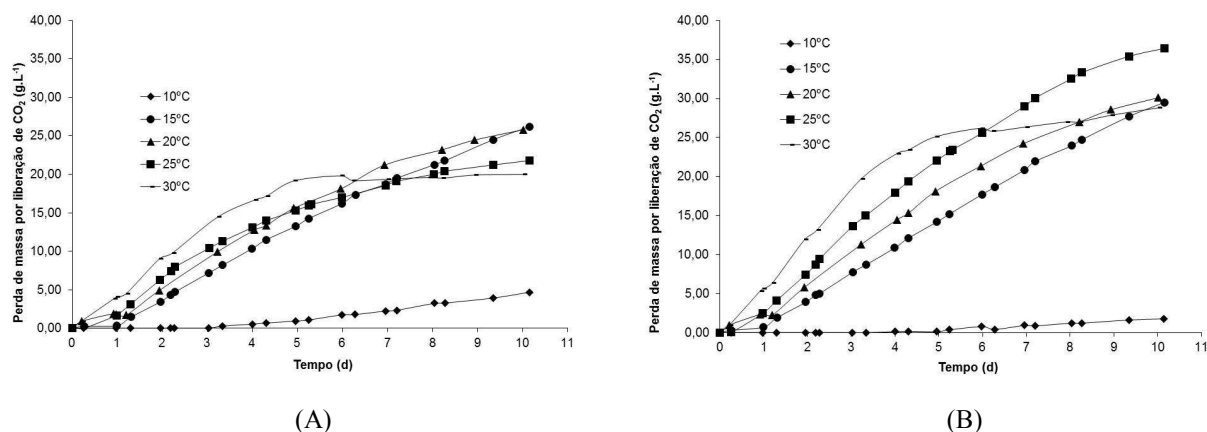


Figura 5. Resultados de perda de massa por liberação de CO_2 nas fermentações para avaliar o efeito de diferentes temperaturas durante o processo fermentativo. (A) Resultados para a cepa *H. uvarum*. (B) Resultados para a cepa *H. guilliermondii*.

As leveduras oxidativas ou não-*Saccharomyces* são conhecidas pela sua contribuição aos compostos voláteis aromáticos, principalmente ésteres em bebidas fermentadas. Segundo Viana et al. (2008) as leveduras do gênero *Hanseniaspora* são as melhores produtoras de ésteres de acetato, que são efetivos para a qualidade aromática dos vinhos mesmo em pequenas quantidades (NYKANEN, 1986). A contribuição destas leveduras aos compostos aromáticos foi percebida nos resultados de preferência destes produtos (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas oxidativas.

Fermentados de maçã	Cepas de leveduras	Σ das ordens
A	<i>H. uvarum</i>	24 ^a
B	<i>H. guilliermondii</i>	31 ^a

NOTA: ^a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, $p < 0,05$).

A porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 23,64 % e 73,91 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã, 63,64 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 80,00 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem. E 52 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. guilliermondii* ter sido considerada preferida um maior número de vezes, realizamos o teste de aceitabilidade com este produto (Figura 6). A média de aceitabilidade para a amostra foi de 5,45 (50 julgamentos), correspondendo a uma percentual de 77,86%. O percentual de respostas que ficaram classificadas entre os níveis gostei, gostei muito e gostei muitíssimo foi de 87,10%, podendo assim concluir que esta amostra teve um resultado positivo em sua análise sensorial olfativa.

Na comparação dos resultados de análise olfativa e dos compostos voláteis detectados, percebeu-se que os ésteres foram determinantes na contribuição aromática dos fermentados obtidos, visto que a quantidade total de ésteres produzidos por *H. guilliermondii*, que foi mais preferida, foi aproximadamente 53 vezes maior que *H. uvarum*, corroborando com Bilbao (1997), Rojas (2003) e Ciani et al.(2006), que destacam que os ésteres formados são os maiores impactantes no aroma dos produtos.

No entanto, a quantidade de álcoois superiores produzidos por *H. uvarum* foi aproximadamente 15 vezes maior que *H. guilliermondii*, não justificando a preferência do fermentado produzido com *H. guilliermondii*. Assim, considerando que estes compostos também contribuem positivamente para o aroma do produto, conforme destacam Moreira et

al. (2008) e Rapp & Mandery (1986), sugere-se pelos resultados deste trabalho que os ésteres foram majoritários na contribuição aromática do produto, como afirma Bilbao (1997).

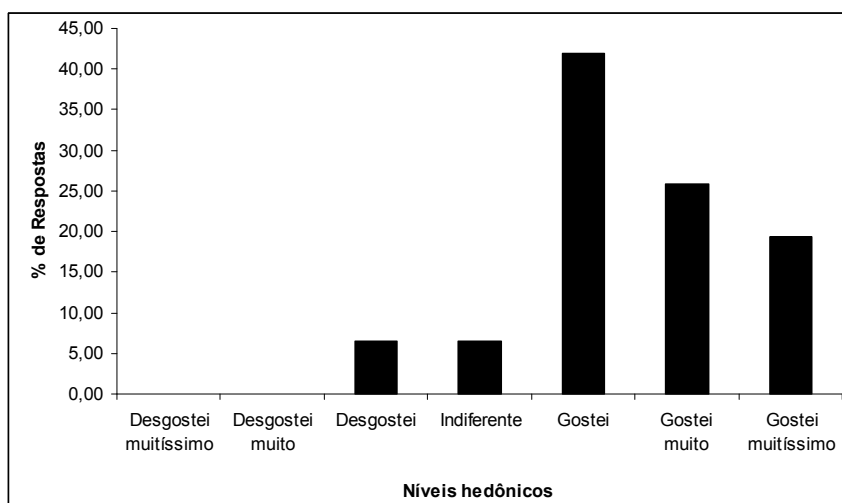


Figura 6. Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura *H. guilliermondii*.

4. CONCLUSÃO

As cepas de *Hanseniaspora* apresentaram [1] elevada sensibilidade ao sulfito, [2] temperatura ótima de fermentação entre 20-25° C, [3] manutenção de açúcar residual, [4] apresentaram elevada atividade fermentativa, [5] a cepa *H. guilliermondii* apresentou um perfil de voláteis no *headspace* que foi bem aceito pela análise sensorial olfativa e [6] a presença de ésteres no perfil de aromas contribuiu para a qualidade aromática da bebida.

5. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13.170: Teste de Ordenação em Análise Sensorial**. São Paulo: ABNT, 7 p. 1994.

ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effect of the initial nitrogen content in apple wine processing (*in press*). **Brazilian Journal Food Technology**. 2011.

BARON, A.; BOHUON, G.; DRILLEAU, J.F. Note about formol index of apple juice concentrate. **Annales des Falsifications et de l'Expertise Chimique**, n.70, p.19-26. 1977.

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

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**. v. 24, p. 37-39. 1997.

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing Treatment and Sorbate Addition on the Flavor Characteristics of Apple Cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 7, p. 1924-1931. 2003.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Itália, v. 108, p. 239-245. 2006.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M.; Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 328-336. 2008.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. 1. ed. Campinas/SP: Ital/Lafise, 2002. p. 116.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, n. 50, p. 101-117. 1999.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v. 222, p. 15-25. 2006.

GIL, J. V.; MATEO, J. J.; JIMENEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T.. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, n. 61, p. 1247-1250. 1996.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analitical Chemical Acta**, v. 563, p. 145-153. 2006.

IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas Analíticas**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J. F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented Beverage Production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 285–294. 2005.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; PINHO, P. G.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, Portugal, v. 124, p. 231–238. 2008.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 02, p. 274-280. 2003.

NOGUEIRA, A.; LÊ QUERE, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow Fermentation in French Cider Processing due to Partial Biomass Reduction. **Journal Institute of Brewing**, v. 2, p. 102 – 110. 2008.

NYKANEN, L. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 84–96. 1986.

OLIVEIRA, E. S.; CARDELLO, H. M. A.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G. E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 707–715. 2005.

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.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884. 1986.

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.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181 – 188. 2003.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169–180, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2010.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778– 785. 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 68–74. 2009.

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

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 376–384. 2006.

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.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, n. 4, p. 775-786. 1989.

CAPÍTULO III: Efeito de diferentes cepas de *Saccharomyces* nos compostos aromáticos do *headspace* de fermentado de maçã.

EFEITO DE DIFERENTES CEPAS DE *Saccharomyces* NOS COMPOSTOS AROMÁTICOS DO *HEADSPACE* DE FERMENTADO DE MAÇÃ

EFFECT OF DIFFERENT *Saccharomyces* STRAINS IN THE HEADSPACE AROMA COMPOUNDS OF APPLE WINE

RESUMO

A sidra brasileira, bebida fricante de maçã de baixo grau alcoólico, possui coloração pouco intensa e baixa qualidade aromática, necessitando de correção do teor de açúcar final. A bebida francesa é considerada a melhor do mundo devido às suas características físico-químicas e sensoriais. Neste trabalho foram utilizadas quatro diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*: Bouquet, Arome Plus, Fermol Aromatic e UFLA CA-11. A avaliação compreendeu cinética, atributos físico-químicos e evolução aromática durante a fermentação de mosto de maçã. Foi utilizado mosto de maçã da cv. Gala e monitorado o crescimento das cepas, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação. Todas as cepas apresentaram atividade fermentativa desejada com manutenção de açúcares residuais no produto final. A técnica de *headspace* foi utilizada para coleta dos voláteis e permitiu captar uma baixa quantidade de compostos voláteis que não foram aceitos na análise sensorial olfativa.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, compostos voláteis, fermentação.

ABSTRACT

The Brazilian cider, sparkling apple wine low-alcohol content, has a few color and low aromatic quality, requiring correction in the final sugar content. The French beverage is considered the best in the world due to its physical-chemical and sensorial characteristics. In this study it was used four different strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Bouquet, Arome Plus, Fermol Aromatic and UFLA CA-11. The evaluation consisted of kinetic, physical and chemical attributes and aromatic compounds production during the apple must fermentation. It was used the apple must from cv. Gala and monitored the strains growth, the physico-chemical and kinetic parameters along the 10 days of fermentation. All the strains showed required fermentative activity with maintenance of residual sugar in the finished product. The headspace technique was used for extraction of volatiles and allowed to capture a low amount of volatiles compounds that were not accepted in olfactory sensory.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, volatile compounds, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Na fermentação alcoólica, além da biotransformação de açúcares em etanol e gás carbônico, ocorre a liberação de metabólitos secundários, como os compostos aromáticos que podem contribuir com a qualidade sensorial do produto final. Os compostos voláteis incluem as classes dos álcoois superiores, ésteres, ácidos orgânicos e aldeídos. O perfil destes compostos dependerá da cepa de levedura, das condições e tecnologia do processo e da composição química do meio (ROMANO et al., 2003; SWIEGERS et al., 2005; DUARTE et al., 2009; SWIGERS et al., 2006; UGLIANO et al., 2006; VILA NOVA e SIEIRO, 2006; WONDRA e BOVERIC, 2001).

Muitos estudos de melhoramento genético de cepas de leveduras *S. cerevisiae* tiveram como objetivos uma rápida fermentação, elevado rendimento alcoólico e elevada tolerância ao dióxido de enxofre na elaboração de vinhos e cervejas (PRETORIUS, 2000; VALERO et al., 2005). Entretanto, em sidrologia não existem trabalhos para a definição de uma cepa específica que atenda aos padrões de qualidade. Normalmente, são testadas leveduras comerciais utilizadas em enologia para a fabricação do fermentado de maçã. Desta forma, as cepas devem apresentar um aroma com notas ‘frutais’ e/ou ‘florais’ para que atendam ao aroma desejado pelo consumidor.

A indústria brasileira de elaboração de fermentado de maçã, em função de [1] utilizar maçãs de descarte com problemas fitopatológicos, [2] adição de dióxido de enxofre em concentrações elevadas na fruta triturada, [3] elevadas taxas de inóculo de cepas de leveduras comerciais para vinhos, as quais não apresentam estudos para o fermentado de maçã e [4] fermentação em elevadas temperaturas (25-35°C) impossibilita a formação de compostos aromáticos que possam contribuir para a qualidade sensorial da bebida (NOGUEIRA et al., 2007). As informações referentes a compostos voláteis provenientes do metabolismo secundário de leveduras *S. cerevisiae* em fermentados de maçãs são restritas, sendo necessário o estudo das cepas existentes em relação aos seus potenciais de formação de compostos voláteis aromáticos.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de aromas no *headspace* de fermentado de maçãs por diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e identificar qual cepa que produziu aromas mais agradáveis ao palato do consumidor brasileiro.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg) safra 2009/2010 obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

Os microrganismos utilizados foram: *Saccharomyces cerevisiae* Arome Plus (Fabricante AEB Group), *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fabricante AEB Group), *Saccharomyces cerevisiae* Fermol Aromatic (Fabricante AEB Group), *Saccharomyces cerevisiae* UFLA CA – 11 (Fabricante LNF). Os reativos e padrões utilizados foram de qualidade *pro analysis*.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Processos

Processamento do mosto de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas mantendo-as submersas por 40 minutos em solução de bicarbonato de sódio a 6000 mg.L^{-1} e depois por 5 minutos à 5°C em solução de hipoclorito a 150 mg.L^{-1} . Depois de enxaguadas em água corrente foram trituradas em multiprocessador de alimentos (Processador Metvisa, Tipo MPA) e a massa ralada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que após superpostos, foram submetidos a uma pressão de $3,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, Novozymes do Brasil), a uma concentração de $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$ (120 minutos a $20\text{-}25^\circ\text{C}$) e, após sedimentação, trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro âmbar de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado (98°C / 30 min) (WOSIACKI et al., 1989).

Processamento do Fermentado de Maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL (Figura 1), esterilizados em autoclave (121°C / 15 min). No mosto foi adicionado 0,01 % do antibiótico cloranfenicol (99%, Fornecedor Henrifarma) para controle do crescimento bacteriano. As leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente $2,0 \times 10^6 \text{ ufc.mL}^{-1}$.

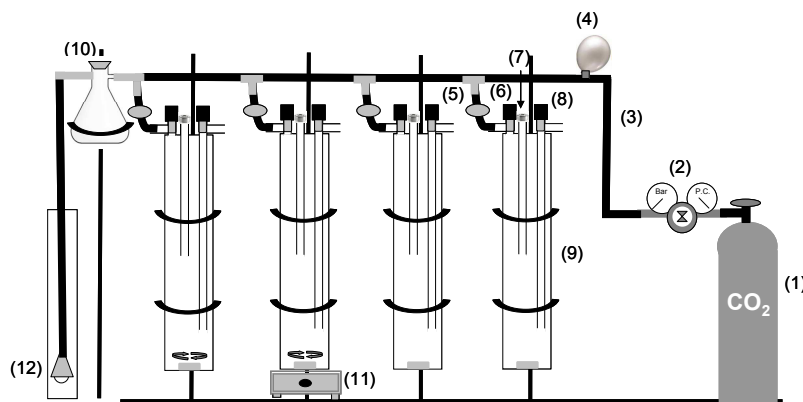


Figura 1. Esquema dos fermentadores em anaerobiose.

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de 0,20 μm . (6): Tampa rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Tampa rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quinis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

As cepas do gênero *Saccharomyces* estavam na forma secas ativas e foram re-hidratadas conforme especificações dos fabricantes. No décimo dia, as fermentações foram interrompidas e o fermentado de maçã foi centrifugado a 10200 g e 5°C (Centrifuga Himac CR21GII) durante 20 minutos sendo em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado em baixa temperatura (-18 °C).

Pontos de amostragem. Nos tempos de fermentação com 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias foram retirados 10 mL de amostras do fermentado para contagem de células; e nos dias 3, 5, 7 e 10 foram retirados 40 mL para análises físico-químicas. Antes da coleta das amostras, o fermentado em cada fermentador (Figura 1) era colocado sob agitação na velocidade 3 do agitador (11) durante 20 minutos. A seguir, a saída do fermentador destinada à coleta era desinfetada com álcool 70%, seguida de lavagem com 40 mL de água destilada para retirada do álcool residual, sempre com a tampa rosca (8) fechada.

Para a retirada das amostras o manômetro (2) do cilindro de gás carbônico (1) era aberto para que o aumento da pressão interna de gás carbônico nos fermentadores proporcionasse condições para o fermentado subir no tubo de coleta ligado à válvula de rosca (8) que era aberta. Os primeiros 7 mL do fermentado correspondentes ao volume total do tubo interno do fermentador, eram desprezados, para afastar a possibilidade de coletar amostra não homogeneizada e permanente no interior de tal tubulação, a seguir realizava-se a coleta do volume acima mencionado em tubos estéreis.

A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado através da liberação de gás carbônico (CO_2), com pesagens dos fermentadores em

balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante a temperatura de 20° C (Bely et al., 1990; Roger et al., 2002). A velocidade de fermentação foi obtida através da equação:

$$V = \Delta \text{CO}_2 / \Delta t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = Velocidade de fermentação.

ΔCO_2 = Variação de produção de CO_2 corrigida por equação de gráfico.

Δt = Variação de tempo.

2.2.2 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis. A coleta foi realizada pelo método de *headspace*. O frasco para *headspace* de capacidade de 40 mL, contendo 20 mL do fermentado já centrifugado e congelado, foi colocado em banho-maria a 25° C, onde permaneceu por pelo menos 30 minutos. Antes de utilizar a seringa para cromatografia gasosa (SERINGA MICROLITER DE 1000 μL – HAMILTON) a mesma foi lavada por três vezes com ar e após agitação manual do frasco, o primeiro *headspace* coletado foi desprezado. Os compostos voláteis capturados na segunda coleta do *headspace* foram injetados diretamente no cromatógrafo gasoso. Após cada injeção a seringa foi lavada com ar por pelo menos 20 vezes.

Análise de compostos voláteis. Para identificação e quantificação dos compostos voláteis dos fermentados de maçã foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso da marca Shimadzu modelo GC-17A equipado com detector por ionização de chama-FID e coluna Capilar (Dimensões: 0,32 mm x 1,0 μm x 30 m, Supelco) localizado na Universidade Federal do Paraná, no departamento de Processos Biotecnológicos. O nitrogênio foi usado como gás carreador com fluxo na coluna de 1,5 mL.min⁻¹, a técnica de injeção foi split 1:5, a temperatura do forno foi programada para 40 °C (durante 5 minutos) com aumento de 20 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 230 °C. Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os picos obtidos dos padrões.

Os padrões de aromas foram: acetaldeído (00070; 99,5 %; Flucka), etanol (1009711000; 96 %; Merck), laurato de etila (61630; 98,0 %; Aldrich), álcool isoamílico (1009791000; P.A.; Merck), acetato de etila (código 34972; 99,7 % ; Fluka), acetato de isopropila (45960; 99.5%; Sigma), acetato de propila (46050; 96.0%; Flucka), 2-metil-1-butanol (65990; 98.0%; Flucka), etil-isobutirato (246085; 99.0%; Aldrich), acetato de isobutila (537470; 99.0%; Sigma), hexanona (103004; 98.0%; Sigma), etil-butirato (19230;

98.0%; Flucka), 2-hexanol (52847; 98.5%; Flucka), lactato de etila (W244007; 98 %; Aldrich), acetato de butila (73285; 99,7 %; Flucka), ácido butírico (19215; 99,5 %; Flucka), 1-hexanol (73117; 99,9 %; Flucka), acetato de isoamila (W205532; 97 %; Aldrich), propionato de isobutila (307580; 98.0%; Aldrich), 2-heptanona (537683; 99.0%; Sigma), etil-propionato (112305; 99.0%; Aldrich), 2-octanona (047009; 98.0%; Aldrich), 2-octanol (74858; 99.5%; Aldrich), etil-3-hexanoato (148962; 99.0%; Aldrich), acetato de hexila (25539; 99,7 %; Flucka), 2-fenil-etanol (77861; 99,0 % Aldrich), ácido caprílico (21639; 99,5 %; Flucka), succinato de dietila (07429; 99,5 %; Flucka), octanoato de etila (W244910; 98 %; Aldrich) e decanoato de etila (148970; 99,0 %; Aldrich).

2.2.3 Análises físico-químicas

Nos pontos 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram realizadas análises de **açúcares redutores** quantificados pelo método químico clássico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1 N (50 °C / 5 min) e **álcool** através do uso do ebuliômetro. A **acidez titulável total** foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,33 com fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g.100mL⁻¹, e a **acidez volátil** foi calculada como ácido acético e expressa em g.100mL⁻¹ (IAL, 2008). O **nitrogênio total** foi determinado pelo método de Kjeldhal (BARON et al.,1977; IAL, 2008) .

2.2.4 Análises microbiológicas

As amostras dos fermentados de maçã foram coletadas e preparadas para contagem microbiológica conforme recomendado por Silva et al. (2010). Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1 %, e semeadas em superfície, com alça de Drigalski, no meio seletivo para leveduras YMA – *Yeast Malt Agar* . Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus de Ponta Grossa.

2.2.5 Análise sensorial

Nos produtos fermentados obtidos a partir da ação de 4 diferentes leveduras fermentativas foram realizadas análise olfativa de ordenação por preferência, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo método descrito por Faria e Yotsuyanagi (2002). Participaram das análises 50 julgadores.

2.2.6 Análises estatísticas

Foram feitas análises variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode ser observado que o teor de nitrogênio, que na maçã está na forma de aminoácidos, classifica o mosto da cultivar Gala com elevado teor ($>150 \text{ mg.L}^{-1}$) sendo suficiente para uma completa exaustão dos açúcares (Drilleau et al., 1991; Alberti et al., 2011). O mosto de maçã da cultivar Gala apresentou baixo teor de açúcares ($9,78 \text{ g.100mL}^{-1}$) atestando que o grau de maturidade da fruta utilizada para o processamento não estava no seu estágio completo de maturação o que pode afetar o rendimento de etanol. A acidez total expressa em ácido málico do mosto da cultivar Gala ($0,34 \text{ g.100mL}^{-1}$) o classifica com baixa acidez ou doce ($< 0,45 \text{ g.100mL}^{-1}$) (Beech et al., 1972).

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas do mosto e dos diferentes fermentados de maçã da cultivar Gala.

Parâmetros físico-químicos	Mosto cv. Gala	Leveduras comerciais			
		Bouquet	Arome Plus	Fermol Aromatic	UFLA CA - 11
Nitrogênio (mg.L^{-1})	$153,47 \pm 0,02$	$65,64 \pm 6,54^a$	$63,79 \pm 0,00^a$	$64,57 \pm 5,34^a$	$62,87 \pm 1,30^a$
AT* (g.100mL^{-1})	$0,34 \pm 0,004$	$0,33 \pm 0,01^a$	$0,35 \pm 0,01^a$	$0,34 \pm 0,01^a$	$0,26 \pm 0,01^b$
AV** (g.100mL^{-1})	$0,02 \pm 0,008$	$0,05 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	$0,04 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,01^a$
AR (g.100mL^{-1})	$9,23 \pm 0,09$	$1,38 \pm 0,04^a$	$0,99 \pm 0,05^b$	$1,10 \pm 0,02^b$	$0,79 \pm 0,05^c$
ART (g.100mL^{-1})	$9,78 \pm 0,05$	$1,58 \pm 0,01^b$	$2,48 \pm 0,02^a$	$1,31 \pm 0,01^c$	$0,91 \pm 0,01^d$
Etanol ($^\circ\text{GL}$)	-	5,6	5,2	5,3	5,5

NOTA: *Acidez total; ** Acidez volátil; ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de fermentados ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 1, após 10 dias de fermentação, pode ser analisada a evolução dos compostos do mosto no fermentado com diferentes cepas de leveduras fermentativas. Pode-se verificar um aumento na acidez volátil para todas as cepas provavelmente devido à síntese de ácido acético e acetato de etila (CSOMA e SIPICZKI, 2008). O consumo de nitrogênio foi ao redor de 90 mg.L^{-1} , sendo próximo ao encontrado na literatura (Nogueira et al., 2007). O teor de açúcares residuais foi baixo, considerando que todas as cepas apresentaram graduação alcoólica considerada boa para o produto. Os açúcares residuais melhoram a qualidade da bebida, adequando-se mais ao perfil de paladar do brasileiro que tem preferência por bebidas doces. Percebe-se que as cepas atingiram teores similares no produto final, apresentando

apenas uma cinética diferente no decorrer do processo. Permaneceram açúcares residuais no produto, demonstrando uma tendência de atingir maiores valores de álcool caso o processo não tivesse sido interrompido. A cepa *S. cerevisiae* Bouquet foi a que apresentou maior teor alcoólico (5,6° GL) e a cepa *S. cerevisiae* UFLA CA-11 foi a que consumiu maior teor de açúcares permanecendo um residual de 0,91 g.100mL⁻¹. Este fato pode ser devido à produção de metabólitos secundários do processo fermentativo. A fermentação foi realizada em condições próximas às observadas no processamento de fermentado de maçã. A temperatura variou de 19-21°C, oscilação e temperaturas comuns, uma vez que o fermentado de maçã é elaborado no verão.

Na Figura 2, percebe-se que as populações máximas atingidas pelas leveduras são consideradas altas (10⁸ ufc.mL⁻¹) para produtos fermentados de maçã, pois diversos estudos revelam que leveduras fermentativas atingem 10⁷ ufc.mL⁻¹. Acredita-se que a pasteurização realizada no mosto pode ter colaborado para tal fato, pois com a redução da microbiota natural, as cepas de *Saccharomyces* sp. puderam atingir populações maiores, por não ter encontrado as formas microbianas que normalmente as acompanham, sendo seus competidores naturais (NOGUEIRA et al., 2008; WIECHETECK et al., 2005).

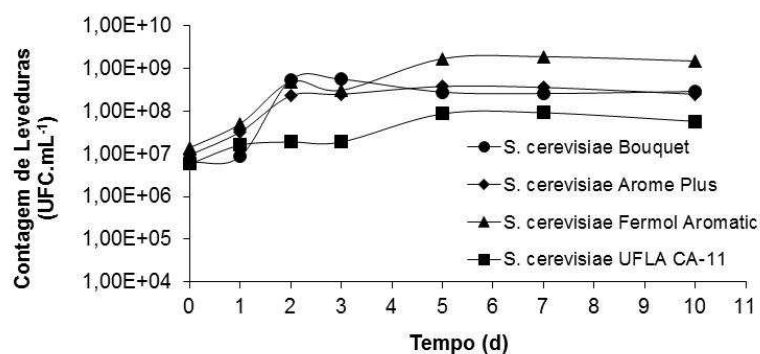


Figura 2. Resultados de contagens de células dos fermentados de maçã sob ação de quatro diferentes leveduras fermentativas.

Todas as cepas atingiram velocidades máximas de fermentação ao redor do segundo dia de processo (Tabela 2), sendo que a cepa que alcançou a maior $V_{\max}$ foi UFLA CA-11 em 1,75 dias de fermentação e a cepa que demorou mais para alcançar este parâmetro foi a Fermol Aromatic (2,25 dias). Apesar de a cepa Bouquet ter atingido o maior número de células (aproximadamente 10⁹ ufc.mL⁻¹) esta não atingiu a maior velocidade máxima, ficando com 9,59 gCO₂.L⁻¹.d⁻¹.

Tabela 2. Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã produzido sob ação de 4 diferentes cepas fermentativas.

Cepas	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo v máx (dias)
Bouquet	9,59	2,00
Arome Plus	8,27	1,75
UFLA CA-11	9,83	1,75
Fermol Aromatic	9,64	2,25

Na Tabela 3 podem ser observados os compostos aromáticos do *headspace*. O perfil de voláteis foi diferente em função da cepa, fato também relatado por Loscos et al. (2007), que analisando três diferentes cepas de leveduras *Saccharomyces* encontraram perfil de voláteis significativamente diferentes, o que pode ser percebido neste trabalho pois vários compostos diferenciaram significativamente de uma cepa para outra. As concentrações do éster octanoato de etila na cepa *S. cerevisiae* Bouquet foi 3 vezes menor que na cepa Fermol Aromatic e 15 vezes menor que para a cepa UFLA CA-11. É possível verificar também que todas as cepas foram altamente produtoras de álcoois, sendo este grupo o que obteve maior somatória entre os compostos identificados, e este resultado está em concordância com Xu et al. (2006).

Segundo Cortes e Blanco (2010) avaliando a capacidade fermentativa de cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e sua influência sobre o aroma e propriedades sensoriais de vinho, encontraram teores de álcoois superiores de 210,87 a 260,91 mg.L⁻¹ e de 27,1 a 46,77 mg.L⁻¹ de ésteres. Estes autores afirmam que os compostos que mais influenciam no aroma dos vinhos são o acetato de isoamila, o octanoato de etila e o hexanoato de etila, todos contribuintes com notas frutais ao aroma de bebidas. Pode-se perceber que dois destes compostos (acetato de isoamila e octanoato de etila) foram identificados em todas as amostras analisadas, e suas concentrações foram sempre as mais altas para o grupo dos ésteres, exceto para Fermol Aromatic que detectou um alto teor de laurato de etila, composto que contribui com aroma frutal. Neste sentido, Andorra et al. (2010), em fermentação pura de *Saccharomyces cerevisiae*, encontraram uma concentração de 232,21 mg.L⁻¹ de álcoois superiores e 10,06 mg.L⁻¹ de ésteres em seus fermentados.

Segundo Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2006), as cepas fermentativas são as maiores produtoras de álcool isoamílico (composto que contribui para o aroma frutal), e pode-se perceber que este composto foi detectado e identificado em todas as cepas utilizadas, sendo a menor produtora a cepa Fermol Aromatic.

A cepa UFLA CA-11 apresentou 12 compostos quantificados pelo método de *headspace*. Pelo fato desta cepa ter utilizado maior teor de açúcares do mosto esperava-se que

produzisse maior teor de compostos secundários, como os aromas. Mas a técnica de *headspace* utilizada para coleta destes compostos pode ter restringido o número de compostos que poderiam ser captados pelo fato de ocorrer à temperatura ambiente, não considerando os compostos que possuem maior temperatura de volatilização. Mas em concordância com Duarte et al. (2010) que analisou diferentes cepas em fermentados de framboesa, esta cepa foi altamente produtora de álcool isoamílico e etanol, superando as outras cepas analisadas.

Tabela 3. Concentração de compostos voláteis identificados em 4 fermentados de maçã elaborados com diferentes cepas comerciais de leveduras *S. cerevisiae*.

Compostos Voláteis*	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
	Bouquet	Arome Plus	Fermol Aromatic	UFLA CA-11
Ésteres				
Acetato de etila	0,08 ^c	0,16 ^{a,b}	0,14 ^{a,b}	0,20 ^a
Acetato de isoamila	0,17 ^a	0,17 ^a	0,22 ^a	0,19 ^a
Acetato de propila	0,06 ^a	0,12 ^a	0,08 ^a	nd
Decanoato de etila	0,06 ^c	0,16 ^b	nd	0,38 ^a
Etil-3-hexanoato	0,07 ^a	0,08 ^a	0,11 ^a	0,14 ^a
Laurato de etila	nd	nd	10,30	nd
Octanoato de etila	0,06 ^d	0,33 ^b	0,21 ^c	0,93 ^a
Álcoois				
Álcool isoamílico	0,14 ^b	0,15 ^c	0,07 ^d	0,21 ^a
Etanol	36,90 ^c	42,34 ^b	11,85 ^d	55,17 ^a
2-hexanol	0,06 ^a	0,07 ^a	nd	0,11 ^a
Cetonas				
2-octanona	0,06 ^c	0,07 ^{b,c}	0,15 ^{a,b}	0,17 ^a
Não Identificados				
1	0,15 ^c	0,23 ^b	0,25 ^b	0,59 ^a
2	nd	0,50 ^a	0,11 ^b	0,10 ^b
3	nd	nd	nd	0,09
TOTAL	37,81	44,31	23,49	58,28

NOTA: nd = não detectado. * mg equivalente de etanol.L⁻¹ de *headspace*; ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras (p < 0,05).

É possível perceber que a somatória de concentrações de voláteis diferenciou significativamente entre as diferentes cepas. Contudo, a cepa que atingiu uma maior somatória foi UFLA – CA 11 sendo considerada preferida um menor número de vezes. Com isso é possível discutir que é a combinação de compostos impactantes ao aroma que irá influenciar na qualidade aromática de bebidas fermentadas. Loscos et al. (2007) afirmam ainda que em algumas cepas o teor de um composto chega a ser de 3 a 4 vezes maior em uma levedura do que em outra e esta diferença nem sempre consegue ser relacionada à qualidade

aromática da bebida; e pelo valor total que foi encontrado neste trabalho percebe-se que há uma variação de 2,5 vezes entre a menor e a maior soma.

Na Tabela 4 podem ser observados os resultados para o teste de ordenação por preferência aromática de quatro fermentados de maçãs elaborados com diferentes cepas de leveduras *S. cerevisiae*. As cepas Bouquet, Fermol Aromatic e Arome Plus são descritas por formarem notas de aromas frutados e florais em vinhos de uvas, porém pouco se conhece com relação ao resultado em fermentados de maçãs. Estas três cepas não apresentaram diferença significativa e tiveram seus resultados muito próximos, indicando que os provadores não conseguiram distinguir diferenças.

Cortes e Blanco (2010) verificaram que os álcoois superiores quantitativamente foram o grupo de compostos voláteis mais importantes, enquanto que os ésteres etílicos, acetatos e ácidos graxos foram qualitativamente mais importantes.

No entanto, neste estudo, percebeu-se que a cepa UFLA CA-11, descrita pelo fabricante como uma levedura que produz pouco aroma, foi maior produtora de álcoois superiores, contudo foi a menos preferida. A cepa Fermol Aromatic que obteve uma maior somatória na produção de ésteres, incluindo acetatos, não obteve destaque entre as demais na análise olfativa. Sugere-se, portanto, que a interação sinérgica dos compostos produzidos deve prevalecer no aroma do produto.

Tabela 4. Resultado do teste ordenação por preferência aromática das amostras de quatro fermentados de maçãs elaborados com diferentes cepas comerciais de leveduras *S. cerevisiae*.

Fermentados de maçãs	Cepas de <i>S. cerevisiae</i>	Σ das ordens
A	Bouquet	108 ^a
B	Fermol Aromatic	114 ^a
C	Arome Plus	109 ^a
D	UFLA CA – 11	129 ^a

NOTA: ^a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, $p < 0,05$).

A porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 26,09 % e 73,91 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã, 71,74 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 86,96 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem. E 48,89 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato de a amostra produzida sob a ação de *S. cerevisiae* Bouquet ter sido preferida um maior número de vezes, realizou-se o teste de aceitabilidade com este (Figura 3). A partir

dos 50 julgamentos de teste analisados a média de aceitabilidade para a amostra foi de 4,7, correspondendo a um percentual de 67,14%. A somatória de respostas classificadas entre gostei, gostei muito e gostei muitíssimo soma 60%, sendo com isto a amostra considerada não satisfatória para o perfil dos julgadores.

Esta baixa aceitabilidade pode ser devido que o produto fermentado de maçã obtido com ação da cepa *S. cerevisiae* Bouquet apresentou uma somatória de ésteres detectados significativamente mais baixa que a somatória de álcoois. E sabe-se que os ésteres são os compostos que mais influenciam na qualidade aromática de bebidas fermentadas devido às suas contribuições em notas frutais e florais. Os altos teores de etanol podem ter mascarado percepções aromáticas que seriam positivas ao aroma final.

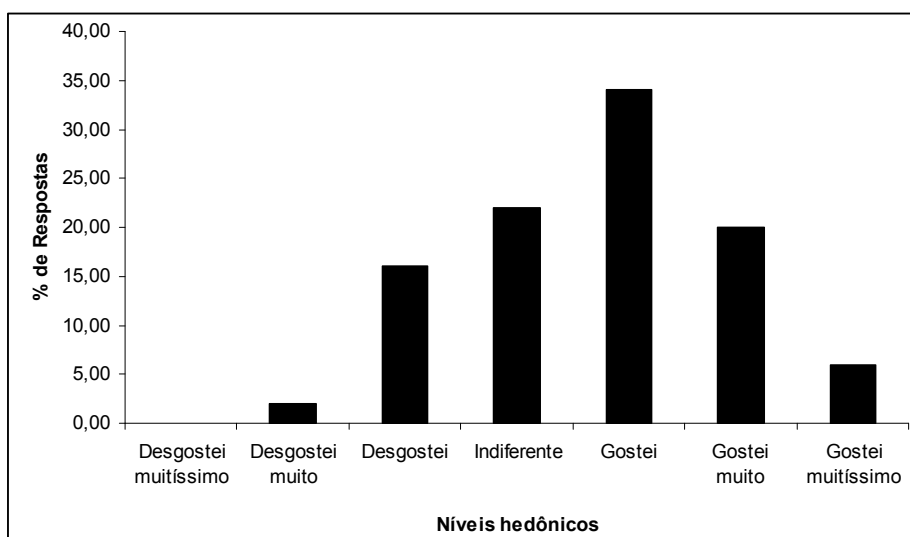


Figura 3. Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da levedura *S. cerevisiae* Bouquet.

4. CONCLUSÃO

As cepas *Saccharomyces* estudadas apresentaram [1] teores detectáveis de acetato de isoamila, octanoato de etila e álcool isoamílico que contribuem com notas frutais e doce; [2] elevados teores de etanol no *headspace*; [3] a cepa *S. cerevisiae* Bouquet não apresentou um perfil de voláteis no *headspace* agradável na análise sensorial olfativa e [4] uma baixa somatória de ésteres na amostra influencia negativamente na qualidade aromática da bebida.

5. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13.170: Teste de Ordenação em Análise Sensorial**. São Paulo: ABNT, 7 p. 1994.

ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effect of the initial nitrogen content in apple wine processing (*in press*). **Brazilian Journal Food Technology**, São Paulo. 2011.

ANDORRA, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food and Residual Technology**, Lebensm, v.231, p.215–224. 2010.

BARON, A.; BOHUON, G.; 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.

BEECH, F. English cidermaking : technology, microbiology and biochemistry. **Progress of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.11, p.133-213. 1972.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto 6871, 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**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>>. Acesso em: 09 fevereiro 2011.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Russia. 2010.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M.; Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, Denmark, v.8, p.328–336. 2008.

DRILLEAU, J. F. Consolider les connaissances et maîtriser la qualité du produit fini. **Pomme**, n.23, p.23-25. 1991.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Durham, v.36, p.557–569. 2009.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; VILANOVA, M.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. **Food Research International**, Canadá, v.43, p.2303–2314. 2010.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. 1. ed. Campinas/SP: Ital/Lafise, 2002. p. 116.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Research Technology**, v.222, p.15–25. 2006.

IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas Analíticas**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

LOSCOS, N.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v.55, p.6674-6684. 2007.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24, n.02, p.274-280. 2003.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C. N.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, São Paulo, v.51, n.5. 2007.

NOGUEIRA, A.; LE QUERE, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow Fermentation in French Cider Processing due to Partial Biomass Reduction. **Journal of the Institute of Brewing**, Canadá, v.114, n.2, p.102–110. 2008.

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

PRETORIUS, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. **FEMS Yeast Research**, Denmark, v.16, p.675–729. 2000.

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**, Berkeley, v.79, n.7, p.804-815. 2002.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v.86, p.169–180. 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 4. ed, São Paulo: Livraria Varela. 2010.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v.11, p.139–173. 2005.

SWIEGERS, J. H., FRANCIS, I. L., HERDERICH, M. J., & PRETORIUS, I. S. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: The choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Australian and New Zealand Wine Industry Journal**, v.21, p.34–42. 2006.

UGLIANO, M.; BARTOWSKY, E. J.; MCCARTHY, J.; MOIO, L.; HENSCHKE, P. A. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Davis, v.54, n.17, p.6322–6331. 2006.

VALERO, E.; SCHULLER, D.; CAMBON, B.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. **FEMS Yeast Research**, Denmark, v.5, p.959–969. 2005.

VILA NOVA, M.; SIEIRO, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Durham, v.33, p.929–933. 2006.

XU, Y.; ZHAO, G. A.; WANG, L. P. Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis*

yeast species. **Journal Industrial of Microbiology and Biotechnology**, China, v.33, p.192-196. 2006.

WONDRA, M.; BOVERIC, M. Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.2, p.141–148. 2001.

WIECHETECK, F. V. B.; NOGUEIRA, A.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçãs. **Publicatio UEPG. Ciências exatas e da terra, ciências agrárias e engenharias**, Ponta Grossa - PR, v.11, n.1, p.27-34. 2005.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.32, n.4, p.775-786. 1989.

CAPÍTULO IV: Avaliação dos compostos voláteis do *headspace* de fermentados de maçã produzidos por fermentações mistas e sequenciais.

**AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO HEADSPACE DE
FERMENTADOS DE MAÇÃ PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÕES MISTAS E
SEQUENCIAIS.**

**EVALUATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN HEADSPACE OF APPLE WINE
PRODUCED BY MIST AND SEQUENTIAL FERMENTATION.**

RESUMO

A fermentação sequencial sob ação de leveduras oxidativas e fermentativas tem sido proposta como uma maneira de melhorar a qualidade de bebidas fermentadas. Neste trabalho foram avaliadas fermentações mistas de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora uvarum*, e de *Saccharomyces cerevisiae* com *Hanseniaspora guilliermondii*, utilizando-se de inoculações sequenciais diferenciadas. Foi utilizado mosto de maçã da cv. Gala e foi monitorado o crescimento das cepas, parâmetros físico-químicos e cinéticos ao longo de 10 dias de fermentação. A técnica de *headspace* foi utilizada para a extração dos compostos voláteis, que por cromatografia gasosa foram identificados e quantificados nos fermentados obtidos em de cada ensaio realizado. Os resultados evidenciaram que houve uma boa interação entre as leveduras fermentativas e oxidativas, pois os fermentados obtidos além de apresentarem grau alcoólico adequado, mantiveram a presença de açúcares residuais, característica desejável ao produto. Os compostos voláteis identificados, foram principalmente do grupo dos ésteres, considerados responsáveis por aromas frutais e florais, que contribuem para a qualidade aromática da bebida. Desta forma, os ensaios de culturas mistas, revelaram a possibilidade de obter um produto de boa qualidade sensorial.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, voláteis, fermentação.

ABSTRACT

Fermentation sequential under on action of oxidative and fermentative yeasts has been proposed as a way to improve the quality of fermented beverages. In this study it was evaluated mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii*, using different sequential inoculations. It was used the apple must from cv. Gala and it was monitored the strains growth, the physico-chemical and kinetic parameters along the 10 days of fermentation. The headspace technique was used for the extraction of volatile compounds, that were identified

and quantified by gas chromatography in the fermented obtained in each test performed. The results showed that there was good interaction between fermentative and oxidative yeasts, beyond the fermented obtained presenting adequate alcoholic content, maintained the presence of residual sugar, desirable feature to the product. The volatile compounds identified were mainly of the group esters, held responsible for fruity and floral aromas, which contribute to the aromatic quality of the beverage. In this way, tests of mixed cultures, revealed the possibility of obtain a product with good sensory quality.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, volatiles, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

A produção de sidra francesa, considerada a melhor do mundo, ocorre em duas fases, sendo a primeira chamada de oxidativa e posteriormente a fase fermentativa. A atividade inicial das leveduras oxidativas é considerada importante para o perfil aromático dos vinhos, devido ao fato destas leveduras serem responsáveis por diferentes reações enzimáticas desenvolvendo uma ampla quantidade de produtos finais voláteis e não voláteis (NOGUEIRA et al., 2003; ROMANO et al., 2003; CIANI et al., 2006; DOMÍZIO et al., 2007).

A fermentação mista de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* (oxidativas) tem recebido muita atenção devido à sua habilidade de prover características individuais de *flavour* ao produto final. O efeito da interação de levedura oxidativa e fermentativa na fermentação da sidra se mostrou eficiente na produção de aromas se for ajustado o tempo de inóculo das duas leveduras. A interação levedura-levedura influencia o crescimento das cepas, impactando na eficiência do processo e qualidade do produto final. A fermentação mista com tempos de inoculação corretamente ajustados resulta em uma melhor eficiência de conversão alcoólica (3,47%), com teores de açúcares residuais (3,88%) agradáveis para o produto final e um tempo de fermentação viável para o processo (XU et al., 2006).

Com relação aos compostos voláteis do produto fermentado, os ésteres são descritos como os melhores contribuintes para características de odor frutado no *bouquet* do vinho. Ésteres de acetato como acetato de etila, acetato de hexila, acetato de isoamila e acetato de 2-fenil-etila são importantes compostos do *flavour* dos vinhos e outras bebidas alcoólicas, e podem ser formados em concentrações relativamente altas por leveduras oxidativas (RAPP e MANDERY, 1986; ROJAS et al., 2003).

As leveduras do gênero *Hanseniaspora* são as melhores produtoras de ésteres de acetato, principalmente acetato de 2-fenil-etila, quando comparada com os gêneros *Cândida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (VIANA, 2008). Em fermentações mistas, Xu et al. (2006) encontraram que as cepas de *Hanseniaspora valbyensis* produzem altos teores de etil-ésteres e as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* produzem altas quantidades de álcoois, e o resultado final destes teores é uma contribuição positiva no produto final. Os maiores ésteres formados são etil-acetato e fenil-etil-acetato (considerados os maiores impactantes no aroma); e os álcoois são álcool isoamílico e álcool isobutílico.

A maior parte dos trabalhos sobre o processamento e a qualidade da sidra no Brasil, tem sido desenvolvida por enólogos contratados pelas indústrias interessadas na comercialização das frutas, visando o processamento das maçãs de descarte (NOGUEIRA et al., 2007). Assim, encontra-se uma lacuna na elaboração de fermentado de maçã nas condições brasileiras de processamento, com a utilização de fermentações com cepas oxidativas e fermentativas, em inoculações sequenciais.

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a ação de leveduras oxidativas e fermentativas em fermentações mistas e sequenciais nos compostos voláteis e parâmetros físico-químicos, assim como a análise sensorial dos produtos obtidos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS BIOLÓGICOS

Foram utilizadas amostras de maçãs da cultivar Gala (90 Kg) obtidas no comércio local da cidade de Ponta Grossa, Paraná.

A levedura fermentativa utilizada foi *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fabricante AEB Group). As leveduras oxidativa: *Hanseniaspora uvarum* e *Hanseniaspora guilliermondii* foram doadas pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Londrina e depois de identificadas foram conservadas em tubos inclinados contendo *yeast malt agar* (YMA) à temperatura de 7-10°C. Os meios de cultura, reativos e padrões utilizados nas análises foram de pureza comprovada.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Processos

Processamento do mosto de maçã. As maçãs foram selecionadas, lavadas e sanitizadas mantendo-as submersas por 40 minutos em solução de bicarbonato de sódio a

6000 mg.L⁻¹ e depois por 5 minutos à 5°C em solução de hipoclorito a 150 mg.L⁻¹. Depois de enxaguadas em água corrente foram trituradas em microprocessador (Processador Metvisa, Tipo MPA) e a massa ralada foi acondicionada em pacotes de tela plástica porosa que após superpostos, foram submetidos a uma pressão de 3,0 kgf.cm⁻² (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil) durante 5 minutos. O mosto obtido foi despectinizado com pectinase (Pectinex Ultra SP, Novozymes do Brasil), a uma concentração de 3,0 mL.hL⁻¹ (120 minutos a 20-25°C) e, após sedimentação, trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo, envasado em garrafas de vidro âmbar de 600 mL, lacradas com tampa metálica e pasteurizado (98°C / 30 min) (WOSIACKI et al., 1989).

Processamento do Fermentado de Maçã. O mosto clarificado foi acondicionado em fermentadores de vidro de 1450 mL com volume útil de 1200 mL, esterilizados em autoclave (121°C / 15 min) (Figura 1). No mosto foi adicionado 0,01% do antibiótico cloranfenicol (99%, Fornecedor Henrifarma) para controle do crescimento bacteriano. As leveduras foram inoculadas com uma população inicial de aproximadamente 4,0x10⁶ ufc.mL⁻¹ para cepas oxidativas e 2,0x10⁶ ufc.mL⁻¹ para cepas fermentativas, sendo os seguintes ensaios:

- **Ensaio 1:** inóculo de leveduras oxidativas e fermentativas simultaneamente (processo misto);
- **Ensaio 2:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 1 dia;
- **Ensaio 3:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 2 dias;
- **Ensaio 4:** inóculo de leveduras oxidativas no tempo 0 e de leveduras fermentativas no tempo de 3 dias.

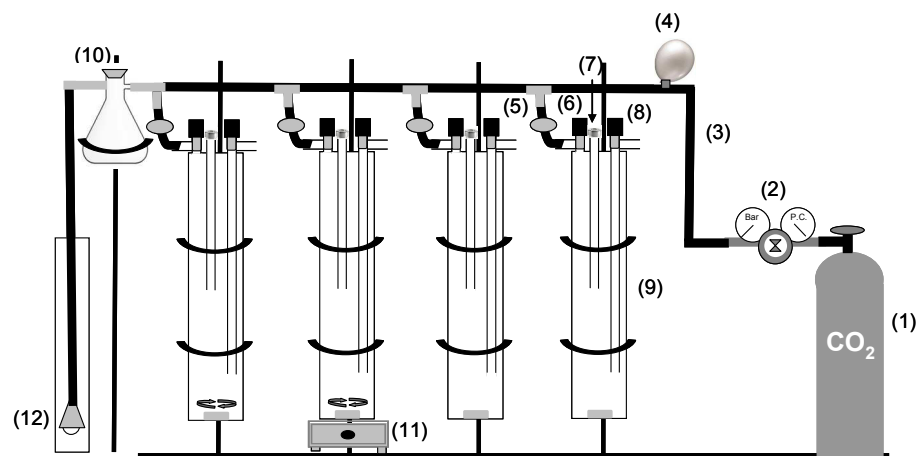


Figura 1. Esquema dos fermentadores em anaerobiose.

(1): Cilindro de gás carbônico para pressurizar sistema. (2): Manômetro. (3): Tubulação de passagem de gás carbônico pelo sistema. (4): Válvula de segurança contra vazamento de gás. (5): Filtro de 0,20 μm . (6): Tampa rosca para entrada de saída de gás no fermentador. (7): Tampa de borracha para inoculação das leveduras no mosto. (8): Válvula de rosca para retirada de amostra. (9): Fermentador de 1450 mL. (10): Recipiente de segurança contra retorno de água no sistema de fermentação. (11): Agitador magnético (Quinis). (12): Batoque para manutenção da anaerobiose no sistema de fermentação.

Para atingir a população das leveduras do gênero *Hanseniaspora* foi utilizada uma colônia isolada em YMA (Merck) e inoculada em 5 mL de Caldo GPBY – *glucose peptone broth yeast* (Merck) e depois de 24h de incubação a 25 °C, esta cultura foi inoculada em 100 mL do mesmo caldo, passando pelo mesmo binômio tempo/temperatura atingindo a população de aproximadamente 10^{12} ufc.mL⁻¹. A partir desta população foi coletado um volume suficiente para obter a população desejada nos fermentadores. As cepas do gênero *Saccharomyces* foram leveduras secas ativas re-hidratadas conforme especificações do fabricante. Ao final, o mosto em fermentação foi centrifugado a 10200 g e 5° C (Centrifuga Himac CR21GII) durante 20 minutos sendo em seguida trasfegado, engarrafado e armazenado em baixa temperatura (-18 °C).

Pontos de amostragem. Nos tempos de fermentação com 0, 1, 2, 3, 5, 7 e 10 dias foram retirados 10 mL de amostras do fermentado para contagem de células; e nos dias 3, 5, 7 e 10 foram retirados 40 mL para análises físico-químicas.

Antes da coleta das amostras o fermentado em cada fermentador era colocado sob agitação na velocidade 3 do agitador (11) durante 20 minutos (Figura 1). A seguir, a saída do fermentador destinada à coleta era desinfetada com álcool 70%, seguida de lavagem com 40 mL de água destilada para retirada do álcool residual, sempre com a tampa rosca (8) fechada.

Para a retirada das amostras o manômetro (2) do cilindro de gás carbônico (1) era aberto para que o aumento da pressão interna de gás carbônico nos fermentadores proporcionasse condições para o fermentado subir no tubo de coleta ligado à válvula de rosca

(8) que era aberta. Os primeiros 7 mL do fermentado correspondentes ao volume total do tubo interno do fermentador, eram desprezados, para afastar a possibilidade de coletar amostra não homogeneizada e permanente no interior de tal tubulação; a seguir realizava-se a coleta do volume acima mencionado em tubos estéreis.

A cinética de fermentação foi calculada pelo monitoramento da perda de massa do fermentado através da liberação de gás carbônico (CO₂), com pesagens dos fermentadores em balança analítica (0,001 g de sensibilidade, Bell Engineering- Mark 1300) até peso constante a temperatura de 20°C (BELY et al.1990; ROGER et al. 2002). A velocidade de fermentação foi obtida através da equação:

$$V = \Delta \text{CO}_2 / \Delta t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

V = Velocidade de fermentação.

ΔCO_2 = Variação de produção de CO₂ corrigida por equação de gráfico.

Δt = Variação de tempo.

2.2.2 Experimentos

Avaliação do efeito da fermentação mista e sequencial de leveduras fermentativas e oxidativas no perfil volátil de fermentados de maçãs. Para realizar a fermentação mista foi colocado um inóculo inicial de $4,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ da levedura oxidativa em quatro fermentadores. A cepa fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* Bouquet (Fabricante AEB Group) foi sendo inoculada sequencialmente nos fermentadores no tempo 0 da fermentação e nos dias 1, 2 e 3 com população inicial de $2,0 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. O experimento foi realizado com *Hanseniaspora uvarum* e com *Hanseniaspora guilliermondii*. Foram avaliados os compostos voláteis do fermentado final (10° dia de fermentação).

2.2.3 Análises Instrumentais

Coleta dos compostos voláteis. A coleta foi realizada pelo método de *headspace*. O frasco para *headspace* de capacidade de 40 mL, contendo 20 mL do fermentado já centrifugado e congelado, foi colocado em banho-maria a 25° C, onde permaneceu por pelo menos 30 minutos. Antes de utilizar a seringa para cromatografia gasosa (SERINGA MICROLITER DE 1000 µL – HAMILTON) a mesma foi lavada por três vezes com ar e após agitação manual do frasco, o primeiro *headspace* coletado foi desprezado. Os compostos voláteis capturados na segunda coleta do *headspace* foram injetados diretamente no cromatógrafo gasoso. Após cada injeção a seringa foi lavada com ar por pelo menos 20 vezes.

Análise de compostos voláteis. Para identificação e quantificação dos compostos voláteis de sucos e fermentados de maçã foi utilizado um Cromatógrafo Gasoso da marca Shimadzu modelo GC-17A equipado com detector por ionização de chama-FID e coluna Capilar (Dimensões: 0,32 mm x 1,0 µm x 30 m, Supelco) localizado na Universidade Federal do Paraná. O nitrogênio foi usado como gás carreador com fluxo na coluna de 1,5 mL.min⁻¹, a técnica de injeção foi split 1:5, a temperatura do forno foi programada para 40 °C (durante 5 minutos) com aumento de 20 °C.min⁻¹ até 150 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A temperatura do injetor e do detector foi de 230 °C. Os compostos foram identificados comparando o tempo de retenção com os picos obtidos dos padrões.

Os compostos padrões utilizados são de pureza comprovada e foram os seguintes: acetaldeído, etanol, laurato de etila, álcool isoamílico, acetato de etila, acetato de isopropila, acetato de propila, 2-metil-1-butanol, etil-isobutirato, acetato de isobutila, hexanona, etil-butirato, 2-hexanol, lactato de etila, acetato de butila, ácido butírico, 1-hexanol, acetato de isoamila, propionato de isobutila, 2-heptanona, etil-propionato, 2-octanona, 2-octanol, etil-3-hexanoato, acetato de hexila, 2-fenil-etanol, ácido caprílico, succinato de dietila, octanoato de etila e decanoato de etila.

2.2.4 Análises físico-químicas

Nos pontos 0, 3, 5, 7 e 10 dias foram realizadas análises de **açúcares redutores** quantificados pelo método químico clássico de Somogyi-Nelson assim como os açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1 N (50 °C / 5 min) e **álcool** através do uso do ebuliômetro. A **acidez titulável total** foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,33 com fenolftaleína e calculada como ácido málico, sendo expresso em g.100 mL⁻¹, e a **acidez volátil** foi calculada como ácido acético e expressa em g.100 mL⁻¹. O **nitrogênio total** foi determinado pelo método de Kjeldhal (BARON et al.,1977; IAL, 2008).

2.2.5 Análises microbiológicas

As amostras dos fermentados de maçã foram coletadas e preparadas para contagem microbiológica conforme recomendado por Silva et al. (2010). Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%, e semeadas em superfície, com alça de Drigalski, no meio seletivo para leveduras oxidativas YA-LYS (*Yeast agar* – lisina) (NOGUEIRA, 2003) e no meio agar malte que permite a diferenciação das colônias de fermentativas e oxidativas. As

placas foram incubadas a 25°C por 48 horas. Para a contagem foram consideradas as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias típicas da levedura considerada, respeitando a diluição correspondente. O resultado foi expresso em unidades formadoras de colônias por mL (ufc.mL⁻¹). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* de Ponta Grossa.

2.2.6 Análise sensorial

Ensaio 1. Nos 4 produtos obtidos a partir de diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* Bouquet sobre a levedura oxidativa *Hanseniaspora uvarum* em fermentações mista e sequenciais foram realizadas análise olfativa de ordenação por preferência, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002).

Ensaio 2. Nos 4 produtos obtidos a partir de diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* Bouquet sobre a levedura oxidativa *Hanseniaspora guilliermondii* em fermentações mista e sequenciais foram realizadas análise olfativa de ordenação por preferência, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), e teste de aceitação com escala hedônica de 7 pontos segundo metodologia descrita por Faria e Yotsuyanagi (2002).

Ensaio 3. Foi realizada análise olfativa de preferência pareada, segundo NBR 13.170 (ABNT, 1994), entre os dois produtos preferidos dos testes 1 e 2.

As fichas utilizadas na análise sensorial estão no Anexo A. Para cada ensaio participaram das análises 50 julgadores.

2.2.7 Análises estatísticas

Foram feitas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$) para diferenciação de médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizando os resultados físico-químicos do mosto (Tabela 1), pode-se dizer que, pelo teor de nitrogênio, que na maçã está na forma de aminoácidos, o mosto é classificado com elevado teor ($>150 \text{ mg.L}^{-1}$) (NOGUEIRA et al., 2007). As leveduras *Saccharomyces* sp. e não-*Saccharomyces* utilizam no seu crescimento teores entre 50-70 e 30-40 mg.L^{-1} de nitrogênio, respectivamente (NOGUEIRA, 2003). Desta forma, esta concentração de nitrogênio total não caracteriza este nutriente como um fator limitante de crescimento, existindo teor suficiente para inoculação das duas leveduras neste mosto, porém o seu residual

pode afetar a estabilidade microbiológica durante o armazenamento em bebidas que não receberam tratamento térmico, podendo ocorrer, alterações na qualidade do produto final (LEA e DRILLEAU, 2003). Pode ser observado que o mosto de maçã da cultivar Gala, utilizado como meio de fermentação por leveduras apiculadas, apresentou baixo teor de açúcares ($9,78 \text{ g.100mL}^{-1}$) (Tabela 1), quando comparado com os resultados de Wosiacki et al. (2008) que encontrou um valor médio para a mesma cultivar de $11,78 \pm 2,24 \text{ g.100mL}^{-1}$. Isto atesta que o grau de maturidade da fruta utilizada para o processamento do suco não estava no seu estágio completo de maturação o que pode afetar o rendimento de etanol. A acidez total expressa em ácido málico do mosto da cultivar Gala ($0,28 \text{ g.100mL}^{-1}$) classifica-o como baixa acidez ou doce (PAGANINI et al., 2004). Este fator pode ser prejudicial para o produto final, uma vez que valores maiores de acidez resultam em um fermentado com maior frescor (NOGUEIRA e WOSIACKI, 2010).

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas do mosto de maçã da cultivar Gala.

Análises	Resultados
Nitrogênio (mg.L^{-1})	$153,47 \pm 0,02$
Acidez Total (g.100mL^{-1} ác. málico)	$0,34 \pm 0,004$
Acidez Volátil (g.100mL^{-1} ác. acético)	$0,02 \pm 0,008$
Açúcares redutores (g.100mL^{-1})	$9,23 \pm 0,09$
Açúcares redutores totais (g.100mL^{-1})	$9,78 \pm 0,05$

No ensaio 1 ocorreu a maior contagem de *S.cerevisiae* em ufc.mL^{-1} , evidenciando que a presença da *H.uvarum*, no início do processo fermentativo, incrementou o seu crescimento. No entanto, para a cepa oxidativa a presença da *S.cerevisiae*, não permitiu que a mesma obtivesse sua maior população em ufc.mL^{-1} , o que foi obtido apenas no ensaio 3, quando a cepa fermentativa foi inoculada após 2 dias de fermentação. Estes resultados demonstram que as duas cepas se comportam bem em ensaios multi-culturas, não existindo influência de uma sobre a outra. E também percebe-se que a cepa *H. uvarum* foi tolerante aos teores de etanol no final do processo.

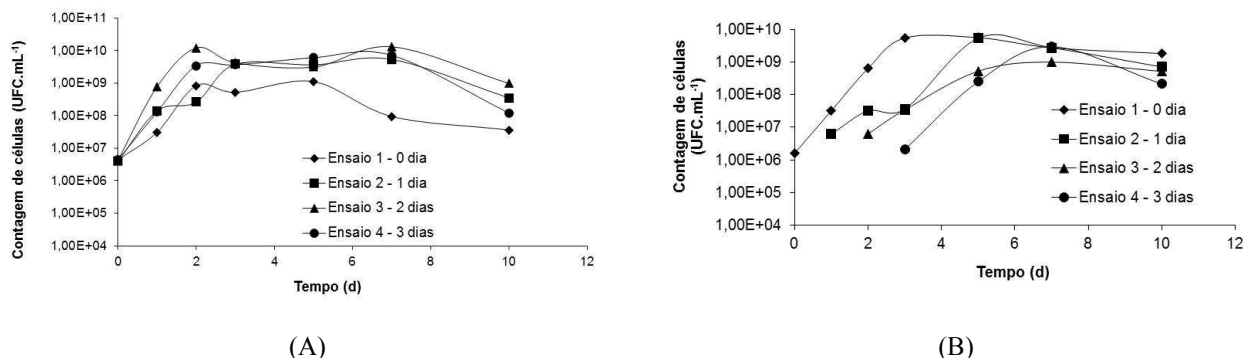


Figura 2. Contagem de células nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. uvarum*. A) Contagem de células de *H. uvarum*. B) Contagem de células de *S. cerevisiae*.

Percebe-se que as leveduras *Hanseniaspora uvarum* não são suplantadas pelas *Saccharomyces* até o 10^o dia de fermentação, exatamente como ocorre em processo natural, onde as *S. cerevisiae* estão sob a influência de várias cepas oxidativas (Figura 2). As cepas alcançaram populações máximas ao redor de 10^9 ufc.mL⁻¹ para as oxidativas e fermentativas. Os dados obtidos neste trabalho estão em discordância com Ciani et al. (2006), que analisando fermentações mistas e sequenciais de *H. uvarum*/*S. cerevisiae* encontrou que a fermentação sequencial exibe uma persistência e uma quantidade de células maior do que fermentação mista.

A cepa *H. guilliermondii* demonstrou um comportamento diferente de *H. uvarum*, pois as cepas fermentativas alcançaram população mais alta (aproximadamente 10^{10} ufc.mL⁻¹) (Figura 3). Também não ocorreu suplantação de células até o décimo dia de processo. O diferencial foi uma diminuição da população final de *S. cerevisiae* no ensaio 1 – fermentação mista. Estes resultados demonstram um alto crescimento de leveduras fermentativas, pois em ensaios de fermentação puras estas cepas não chegam a atingir esta população, ficando em aproximadamente 10^7 ufc.mL⁻¹ (NOGUEIRA et al. 2007). É possível verificar que estas duas cepas também se comportam bem em fermentações mistas, e a levedura *H. guilliermondii*, assim como a *H. uvarum*, tolerou os níveis de etanol no final do processo.

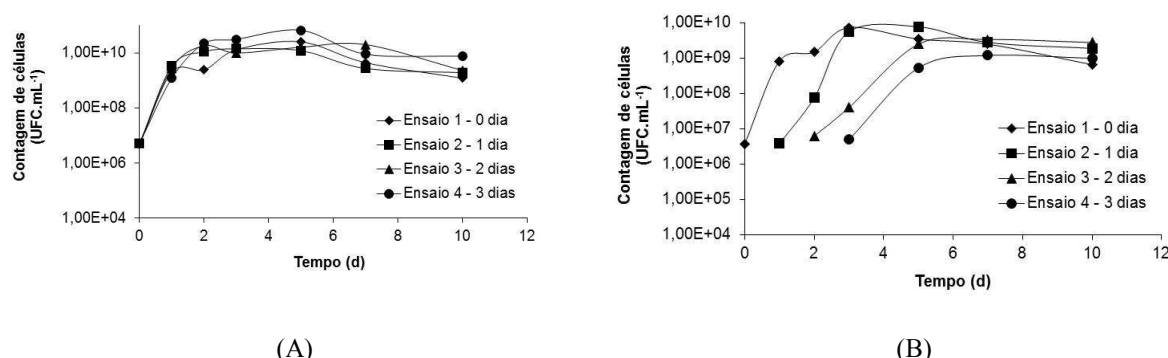


Figura 3. Contagem de células nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. guilliermondii*. A) Contagem de células de *H. guilliermondii*. B) Contagem de células de *S. cerevisiae*.

Analisando a evolução de etanol na fermentação sequencial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* (Figura 4B), percebe-se que o único ensaio que estabilizou o teor antes do 10º dia foi o ensaio 1 – fermentação mista. Os outros ensaios continuaram produzindo etanol a partir de açúcar até a finalização do processo. Mesmo com os teores atingidos permaneceram açúcares residuais no produto. Todos os ensaios mantiveram açúcares residuais no produto final, sendo que o ensaio que teve maior teor residual foi o 3 (*H. uvarum* + *S. cerevisiae* 2d).

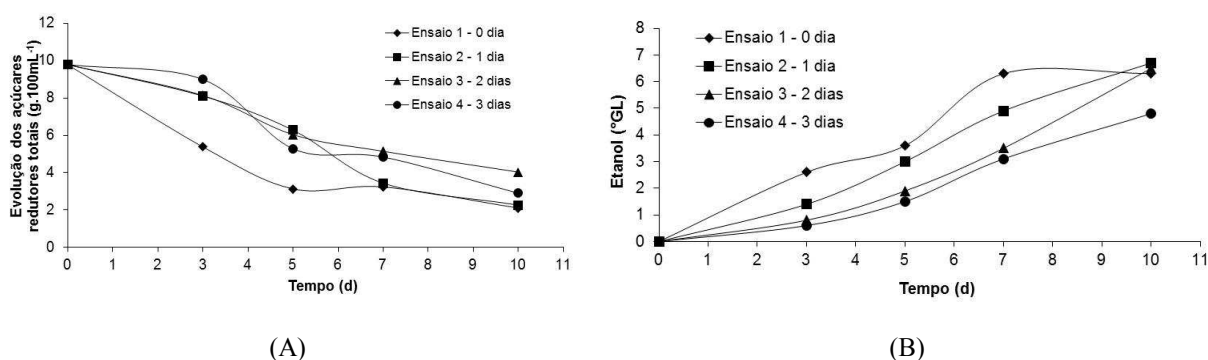


Figura 4. Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. uvarum*. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.

Observa-se que para a evolução de etanol em *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* (Figura 5) todos os ensaios atingiram o teor maior que o processo permitiu no 10º dia sem perceptível estabilização, e ainda permaneceram açúcares residuais no produto. O ensaio 4 foi o que manteve maior teor de açúcares residuais (*H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 3 dias).

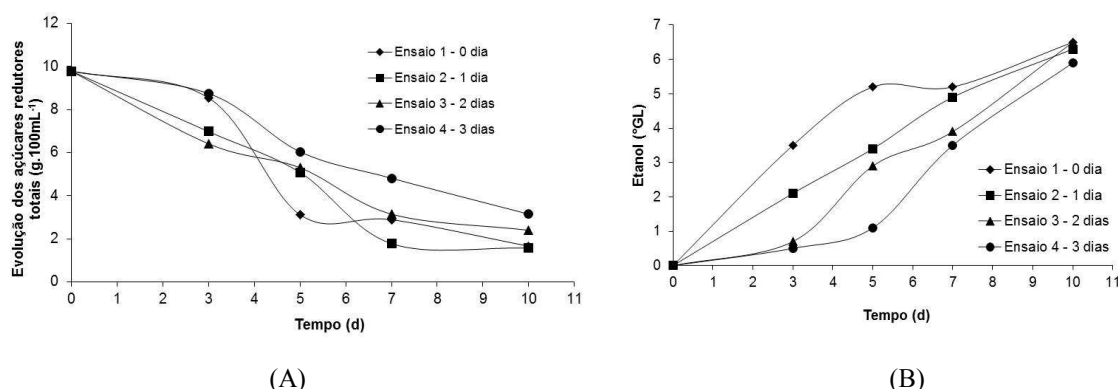


Figura 5. Evolução de açúcares e etanol nos diferentes fermentados de maçã realizados com diferentes tempos de inóculo da cepa *S. cerevisiae* sobre a cepa *H. guilliermondii*. A) Evolução dos açúcares redutores totais. B) Evolução de etanol.

Percebe-se que a maior velocidade de fermentação foi obtida no ensaio 1 de *H. uvarum* – fermentação mista (Tabela 2), provavelmente a ação das duas leveduras juntas no mosto favorece o andamento do processo fermentativo. Percebe-se também que à medida que

aumentou o tempo de inoculação de *S. cerevisiae* no mosto, a velocidade de fermentação foi reduzida. Esta relação não é perceptível na relação de consumo de açúcares X produção de etanol, o que pode ser devido à produção de metabólitos secundários do processo fermentativo.

Tabela 2. Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet.

Ensaio (dias)	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo V máx (dias)
0	11,91	2,75
1	9,32	3,5
2	8,05	4,25
3	7,46	7

Os resultados para velocidade da fermentação realizada sob ação de *H. guilliermondii* e *S. cerevisiae* foram semelhantes ao encontrado para fermentação sequencial com *H. uvarum*, sendo a maior velocidade máxima encontrada no ensaio 1 – 0 dia, e esta é decrescente à medida que aumenta o tempo de inoculação de *S. cerevisiae*. Neste ensaio é possível perceber uma possível relação entre estes dados e o consumo de açúcares X produção de etanol, que também decresce com o aumento do tempo de inóculo de *S. cerevisiae*.

Tabela 3. Resultados de velocidade máxima dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae* Bouquet.

Ensaio (dias)	V máx (gCO ₂ .L ⁻¹ .d ⁻¹)	Tempo V máx (dias)
0	14,54	1,75
1	10,14	3
2	8,49	5
3	6,47	5

É possível verificar a evolução dos compostos do mosto dos fermentados sequenciais sob a ação de leveduras *H. uvarum* e *H. guilliermondii* (Tabela 4 e 5). Verificando primeiramente o teor de nitrogênio percebe-se que houve um consumo de aproximadamente 88 mg.L⁻¹ para a cepa *H. uvarum* e 84 mg.L⁻¹ para *H. guilliermondii*, estando em concordância com a literatura em todos os ensaios estudados (NOGUEIRA, 2003). Todos os ensaios permaneceram com açúcares residuais, sendo o ensaio de 2 dias o que menos consumiu açúcares durante o processo, mas contrariamente produziu um teor alto de álcool quando comparado com os outros ensaios.

Tabela 4. Resultados das análises físico-químicas (10ºdia) dos fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S.cerevisiae* Bouquet.

Análises	Tempo de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>			
	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	69,34±5,99 ^a	69,34±5,99 ^a	66,57±4,53 ^a	63,79±4,53 ^a
Acidez Total (g.100mL ⁻¹ ác. málico)	0,36±0,00 ^a	0,38±0,02 ^a	0,39±0,01 ^a	0,32±0,00 ^b
Acidez Volátil (g.100mL ⁻¹ ác. acético)	0,03±0,01 ^b	0,05±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a	0,05±0,01 ^a
Açúcares redutores (g.100mL ⁻¹)	0,78±0,03 ^c	0,79±0,01 ^c	1,23±0,06 ^b	1,51±0,01 ^a
Açúcares redutores totais (g.100mL ⁻¹)	2,11±0,08 ^c	2,27±0,02 ^c	4,04±0,02 ^a	2,90±0,02 ^b
Etanol (°GL)	6,3	6,7	6,5	4,8

NOTA: ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de fermentados (p < 0,05).

Houve um aumento no conteúdo de acidez expressa em ácido málico nos ensaios exceto no tempo de 3 dias na ação de *H. uvarum* e um aumento da acidez volátil devido à síntese de ácido acético e acetato de etila nos produtos fermentados. O composto acetato de etila não foi identificado em todos os produtos resultantes de fermentações sequenciais, mas foi identificado exatamente nos dois produtos em que ocorreu maior aumento, *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 0 dia e *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 1 dia. As leveduras *Hanseniaspora* são conhecidas por serem altamente produtoras de ácido acético e acetato de etila (CSOMA e SIPICZKI, 2008).

Tabela 5. Resultados das análises físico-químicas (10ºdia) do fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de leveduras *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S.cerevisiae* Bouquet.

Análises	Tempo de inóculo de <i>S. cerevisiae</i>			
	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Nitrogênio (mg.L ⁻¹)	64,72 ± 2,62 ^a	73,96 ± 2,62 ^a	68,42 ± 3,46 ^a	72,11 ± 2,26 ^a
Acidez Total (g.100mL ⁻¹ ác. málico)	0,36 ± 0,00 ^a	0,38 ± 0,02 ^a	0,39 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,00 ^a
Acidez Volátil (g.100mL ⁻¹ ác. acético)	0,07 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,01 ^a
Açúcares redutores (g.100mL ⁻¹)	0,18±0,007 ^d	0,40±0,004 ^c	0,59±0,009 ^b	1,12±0,01 ^a
Açúcares redutores totais (g.100mL ⁻¹)	1,66±0,009 ^c	1,57±0,04 ^c	2,40±0,03 ^b	3,15±0,07 ^a
Etanol (°GL)	6,5	6,3	6,5	5,9

NOTA: ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras de fermentados (p < 0,05).

O método de *headspace* permitiu captar poucos compostos quando comparado com dados da literatura, que comentam que fermentações mistas e sequenciais favorecem a formação de compostos aromáticos devido à ação conjunta das cepas (Tabelas 6 e 7). É também perceptível que o tempo de inóculo da levedura *S. cerevisiae* sobre a levedura oxidativa influencia no perfil de compostos já que foram determinadas diferenças significativas entre os compostos de cada ensaio. Estes resultados estão em concordância com o trabalho de Xu et al. (2006) que analisaram a ação de fermentações sequenciais com cepas de *H.valbiensis* e *S. cerevisiae* sobre os compostos aromáticos.

Segundo Rodriguez et al. (2010) as fermentações sequenciais de vinhos utilizando leveduras fermentativas e oxidativas tiveram maior produção de álcoois superiores e de ésteres. A análise sensorial evidenciou que os vinhos obtidos de fermentações puras ou simultâneas foram estatisticamente iguais. Eles foram caracterizados como aroma de solvente, forte, levemente frutal e floral. Já as fermentações sequenciais foram descritas como intensamente frutais e florais, e levemente notas de solvente. Neste trabalho observou-se que os tempos de inoculação de *S. cerevisiae* de 1 e 3 dias apresentaram teores detectáveis de acetaldeído, normalmente conhecido como um subproduto da fermentação alcoólica e sua produção pode ser influenciada pela cepa de levedura (Tabela 6). Em concentrações menores o acetaldeído contribui com notas frutais, entretanto em altas concentrações ($>200 \text{ mg.L}^{-1}$) este composto influencia negativamente o aroma do vinho (GIL et al. 2006).

Segundo Garden-Cerdan e Ancin-Azpilicueta (2006), as cepas selvagens ou não-*Saccharomyces* pouco contribuem para a formação de álcool isoamílico (composto que contribui para o aroma frutal), o que é contraditório aos resultados deste trabalho, pois os teores de álcool isoamílico aumentaram com o aumento do tempo de inoculação da levedura fermentativa, o que sugere que um maior tempo de ação das leveduras oxidativas favorece a formação deste composto. A amostra de 0 dia (fermentação mista) não apresentou teores detectáveis de 2-octanona e etil-3-hexanoato, a amostra de tempo 3 dias para inoculação de *S. cerevisiae* não apresentou teores detectáveis de acetato de propila. As amostras de 2 e 3 dias não apresentaram octanoato de etila e decanoato de etila, sendo que estes compostos são altamente contribuintes ao aroma final com notas frutais (CORTES e BLANCO, 2010).

Tabela 6. Concentração dos compostos voláteis detectados nas amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*.

Compostos Voláteis*	<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Ésteres				
Acetato de propila	0,06 ^a	0,08 ^a	0,07 ^a	0,10 ^a
Decanoato de etila	0,15 ^a	0,08 ^b	nd	nd
Etil-3-hexanoato	nd	0,08 ^a	0,08 ^a	0,10 ^a
Octanoato de etila	0,08 ^a	0,08 ^a	nd	nd
Aldeídos				
Acetaldeído	nd	0,06 ^a	nd	0,06 ^a
Álcoois				
Álcool isoamílico	0,38 ^d	3,31 ^c	5,27 ^b	6,13 ^a
Etanol	27,53 ^d	67,67 ^a	63,29 ^b	53,37 ^c
1-hexanol	0,18 ^b	0,37 ^a	0,37 ^a	0,33 ^a
Cetonas				
2-octanona	nd	0,08 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a
Não identificados				
1	0,11 ^b	0,19 ^a	0,19 ^a	0,13 ^b
2	nd	nd	0,09	nd
3	0,09 ^c	nd	0,37 ^b	0,92 ^a
TOTAL	28,58	71,93	69,79	61,20

NOTA: nd = não detectado, * mg equivalente de etanol.L⁻¹ de *headspace*; ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras (p < 0,05).

Existe uma grande variação na somatória de teores de compostos voláteis, a amostra de 1 dia (maior somatória) possui uma concentração total 2,5 vezes maior que a amostra 0 dia (menor somatória), mas ainda assim não foi considerada a preferida, o que comprova que o importante para uma qualidade aromática é a combinação de compostos com contribuição aromática favorável, e não a quantidade de compostos existentes.

Analisando os resultados de voláteis para fermentação sequencial sob ação da cepa *H. guilliermondii* (Tabela 7), percebe-se que a amostra de 1 dia para inoculação de *S. cerevisiae* apresentou os maiores teores de etanol. As amostras de 1, 2 e 3 dias não apresentaram teores detectáveis de acetato de propila. As amostras 0, 1 e 3 dias não apresentaram acetato de isoamila, que é um composto influente para o aroma de bebidas fermentadas, com notas frutais e doce.

A concentração do acetato de etila é influenciada pelo conteúdo de ácido acético, assim suas maiores concentrações foram detectadas nos produtos com maiores teores desse ácido, 0 e 1 dia.

Nestes resultados também se encontrou que a quantidade total nem sempre é sinônimo de melhor qualidade, pois a amostra que foi considerada preferida na análise sensorial olfativa não possui a maior somatória de compostos voláteis detectados.

Tabela 7. Concentração dos compostos voláteis detectados nas amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*.

Compostos Voláteis*	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i>			
	0 dia	1 dia	2 dias	3 dias
Ésteres				
Acetato de etila	0,13 ^a	0,44 ^b	nd	nd
Acetato de isoamila	nd	nd	0,17	nd
Acetato de propila	0,06	nd	nd	nd
Álcoois				
Álcool isoamílico	0,15 ^c	0,39 ^b	0,62 ^a	0,55 ^{a,b}
Etanol	29,65 ^b	38,17 ^a	27,38 ^{b,c}	24,91 ^c
1-hexanol	0,20 ^a	0,22 ^a	nd	0,11 ^b
Não identificados				
1	0,12 ^a	0,14 ^a	nd	nd
2	nd	nd	nd	0,11
3	0,75 ^a	0,18 ^c	nd	0,22 ^b
TOTAL	31,06	39,54	28,17	25,90

NOTA: nd = não detectado, * mg equivalente de etanol.L⁻¹ de *headspace*; ^{a,b,c,d} = letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre as quantidades existentes nas amostras (p < 0,05).

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados de compostos voláteis do mosto usando como método de coleta o *headspace*. Foram quantificados 3 compostos mas estes não foram identificados, o que pode ser devido à falta de padrões analisados destes compostos, ou pelo próprio processo de pasteurização. Isto comprova que todos os compostos que foram identificados nos produtos fermentados foram provenientes do metabolismo secundário das leveduras. Diversos estudos têm demonstrado que o processo de pasteurização pode causar perdas de compostos voláteis tanto no suco de maçã quanto na sidra. Nesse sentido Janzantii et al.(2003), registraram perda total de octanoato de isoamila e de mais de 15 compostos não identificados em seus experimentos em suco clarificado de maçã Fuji. Já Boylston et al. (2003) realizaram estudos em sidra e concluíram que a pasteurização realmente afeta os atributos sensoriais da bebida.

Tabela 8. Concentração de compostos voláteis no mosto de maçã.

Composto volátil	Concentração*
N	0,09
N	0,08
N	0,16

NOTA: N = não identificado, * mg equivalente de etanol.L⁻¹ de *headspace*.

A inclusão de leveduras oxidativas nas fermentações de bebidas tem sido sugeridas como uma proposta de melhoria na complexidade aromática destes produtos (CIANI et al.,

2006). Segundo Xu et al. (2006) a fermentação mista com tempos de inoculação corretamente ajustados resulta em melhores características para o produto final.

Avaliando, neste trabalho, o tempo ideal de inoculação da cepa *Saccharomyces* sobre a cepa *Hanseniaspora uvarum* segundo o parâmetro sensorial (Tabela 9), foi observado que o tempo de 1 dia teve a maior somatória de notas sendo o menos preferido dos julgadores e o tempo de 2 dias teve a menor nota sendo o mais aromático, mas de acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre as amostras.

Tabela 9. Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. uvarum* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*.

Fermentados de maçã	Inóculo de <i>S. cerevisiae</i> (dias)	Σ das ordens
A	0	132 ^a
B	1	142 ^a
C	2	128 ^a
D	3	133 ^a

NOTA: ^a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, $p < 0,05$).

Analisando os resultados do teste sensorial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* verificou-se que a porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 27,78 % e 72,22 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã sobre a ação destas leveduras, 50,00 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 72,22 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem. E 40,00 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* 3º dia ter sido preferido um maior número de vezes, realizamos o testes de aceitabilidade com este produto. A média de aceitabilidade para a amostra foi de 4,98 (50 julgamentos), correspondendo a um percentual de 71,14%. Considerando como resultados positivos para o teste de aceitabilidade os níveis hedônicos gostei, gostei muito e gostei muitíssimo, a somatória de respostas nestas classificações foi de 62%, não atendendo assim o perfil dos julgadores (Figura 6). Este resultado pode estar relacionado a uma baixa somatória de ésteres e alta somatória de álcoois nesta amostra, sugerindo que os ésteres são compostos mais impactantes na análise olfativa de bebidas fermentadas.

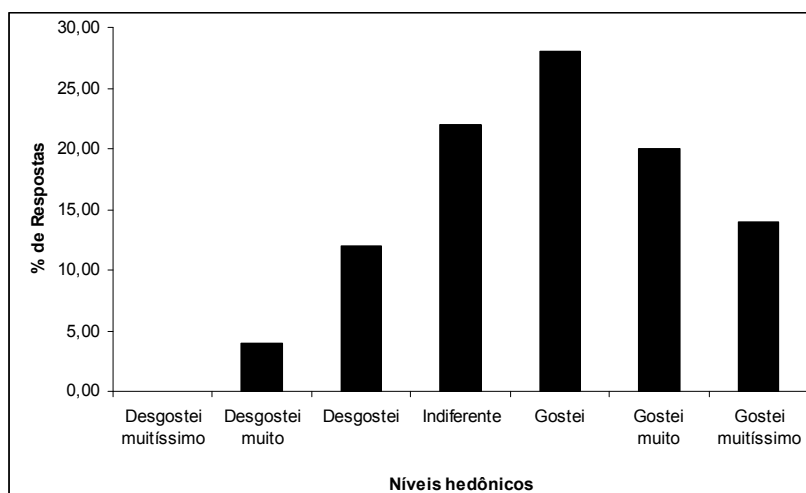


Figura 6. Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* 3º dia.

Avaliando tempo ideal de inoculação da cepa *Saccharomyces* sobre a cepa *H. guilliermondii*, sob o parâmetro sensorial (Tabela 10) percebemos que o tempo de 3 dias obteve maior somatória sendo o menos preferido pelos julgadores. Já o tempo de inoculação de 1 dia foi considerado o melhor aroma, mas segundo as análises estatísticas não houve diferença significativa entre as amostras.

Tabela 10. Resultado do teste de ordenação por preferência das amostras de quatro fermentados de maçã elaborados por fermentação sequencial de *H. guilliermondii* com diferentes tempos de inóculo de *S. cerevisiae*.

Fermentados de maçã	<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> (dias)	Σ das ordens
A	0	131 ^a
B	1	124 ^a
C	2	126 ^a
D	3	139 ^a

NOTA: ^a = não há diferença significativa entre as amostras com mesma letra (ANOVA, $p < 0,05$).

Entre os resultados da análise sensorial das cepas *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* a porcentagem de homens e mulheres que participaram da avaliação sensorial foi de 21,15 % e 78,85 %, respectivamente. Das pessoas que participaram da avaliação de aceitabilidade do fermentado de maçã, 56,25 % pertenciam à faixa etária menor que 25 anos. Do total de participantes, 83,33 % informaram idade inferior a 35 anos, caracterizando a predominância de público jovem. E 44,68 % afirmaram que raramente consomem vinhos.

Observa-se que não existe diferença significativa na preferência entre as amostras, mas devido ao fato da amostra produzida sob a ação de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 0d ter

sido preferido um maior número de vezes, realizamos o teste de aceitabilidade com este produto. A média de aceitabilidade para a amostra foi de 4,90 (50 julgamentos), correspondendo a um percentual de 70,00%. A somatória das respostas nos níveis gostei, gostei muito e gostei muitíssimo alcançou o valor de 70%, e pode-se assim declarar que esta amostra é adequada ao perfil dos julgadores.

Este resultado sugere que existe uma relação entre a quantidade total de ésteres e álcoois na amostra, pois neste caso a somatória de ésteres foi maior e a somatória de álcoois foi menor do que na bebida considerada preferida da fermentação sequencial de *H. uvarum* + *S. cerevisiae*.

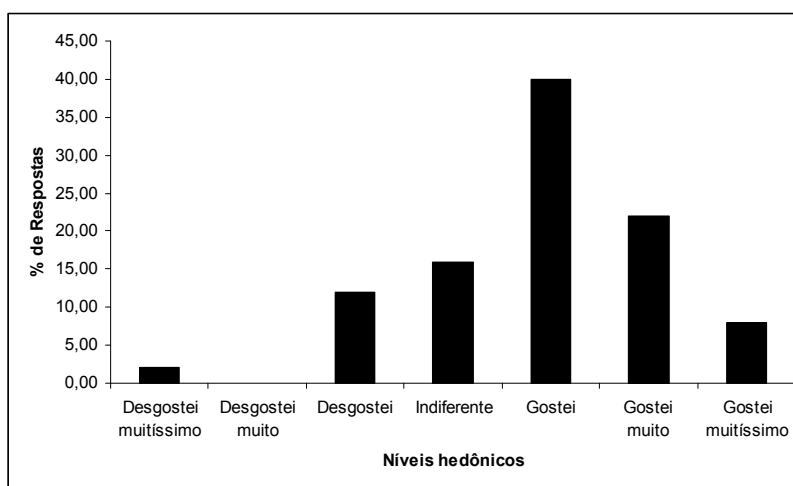


Figura 7. Distribuição das porcentagens de valores de aceitabilidade atribuídos ao fermentado de maçã sob a ação da fermentação sequencial de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 0d.

Para confirmar o pressuposto anteriormente, foi realizada uma análise de preferência pareada entre as duas amostra preferidas nos ensaios anteriores. E, analisando a comparação entre as duas amostras (Tabela 11) é possível observar que a fermentação sequencial com *H. guilliermondii* foi considerada a mais aromática pelos julgadores, pois obteve maior preferência na somatória de pontos.

Tabela 11. Resultado do teste de preferência pareada das amostras de dois fermentados de maçã elaborados pela ação de fermentações sequenciais com diferentes cepas oxidativas e tempos de inóculo de *S. cerevisiae*.

Fermentados de maçã	Σ das ordens
<i>H. uvarum</i> + <i>S. cerevisiae</i> 3d	18 ^a
<i>H. guilliermondii</i> + <i>S. cerevisiae</i> 0d	32 ^b

NOTA: ^{a,b} = há diferença significativa entre as amostras com letras diferentes (ANOVA, $p < 0,05$).

4. CONCLUSÃO

As fermentações sequenciais realizadas sob ação das cepas *H. uvarum* + *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* apresentaram [1] boa interação entre leveduras fermentativas e oxidativas sem apresentar competição no crescimento, [2] as leveduras oxidativas apresentaram resistência a teores de etanol de até 6,7° GL, [3] a fermentação sequencial realizada sob ação de *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* 0d apresentou compostos voláteis com boa aceitação na análise sensorial olfativa e [4] uma maior somatória de ésteres do que de álcoois é mais agradável na análise aromática.

5. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13.170: Teste de Ordenação em Análise Sensorial**. São Paulo: ABNT, 7 p. 1994.

BARON, A.; BOHUON, G.; 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.

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

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing Treatment and Sorbate Addition on the Flavor Characteristics of Apple Cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1924-1931. 2003.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245. 2006.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Russia. 2010.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M.; Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 328–336. 2008.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. 1. ed. Campinas/SP: Ital/Lafise, 2002. p. 116.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Res Technology**, v. 222, p. 15–25. 2006.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos de Madrid” (Spain). **Analitical Chemical Acta**, v. 563, p. 145–153. 2006.

IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas Analíticas**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz. 2008.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523 – 528. 2003.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J.F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented Beverage Production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 02, p. 274-280. 2003.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C. N.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 51, n. 5. 2007.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2010, v. 1, p. 113-142. 2010.

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.

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884. 1986.

RODRIGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 19–25. 2010.

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.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181 – 188. 2003.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169–180. 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2010.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778– 785. 2008.

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

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, n. 4, p. 775–786. 1989.

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 V

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As cepas de *Hanseniaspora* apresentaram teores detectáveis de acetaldeído e álcool isoamílico que contribuem com notas frutais no aroma do produto. Sendo que a cepa *H. guilliermondii* apresentou altos teores detectáveis de propionato de isobutila e laurato de etila que contribuem com notas aromáticas de rum e florais respectivamente.

As cepas *Saccharomyces* estudadas não apresentaram compostos voláteis com aceitabilidade na análise sensorial olfativa, em contrapartida foram as cepas que apresentaram as maiores concentrações de ésteres totais em seus compostos voláteis, mas também com altos teores de álcoois no produto.

As fermentações sequenciais realizadas sob ação das cepas *H. uvarum* + *S. cerevisiae* e *H. guilliermondii* + *S. cerevisiae* apresentaram como característica particular de seus compostos voláteis a formação do composto 1-hexanol e também o álcool isoamílico que contribui com notas frutais, sendo que este último composto teve sua concentração aumentada com o aumento do tempo de inoculação de *S. cerevisiae*. As amostras produzidas sob ação de *H. uvarum* + *S. cerevisiae* após 1, 2 e 3 dias tiveram os maiores teores de etanol no *headspace*. Os produtos resultantes apresentaram boa aceitabilidade na análise sensorial olfativa.

A presença de ésteres no perfil de aromas contribuiu para a qualidade aromática de bebidas fermentadas. Estes compostos quando presentes simultaneamente com altas concentrações de álcoois acabam sendo mascarados, não resultando em boa aceitação aromática.

A amostra produzida sob a ação de fermentação pura com a levedura *Hanseniaspora guilliermondii* apresentou melhor resultado de aceitabilidade na análise sensorial olfativa em todos os produtos avaliados neste trabalho. A particularidade desta amostra foi um alto teor de ésteres totais em baixa presença de álcoois.

2. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 13.170: Teste de Ordenação em Análise Sensorial**. São Paulo: ABNT, 7 p. 1994.

ABPM. Associação Brasileira de Produtores de Maçã. **Dados estatísticos sobre a cultura da macieira**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>> Acesso em: 10 fev, 2011.

ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Effect of the initial nitrogen content in apple wine processing (*in press*). **Brazilian Journal Food Technology**, São Paulo, 2011.

ANDORRA, I.; BERRADRE, M.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M.; ESTEVE-ZARZOSO, B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. **European Food and Residual Technology**, Lebensm, v. 231, p. 215–224. 2010.

BALDWIN, E. A.; SCOTT, J. W.; SHEWMAKER, C. H. K.; SCHUCH, W. Flavour trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **Horticultural Science**, Alexandria, v. 35, p. 1013–1021. 2000.

BARON, A.; BOHUON, G.; 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.

BASTOS, D. H. M.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; MARQUES, M. O. M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 122-129. 2002.

BEECH, F. English cidermaking : technology, microbiology and biochemistry. **Progress of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.11, p.133-213. 1972.

BEECH, F. W.; ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. Yeast in cider-making. **Yeast Technology**, Academic Press: London, U.K, v. 5, p. 169-214. 1993.

BEECH, F. W.; CARR, J. G.; ROSE, A. H. Cider and Perry. **Alcoholic Beverages**. Ed.; Academic Press: London, U.K, v. I, p. 139-313. 1977.

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

BELOQUI, A.; BERTRAND, A. Study of sulfur compounds in wine: preliminary results. **Italian Journal of Food Science**, v. 3, p. 279-288. 1995.

BENDA, I. Wine and brandy. In: REED, G. **Prescott and Dunn's industrial microbiology**. 4. ed. Westport: AVI Publishing Co., 1982. p 293-402.

BERRY, D. R. Manipulation of flavor production by yeast: physiological and genetic approaches. In: PIGGOTT, J.R.; PATERSON, A. **Distilled beverage flavour**. Chichester/UK: Harwood, 1989. p. 299-307.

BERTITER, J. Sugar accumulation and changes in the activities of related enzymes during development of the apple fruit. **Journal of Plant Physiology**, v. 121, p. 331-341. 1985.

BILBAO, A.; IRASTORZA, A.; DUENAS, M.; FERNANDEZ, K. The effect of temperature on the growth of strains of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice fermentation. **Letter of Applied Microbiology**. v. 24, p. 37-39. 1997.

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

BOYLSTON, T. D.; WANG, H.; REITMEIER, C. A.; GLATZ, B. A. Effects of processing Treatment and Sorbate Addition on the Flavor Characteristics of Apple Cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 7, p. 1924-1931. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 6871, 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**. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/>>. Acesso em: 09 fevereiro 2011.

CASTELLI, T. Les agents de la fermentation vinaire. **Archives of Microbiology**, v. 20, p. 323-342. 1954.

CHAROENCHAI, C.; FLEE, G. H.; HENSCHKE, P. A.; TODD, B. E. N. Screening of non-*Saccharomyces* yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, p. 2-8. 1997.

CHAVAN, P.; MANE, S.; KULKARNIC, G.; SHAIKH, S.; GHORMADE, V.; NERKAR, D. P.; SHOUCHE, Y.; DESHPANDE, M. V. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. **Food Microbiology**, p. 1–8. 2008.

CHOI, L. H.; NIELSEN, S. S. The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. **Journal of Food Quality**, v. 28, p. 13–29. 2005.

CIANI, M.; PICCIOTTI, G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 1247–1250. 1995.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Selective sugar consumption by apiculate yeasts. **Letter Applied Microbiology**, v. 28, p. 203–206. 1999.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245. 2006.

CIANI, M.; COMITINI, F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annual Microbiology**. 2010.

COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. Yeast associated to Malbec grapes berries from Mendoza, Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1055–1061. 2005.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. Treixadura. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Russia. 2010.

CSEERHALMI, Z.; SASS-KISS, A.; TOTH-MARKUS, M.; LECHNER, N. Study of pulsed electric field treated citrus juices. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v. 7, p. 49–54. 2006.

CSOMA, H.; SIPICZKI, M.; Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 328–336. 2008.

DARRIET, P.; LAVIGNE-CRUEGE, V.; TOMINAGA, T. A Paradox: the Volatile Sulphur Compounds Responsible for both Defects and Qualities in Wines. **Vigne et Vin Publications International**, Bordeaux, France, v. 127. 1999.

DICKINSON, J. R. The formation of higher alcohols. In: SMART, K.A. **Brewing yeast fermentation performance**. 2. ed. Oxford/UK: Blackwell, 2001. p. 196–205.

DONAHUE, D. W.; CANITEZ, N.; BUSHWAY, A. A. UV inactivation of E-coli O157:H7 in apple cider: quality, sensory and shelf-life analysis. **Journal of Food Processing Preservation**, v. 28, p. 368–387. 2004.

DRILLEAU, J. F. La fermentation en cidrerie. Quelques généralités et principes d'elaboration. **Pomme**, n. 21, p. 20-22. 1990.

DRILLEAU, J. F. Consolider les connaissances et maîtriser la qualité du produit fini. **Pomme**, n.23, p.23-25. 1991.

DRILLEAU, J. F., Elaboration artisanale du cidre. Les généralités du schéma de principe. **Pomme**, v. 30, p. 29-30. 1993.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 36, p. 557–569. 2009.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; OLIVEIRA, J. M.; VILANOVA, M.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. **Food Research International**. v. 43, p. 2303–2314. 2010.

FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de Análise Sensorial**. 1. ed. Campinas/SP: Ital/Lafise, 2002. p. 116.

FERREIRA, V.; PET'KA, J.; AZNAR, M.; CACHO, J. Quantitative gas chromatography–olfactometry. Analytical characteristics of a panel of judges using a simple quantitative scale as gas chromatography detector. **Journal of Chromatography**, v. 1002, p. 169–178. 2003.

FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Yeast growth during fermentation in wine. In: FLEET, G.H. **Microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 27–54.

FLEET, G. H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, n. 50, p.101-117. 1999.

FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 11–22. 2003.

GARAFOLO, A. The ester synthesizing activity of yeast under different nutrient conditions. **Review of Viticulture and Enology**, v. 45, n. 3, p. 41–58. 1992.

GARDEN-CERDÁN, T.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Contribution of wild yeasts to the formation of volatile compounds in inoculated wine fermentations. **European Food Res Technology**, v. 222, p. 15–25. 2006.

GATFIELD, I. L. Enzymatic and microbial generation of flavor. **Perfumer & Flavorist**, v. 20, p. 5-14. 1995.

GIL, J. V.; MATEO, J. J.; JIMENEZ, M.; PASTOR, A.; HUERTA, T.. Aroma compounds in wine as influenced by apiculate yeasts. **Journal of Food Science**, n. 61, p. 1247-1250. 1996.

GIL, M.; CABELLOS, J. M.; ARROYO, T.; PRODANOV, M. Characterization of the volatile fraction of young wines from the Denomination of Origin “Vinos deMadrid” (Spain). **Analitical Chemical Acta**, v. 563, p. 145–153. 2006.

GIUDICI, P.; KUNKEE, R. E. The effect of nitrogen deficiency and sulphur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, n. 1, p. 107 – 112. 1994.

HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CERSOSIMO, M.; LOSCOS, N.; CACHO, J.; GARCIA-MORUNO, E.; FERREIRA, V. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeast of different genera. **Food Chemistry**, v. 107, p. 1064–1077. 2008.

HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; DIAZ, M. The effect of SO₂ on the production of ethanol, acetaldehyde, organic acids, and flavor volatiles during industrial cider fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3455–3459. 2003.

HULME, A. C.; RHODES, M. J. C. The Biochemistry of Fruits and their Products. In: _____. **Chapter 10**. 2. ed.; Academic Press: London, 1971.

IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. In: _____. **Normas Analíticas**. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JANZANTTI, N. S.; FRANCO, M. R. B.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 523 – 528. 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, p. 63–69. 2003.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I.S. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 15–39. 2006.

KUNKEE, R. E.; VILAS, M. R. Toward an understanding of the relationship between yeast strain and flavour production during vinifications: flavour effects in vinifications of a nondistinct variety of grapes by several strains of wine yeast. **Viticultural and Enologica Sciences**, v. 49, p. 46 – 50. 1994.

LAPLACE, J. M. et al. 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**. London, v. 107, n. 4, p. 227-233. 2001.

LAMBRECHTS, M.G.; PRETORIUS, I.S. Yeasts and its importance to wine aroma - a review. **South Africa Journal of Enology and Viticulture**, v. 21, p. 97–129. 2000.

LARGE, P. J. Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. **FEMS Yeast Research**, 2. Ed, p. 1-34. 1986.

LE QUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Review of Enologues**, v. 88, p. 17-20. 1998.

LE QUERE, J. M.; DRILLEAU, J. F. Fermentation of french cider, the process and yeast species. **Fermentation - Food, Drink and Waste Management, the Future**. Brittanica Atlantic Conference, England. 1993.

LEA, A. G. H.; DRILLEAU, J. F. Cidermaking. In: LEA, A. G. H. **Fermented Beverage Production**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 2003.

LEGUERINEL, I.; MAFART, P.; CLERET, J. J.; BURGEIOIS, C. Yeast strain and kinetic aspects of the formation of flavour components in cider. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, n. 6, p. 40 – 409. 1989.

LOSCOS, N.; HERNANDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Release and Formation of Varietal Aroma Compounds during Alcoholic Fermentation from Nonfloral Grape Odorless Flavor Precursors Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 6674-6684. 2007.

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

MATTHEIS, J. P.; BUCHANAN, D. A.; FELLMAN, J. K. Volatile compounds emitted by ‘Gala’ Apples following dynamic atmosphere storage. **Journal American Society of Horticultural Science**, v. 123, p. 426-432. 1998.

MENDOZA, L. M.; MANCA DE NADRA, M. C.; BRU, E.; FARIAS, M. E. Influence of wine-related physicochemical factors on the growth and metabolism of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in mixed culture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 229–237. 2008.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography**, v. 881, p. 569–581. 2000.

MICHEL, A. Production du cidre a la ferme. **Pomme**, v. 17, n. 9, p. 12. 1988.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 285–294. 2005.

MOREIRA, N.; MENDES, F.; GUEDES DE PINHO, P.; HOGG, T.; VASCONCELOS, I. Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 231–238. 2008.

NISSEN, P.; ARNEBORG, N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 5, p. 65–71. 2003.

NISSEN, P.; NIELSEN, D.; ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by cell–cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v. 20, p. 331–341. 2003.

NOGUEIRA, A.; MONGRUEL, C. N.; SIMÕES, D. R.; WOSIACKI, G. Effect of biomass reduction on the fermentation of cider. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v. 51, n. 5. 2007.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). **Bebidas Alcoólicas - Ciência e Tecnologia**. 1 ed. São Paulo: Blucher, v. 1, p. 113-142. 2010.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A.; DRILLEAU, J. F.; SIMÕES, D. R. S.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 02, p. 274-280. 2003.

NOGUEIRA, A.; PHOLMAN, B. C.; WOSIACKI, G. Características de qualidade de maçãs. Avaliação físico-química e sensorial de 15 variedades. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 347-352. 2004.

NOGUEIRA, A.; LE QUERE, J. M.; GESTIN, P.; MICHEL, A.; WOSIACKI, G.; DRILLEAU, J. F. Slow Fermentation in French Cider Processing due to Partial Biomass Reduction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 2, p. 102 – 110. 2008.

NYKANEN, L. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 37, p. 84–96. 1986.

OLIVEIRA, E. S.; CARDELLO, H. M. A.; JERONIMO, E. M.; SOUZA, E. L. R.; SERRA, G. E. The influence of different yeasts on the fermentation, composition and sensory quality of cachaça. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 707–715. 2005.

OUGH, C. S.; BELL, A. A. Effects of nitrogen fertilization of greapevines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 31, n. 2, p. 122 – 123. 1980.

OSHITA, K. K. M.; UCHIDA, M.; ONO, M. Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using C-labelled amino acid.

European Brewery Convention Proceedings. **25th Convention. Press at Oxford University Press**, Oxford, p. 387-394. 1995.

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

PINHEIRO, D. M.; PASTORE, G. M. Produção biotecnológica de compostos de aromas. In: FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, p. 195-206, 2003.

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

RAPP, A.; MANDERY, H. Wine aroma. **Experientia**, v. 42, p. 873–884. 1986.

REAZIN, G.; SCALES, H.; ANDREASEN, A. Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentations of different types of grain mash. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 21, p. 50 – 54. 1973.

RENGER, R. S.; VAN HATEREN, S. H.; LUYBEN, K. C. A. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation: the effect of carbon dioxide pressure. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, n. 6, p. 509 – 513. 1992.

RENARD, C. et al. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 29, n. 2, p. 115-125. 2001.

RIBEREAU-GAYON, J. ; PEYNAUD, E. ; RIBEREAU-GAYON, P. ; SUDRAUD, P. *Traité d'oenologie*: **Sciences et techniques du vin**. Paris: Dunod. 1975.

RODRIGUEZ, M. E.; LOPES, C. A.; BARBAGELATA, R. J.; BARDA, N. B.; CABALLERO, A. C. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 19–25. 2010.

ROJAS, V.; GIL, J. V.; PINAGA, F.; MANZANARES, P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. **Institucional Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 181 – 188. 2003.

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.

ROMANCINO, D. P.; DI MAIO, S.; MURIELLA, R.; OLIVA, D. Analysis of non-*Saccharomyces* yeast populations isolated from grape musts from Sicily (Italy). **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 2248–2254. 2008.

ROMANO, P.; SUZZI, G. Sulfur dioxide and wine microorganism. In: FLEET, G.H. **Wine microbiology and biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 373–393. 1993.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86; p. 169–180. 2003.

ROUSEFF, R.; BAZEMORE, R.; GOODNER, K.; NAIM, M. GC-olfactometry with solid phase microextraction of aroma volatiles from heated and unheated orange juice. In: ROUSEFF, R. L.; CADWALLADER, R. K. **Headspace Analysis of Foods and Flavors: Theory and Practice - Advances in Experimental Medicine and Biology**. 1. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. p. 488. p. 101-112.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 454–46. 2008.

SIMÕES, D. R. S. **Abordagem tecnológica e sensorial nos produtos de maçã: suco, fermentado e sidra**. 2008, 174f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R. GOMES, R. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 4. ed, São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SPONHOLZ, W. Wine spoilage by microorganisms. In: FLEET, G.H. **Wine Microbiology and Biotechnology**. Switzerland: Harwood Academic Publishers, 1993. p. 395–420.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN M. Yeast as a producer of aroma compounds. **Dechema Monografy**, v. 82, p. 207–220. 1978.

SUOMALAINEN, H.; LEHTONEN, M. The production of aroma compounds by yeast. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 85, n. 3, p. 149–156. 1979.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian Journal of Grape Wine**, v. 11, p. 139–173. 2005.

SWIEGERS, J. H., FRANCIS, I. L., HERDERICH, M. J., & PRETORIUS, I. S. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: The choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. **Australian and New Zealand Wine Industry Journal**, v. 21, p. 34–42. 2006.

TAHÍA, B.; LUCAS, D. C.; ANDRÉS, A.; JAIME, C.; CERDÁOLMEDO, E. Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. **Applied Environment Microbiology**, v. 45, p. 1429 – 1436. 1983.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Boletim da sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - SBCTA**, Campinas, v. 34, n. 1, p. 52-59. 2000.

UGLIANO, M.; BARTOWSKY, E. J.; MCCARTHY, J.; MOIO, L.; HENSCHKE, P. A. Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6322–6331. 2006.

VALERO, E.; SCHULLER, D.; CAMBON, B.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: A large-scale, three-years study. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 959–969. 2005.

VIANA, F.; GIL, J. V.; GENOVÉS, S.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology**, v. 25, p. 778– 785. 2008.

VIANA, F.; GILA, J. V.; VALLÉSA, S.; MANZANARES, A. P. Increasing the levels of 2 phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, p. 68–74. 2009.

VIDRIH, R.; HRIBAR, J. Synthesis of higher alcohols during cider processing. **Food Chemistry**, v. 67, p. 287 – 294. 1999.

VIKRAM, V. B.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Thermal degradation kinetics of nutrients in orange juice heated by electromagnetic and conventional methods. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 31–40. 2005.

VILA NOVA, M.; SIEIRO, C. Contribution by *Saccharomyces cerevisiae* yeast to fermentative flavour compounds in wines from cv. Albariño. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 929–933. 2006.

VILLATORO, C.; ALTISENT, R.; ECHEVERRÍA, G.; GRAELL, J.; LÓPEZ, M. L. ; LARA, I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of “Pink Lady” apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, p. 286–295. 2008.

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

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

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 376–384. 2006.

YOUNG, H.; GILBERT, J. M.; MURRAY, S. H.; BALL, R. D. Causal effects of aroma compounds on Royal Gala apple flavours. **Journal of Science Food Agriculture**, v. 71, p. 329–336. 1996.

YOUNG, H.; ROSSITER, K.; WANG, M.; MILLER, M. Characterization of royal gala apple aroma using electronic nose technology's potential maturity indicator. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 47, p. 5173–5177. 1999.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and Biotechnology**. 1. ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 1998.

WEDZICHA, B. Chemistry of sulfur dioxide in foods. **Elsevier Applied Science**, London. 1984.

WIECHETECK, F. V. B.; NOGUEIRA, A.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Efeito da crioconcentração sobre o teor de compostos fenólicos em mostos industriais de maçãs. **Publicatio UEPG. Ciências exatas e da terra, ciências agrárias e engenharias**, Ponta Grossa - PR, v.11, n.1, p.27-34. 2005.

WONDRA, M.; BOVERIC, M. Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 141–148. 2001.

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

WOSIACKI, G. Apple varieties growing in subtropical areas: the situation in Paraná - Brazil. **Fruit Processing**, v. 5, p. 177-182. 2001.

WOSIACKI, G.; KAMICOGA, A. T. M.; NEVES, J. F. Características do suco clarificado de maçãs. **Alimentos e Tecnologia**, São Paulo, v. 8, n. 37, p. 76-79. 1991.

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.

WOSIACKI, G.; NAMIUCHI, N. N.; CERIBELLI, M. I. P. F.; SATAQUE, E. Y.; SICHIERI, V. L. F. S.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; OLIVEIRA CESAR, E. Estabilidade do suco clarificado de maçã. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, n. 4, p. 775-786. 1989.

ZAMBONELLI, C. Microbiologia e biotecnologia dei vini. Bologna: **Edagricole**. 1998.

ZOHRE, D. E.; ERTEN, H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* easts on wine fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 319 – 324. 2002.

ANEXO A – Modelos de fichas para Análise Sensorial Olfativa

Nome: _____
 Sexo: ☐ F Idade: ☐ < 25 ☐ 26-35 ☐ 36-50 ☐ > 50
☐ M

Com que frequência consome vinhos?

- ☐ sempre
☐ frequentemente
☐ raramente
☐ nunca

Avalie o aroma das amostras codificadas de fermentado de maçã (esquerda para a direita) e coloque-as em ordem de sua preferência:

_____ + preferida _____ - preferida

Comentários: _____

(A)

Nome: _____
 Sexo: ☐ F Idade: _____
☐ M

Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou:

- | | |
|------------------------------|-------|
| 7 – Gostei muitíssimo | _____ |
| 6 – Gostei muito | _____ |
| 5 – Gostei | _____ |
| 4 – Não gostei nem desgostei | _____ |
| 3 – Desgostei | _____ |
| 2 – Desgostei muito | _____ |
| 1 – Desgostei muitíssimo | _____ |

Comentários: _____

(B)

Nome: _____
 Sexo: ☐ F Idade: ☐ < 25 ☐ 26-35 ☐ 36-50 ☐ > 50
☐ M

Com que frequência consome vinhos?

- ☐ sempre
☐ frequentemente
☐ raramente
☐ nunca

Por favor, avalie o aroma das amostras codificadas de fermentado de maçã (esquerda para direita) e faça um círculo no aroma da amostra de sua preferência:

Comentários: _____

(C)

Figura 2: Modelos de fichas utilizadas na análise sensorial olfativa dos quatro diferentes fermentados de maçã. (A) Ficha para análise de Ordenação por Preferência. (B) Ficha para Teste de Aceitação. (C) Ficha para análise de Preferência Pareada.