

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Strictu senso*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

LEILA ROSELI DIERINGS

**ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA DA FERMENTAÇÃO OXIDATIVA, ALCOÓLICA E
MALOLÁTICA NO PROCESSAMENTO DA SIDRA**

**PONTA GROSSA
2008**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Strictu senso*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

LEILA ROSELI DIERINGS

**ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA DA FERMENTAÇÃO OXIDATIVA, ALCOÓLICA E
MALOLÁTICA NO PROCESSAMENTO DA SIDRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

**PONTA GROSSA
2008**

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

D563a Dierings, Leila Roseli
Abordagem microbiológica da fermentação oxidativa,
alcoólica e malolática no processamento da sidra. / Leila Roseli
Dierings. Ponta Grossa, 2008.
115f.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

1.Sidra. 2. Fermentação oxidativa. 3. Fermentação
4. Malolática. 4. Tecnologia. I. Nogueira, Alessandro. II. T.

CDD: 664.24

A minha amada filha, Nathália Camila.
Dedico.

Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Á Deus que proporcionou a realização deste trabalho.

Ao departamento de Engenharia de Alimentos que disponibilizou materiais, reagentes e permitiu que o trabalho fosse realizado em suas dependências e a todos os professores que contribuíram com informações e dividiram seus espaços.

Ao orientador Professor Doutor Alessandro Nogueira pelo compromisso assumido e pela dedicação empenhada neste trabalho, pela confiança e amizade, pelos suportes formais e informais que disponibilizou, pelas sugestões, esclarecimentos e comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar.

Ao Professor Doutor Gilvan Wosiacki pela disposição em ajudar, amizade e seriedade com que conduz os trabalhos.

A Professora e amiga Leila Denise Falcão, pelo incentivo e pelos apontamentos como membro examinador.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação Cristiane Schamne, Maria Isabel, Paula, Cristiane, Audie, Danianni, Débora, Ana Mery, Marina, Mary, Lúcia, Cleoci e Simone pelo auxílio, sugestões e críticas, além de momentos de descontração durante o café que resultaram em amizades que persistirão por toda a vida.

À Denise e a Rita pela dedicação e ajuda durante a realização dos trabalhos experimentais e por transformarem o laboratório em um ambiente familiar.

Aos colegas que formam o Grupo de Trabalho sobre Maçã, pela colaboração nos estudos, trabalhos e pelos momentos de descontração que me proporcionaram.

E... Especialmente ao meu marido e amigo Rodrigo Desidério, a minha filha Nathália, meus pais, minha irmã Letícia e a toda a minha família que sempre acreditaram, incentivaram e ajudaram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

Na Europa o processo de fermentação do suco de maçã para obtenção da sidra compreende 3 fases distintas, fase oxidativa e fermentativa (síntese de aromas e produção de etanol) e fase malolática (redução da acidez). No Brasil o processo ocorre em temperaturas de 25-35°C, presença de sulfito e com adição de leveduras fermentativas, caracterizando um processo rápido e com predominância de aroma do fermento. A fim de aumentar o consumo e retomar a identidade da bebida torna-se necessário melhorar a qualidade avaliando a tecnologia. Este trabalho teve como objetivo avaliar o processo fermentativo da sidra, verificando a influência dos diferentes microrganismos, naturais ou comerciais, na sua qualidade. Os experimentos foram conduzidos em microfermentadores. Foram utilizadas duas cepas comerciais *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*. Dentre os microrganismos de interesse na fermentação, as leveduras apiculadas apresentaram as maiores populações presentes nos mostos (10^5 ufc.mL⁻¹). Na fermentação natural as leveduras apiculadas apresentaram um rápido crescimento, mas foram suplantadas pelas fermentativas após 3 dias. As leveduras fermentativas inibiram o crescimento das bactérias lácticas, porém com a autólise, após 10 dias, as bactérias retomaram o crescimento. Com o inóculo da levedura e/ou da bactéria o comportamento dos microrganismos foram semelhantes ao processo natural. Porém com inóculo de bactérias lácticas no mosto as populações foram superiores (10^7 ufc.mL⁻¹), o que pode tornar o processo de fermentação malolática mais eficiente.

Palavras-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, leveduras apiculadas, tecnologia.

ABSTRACT

In the Europe the fermentation process of apple juice for cider obtention comprehend 3 phases distinct, oxidative and alcoholic fermentation phase (synthesis of aromas and ethanol release respectively) and the malolatic phase (reduction of the acid). In the Brazil the process occurs in temperatures of 25-35°C, presence of sulfite and with addition of yeast, resulting a fast process with predominance of aroma of yeast. In order to increase its consumption and to retake the identity of the beverage is necessary improve the quality and evaluate the processing technology. This work has as objective to evaluate the fermentation process of the cider, verified the interaction between the different microorganisms that influence in the quality. The experiments were lead with microfermentors. Were used two commercial strain *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni*. The population of apiculate yeast of the apple must were superior (10^5 ufc.mL⁻¹). In the natural fermentation the apiculate yeast had presented a fast growth, but they were supplanted by *Saccharomyces* sp in 3 days of fermentation, this microorganisms inhibited too the growth of the lactic bacteria. After 10 days of fermentation, the yeast starts a mortality phase that induced the bacterial growth. Inoculate of the yeast and/or the bacteria the behavior and developments of the microorganisms were similar at the natural fermentation. However with addition of lactic bacteria in the apple must, after 10 days of fermentation the populations were highest (10^7 ufc.mL⁻¹) that can become the malolactic fermentation more efficient.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni*, apiculate yeast, technology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	Via metabólica de bactérias lácticas homofermentativa (DRILLEAU, 1995).....	32
FIGURA 2-	Via metabólica de bactérias lácticas heterofermentativa (DRILLEAU, 1995).....	33
FIGURA 3-	Metabolismo do ácido cítrico pela bactéria <i>Oenococcus oeni</i> (NIELSEN; RICHELIEU, 1999).....	42
FIGURA 4-	Esquema de um fermentador e da determinação de perda de gás carbônico para obtenção da cinética da fermentação (NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2007).....	53
FIGURA 5-	Fluxograma representativo do experimento da microbiota natural de mostos de maçãs.....	54
FIGURA 6-	Fluxograma representativo do experimento de monitoramento da microbiota em fermentações naturais.....	55
FIGURA 7-	Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> nas bactérias lácticas naturais.....	56
FIGURA 8-	Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do inóculo de levedura e redução de biomassa.....	57
FIGURA 9-	Fluxograma representativo do experimento para avaliar o crescimento de <i>Oenococcus oeni</i> em suco de maçã clarificado....	58
FIGURA 10-	Fluxograma representativo do experimento para avaliar a fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado.....	59
FIGURA 11-	Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do sulfito no crescimento de <i>Oenococcus oeni</i> em suco de maçã.	60
FIGURA 12-	Fotos do experimento de fermentação no início (A) e após 48 horas (B).....	61
FIGURA 13-	Fluxograma representativo das fermentações com inóculo <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> em diferentes condições de inoculação da bactéria láctica.....	62
FIGURA 14-	Fotos do experimento de fermentação no início (A) e após redução de biomassa (B).....	63
FIGURA 15-	Amostras de maçãs comerciais e industriais (descarte) contendo defeitos, injúrias e/ou podridões.....	64
FIGURA 16-	Variação de temperatura no interior do fermentador.....	66
FIGURA 17-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação natural.....	68
FIGURA 18-	Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação natural.....	70
FIGURA 19-	Evolução dos ácidos orgânicos durante a fermentação natural.....	71
FIGURA 20-	Cinética da fermentação natural em função da perda de peso dos fermentadores decorrente da liberação de gás carbônico.....	71
FIGURA 21-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo da levedura <i>S. cerevisiae</i>	73

FIGURA 22-	Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	74
FIGURA 23-	Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	75
FIGURA 24-	Cinética da fermentação com inóculo de leveduras <i>S. cerevisiae</i> ..	76
FIGURA 25-	Variação de temperatura durante o experimento.....	77
FIGURA 26-	Efeito da redução de biomassa no crescimento das leveduras fermentativas.....	79
FIGURA 27-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo da levedura e com redução de biomassa.....	80
FIGURA 28-	Efeito da redução de biomassa no crescimento das bactérias lácticas naturais.....	81
FIGURA 29-	Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo da levedura e com redução de biomassa.....	81
FIGURA 30-	Cinética da fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e sem redução de biomassa.....	82
FIGURA 31-	Cinética da fermentação com inóculo da levedura e redução de biomassa.....	83
FIGURA 32-	Desenvolvimento da bactéria láctica <i>O. oeni</i> durante a fermentação do mosto de maçãs da cultivar Gala e Fuji pasteurizado.....	84
FIGURA 33-	Crescimento da bactéria <i>O. Oeni</i> , adicionado ou não de <i>S. cerevisiae</i> , em suco de maçã pasteurizado, após 5 dias de fermentação.....	86
FIGURA 34-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	88
FIGURA 35-	Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo simultâneo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	89
FIGURA 36-	Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	90
FIGURA 37-	Cinética da fermentação com inóculo simultâneo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	90
FIGURA 38-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo seqüencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	92
FIGURA 39-	Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo seqüencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	93
FIGURA 40-	Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo seqüencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	94
FIGURA 41-	Curva de crescimento de <i>O. Oeni</i> com inóculo simultâneo e seqüencial.....	95

FIGURA 42-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	96
FIGURA 43-	Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	97
FIGURA 44-	Cinética da fermentação em função da perda de peso dos fermentadores decorrente da liberação de gás carbônico durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	98
FIGURA 45-	Efeito da redução de biomassa no crescimento das leveduras fermentativas.....	100
FIGURA 46-	Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> , com redução de biomassa.....	101
FIGURA 47-	Efeito da redução de biomassa no crescimento das bactérias lácticas.....	102
FIGURA 48-	Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e láctico durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> , com redução de biomassa.....	103
FIGURA 49-	Cinética da fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> ...	104
FIGURA 50-	Cinética da fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> , <i>O. oeni</i> e redução de biomassa.....	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Microrganismos naturais em mostos de maçãs.....	65
TABELA 2-	Composição do mosto de maçãs e monitoramento durante a fermentação natural.....	67
TABELA 3-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de leveduras <i>S. cerevisiae</i>	72
TABELA 4-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação da sidra com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> , com centrifugação do fermentado após 12 horas de fermentação.....	78
TABELA 5-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	78
TABELA 6-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	85
TABELA 7-	Monitoramento da acidez total e volátil durante a fermentação do mosto de maçã com inóculo de <i>O. oeni</i> a e sulfito.....	86
TABELA 8-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e de <i>O. oeni</i> no mosto.....	87
TABELA 9-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo sequencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	91
TABELA 10-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	96
TABELA 11-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> , com redução de biomassa.....	98
TABELA 12-	Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	99

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	A sidra: histórico e definição.....	18
3.2	A matéria-prima	19
3.3	Operações pré-fermentação.....	21
3.4	Fermentação	22
3.4.1	Fermentação oxidativa	22
3.4.2	Fermentação alcoólica.....	24
3.4.3	Fermentação malolática	27
3.4.3.1	As bactérias láticas.....	30
3.4.3.2	Fermentação malolática natural	34
3.4.3.3	Fermentação malolática por inóculo	34
3.4.3.4	Condições do meio	35
3.4.3.5	Efeito na qualidade da sidra	39
3.4.4	Operações pós-fermentação	43
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1	Material.....	45
4.1.1	Microorganismos	45
4.1.2	Frutas	45
4.2	Métodos.....	46
4.2.1	Processo.....	46
4.2.1.1	Mosto de maçãs	46
4.2.1.2	Processamento do fermentado de maçã	46
4.2.2	Análises microbiológicas	47
4.2.2.1	Leveduras totais em placa.....	47
4.2.2.2	Leveduras oxidativas	48
4.2.2.3	Bactérias láticas	48
4.2.3	Análises físico-químicas	49
4.2.3.1	Açúcares.....	49
4.2.3.2	Acidez titulável.....	50
4.2.3.3	Acidez volátil.....	50
4.2.3.4	Ácidos orgânicos	50
4.2.3.5	pH.....	51

4.2.3.6	Nitrogênio	51
4.2.3.7	Dióxido de enxofre total	51
4.2.3.8	Álcool.....	51
4.2.4	Cinéticas de fermentação	52
4.2.5	Experimentos.....	53
4.2.5.1	Microbiota natural de mostos de maçãs	53
4.2.5.2	Monitoramento da microbiota em fermentações naturais	54
4.2.5.3	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> nas bactérias lácticas naturais.....	55
4.2.5.4	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e redução de biomassa.....	56
4.2.5.5	Crescimento da <i>Oenococcus oeni</i> em suco de maçã clarificado.....	57
4.2.5.6	Fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado.....	58
4.2.5.7	Efeito do sulfito no crescimento de <i>O. oeni</i> em suco de maçã	59
4.2.5.8	Efeito do inóculo simultâneo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	60
4.2.5.9	Efeito do inóculo seqüencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	61
4.2.5.10	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> em suco pasteurizado	62
4.2.5.11	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> com redução de biomassa	62
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1	Microbiota natural de mostos de maçãs	64
5.2	Monitoramento da microbiota em fermentações naturais	65
5.3	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> nas bactérias lácticas naturais.....	72
5.4	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e redução de biomassa.....	76
5.5	Crescimento de <i>Oenococcus oeni</i> em suco de maçã clarificado.....	83
5.6	Fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado.....	83
5.7	Efeito do sulfito no crescimento de <i>O. oeni</i> em suco de maçã	85
5.8	Efeito do inóculo simultâneo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	87
5.9	Efeito do inóculo seqüencial de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i>	91
5.10	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> em suco pasteurizado	95
5.11	Efeito do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> e <i>O. oeni</i> com redução de biomassa	98
6.	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1. INTRODUÇÃO

A fermentação de suco da maçã para obtenção da sidra é um bioprocesso tão nobre e antigo quanto o do vinho e da cerveja. A sidra é tradicionalmente produzida em países europeus que apresentam regiões de clima temperado definido, como a Inglaterra e a França, a Bélgica e a Espanha, aonde se torna possível o desenvolvimento pleno de macieiras. A cultura sidrícola é especialmente dominante em regiões francesas da Bretagne e Normandie, mas pouco desenvolvida em países de influência alemã, onde são preferidos os vinhos de uva.

No Brasil o processamento iniciou antes da década de 60 no estado de São Paulo. Os imigrantes europeus cultivavam maçãs para o processamento de geléias bem como fermentados, auxiliados pelo Instituto Agrônomo de Campinas, pois as maçãs ali produzidas eram de má qualidade. Desde então pouco foi estudado com relação à tecnologia, microbiologia e qualidade da sidra nas condições de processamento brasileira.

A elaboração do fermentado de maçã e da sidra, que tem como diferença apenas o gás carbônico dissolvido, pode compreender duas etapas, [1] a fermentação alcoólica, que compreende a oxidativa, por leveduras não-convencionais ou apiculadas, responsáveis por aromas classificados como *frutados* e *florais*, e a fermentativa, pelas leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, que transformam o açúcar em etanol; e a [2] fermentação malolática que descarboxila o ácido L-málico transformando-o em ácido L-lático, atenuando o sabor ácido e melhorando o corpo da bebida.

Na indústria sidrícola brasileira, em decorrência da temperatura média de 25°C, é comum à adição de sulfito no início do processo fermentativo seguido do

inóculo da levedura, ocasionando a perda de viabilidade das leveduras oxidativas e das bactérias lácticas naturais do mosto, além disso, a elevada temperatura, proporcionar uma fermentação rápida, muitas vezes com aromas característicos de fermento. As leveduras oxidativas podem influenciar a qualidade do fermentado conferindo melhores propriedades aromáticas, mas para que isso ocorra, estes microrganismos devem ser favorecidos durante o processamento.

A fermentação malolática pode ser tanto positiva quanto negativa, pois as maçãs brasileiras apresentam baixa acidez o que não justificaria a fermentação malolática, porém esta transformação pode melhorar o corpo da bebida, quando o processo for conduzido até uma bebida seca (menos e 20 g.L⁻¹ de açúcares), além de o produtor poder adicionar menores quantidades de açúcares no produto final.

No Brasil, face à falta de informações científicas sobre o comportamento de microrganismos envolvidos na fermentação do suco de maçã e sua participação na obtenção de um produto de melhor qualidade, é oportuno um estudo comparando os processos conduzidos com a microbiota natural e com cepas de leveduras e de bactérias lácticas sob condições programadas e controladas. Dessa forma busca-se desenvolver um produto capaz de atender a exigência do consumidor e ao mesmo tempo resgatar a identidade da bebida.

Diante da realidade do processamento sidrícola brasileiro e da necessidade de uma sidra de melhor qualidade, este trabalho teve como objetivo avaliar os microrganismos de interesse sidrícola, por meio de suas populações durante as fermentações.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- *Avaliar* o comportamento das leveduras oxidativas, fermentativas e maloláticas, da microbiota natural ou inoculada no processamento da sidra em condições brasileiras.

2.2 Objetivos específicos

- *Analisar* as leveduras e as bactérias lácticas presentes na microbiota natural de mostos de maçãs comerciais e industriais no contexto brasileiro;
- *Avaliar* o perfil de fermentação da sidra pela microbiota natural;
- *Avaliar* o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* em presença de bactérias lácticas naturais;
- *Avaliar* o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* e redução de biomassa em presença de bactérias lácticas naturais;
- *Avaliar* a capacidade de crescimento da bactéria *Oenococcus oeni* em mosto de maçãs;
- *Avaliar* o crescimento da bactéria *Oenococcus oeni* em mosto de maçã clarificado e pasteurizado na presença de sulfito;
- *Avaliar* o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo simultâneo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*;

- *Avaliar o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo seqüencial de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni*;*
- *Avaliar o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* em mosto pasteurizado;*
- *Avaliar o perfil fermentativo do mosto de maçãs com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcus oeni* e redução de biomassa;*
- *Avaliar o efeito da fermentação malolática na aceitação do fermentado de maçã.*

3. REVISÃO DE LITERATURA

Este item apresenta uma descrição do cenário da fabricação da sidra, com abordagem dos processos fermentativos.

3.1 A sidra: histórico e definição

O processo de fermentação de suco de maçã visando à obtenção de uma bebida alcoólica já era praticado no Mediterrâneo Oriental há mais de 2000 anos (JARVIS *et al.*, 1995, citado por LAPLACE *et al.*, 2001). Em documentos antigos, podem ser encontrados termos como *Sikéra* (grego) e *Sicera* (latim), descritos por Plínio no século I (*Histoire Naturelle*) e por Hipócrates, patrono da Medicina, no século V a.C., relacionados a bebidas fermentadas à base de maçãs e pêras (ROBIN; DE LA TORRE, 1988).

No Brasil a sidra é definida legalmente como *bebida com graduação alcoólica de quatro a oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela fermentação alcoólica do mosto da maçã, podendo ser adicionada de suco de pêra, em proporção máxima de trinta por cento, e sacarose não superior aos açúcares da fruta* (BRASIL, 2000).

A sidra francesa caracteriza-se como um produto suave, adstringente (tânico), com aroma frutado. Na Alemanha e Suíça as principais características da sidra é o sabor tipicamente seco e ácido, enquanto que na Espanha apresenta aroma pungente, predominante de ácido acético. Já no Brasil, esta bebida é considerada pouco aromática e de baixa acidez, produzida essencialmente de maçãs de mesa (NOGUEIRA, 2003).

A sidra brasileira encontra-se disponível no mercado consumidor o ano todo, mas é comprada apenas em festas e, particularmente, nas de fim de ano. Toda produção é voltada para o mercado interno, não existindo processos de exportação e nem de importação (WOSIACKI; CHERUBIN; SANTOS, 1997).

O desenvolvimento de uma sidra com um perfil definido mediante a aceitação do consumidor brasileiro pode estender seu consumo durante todo o ano, e mesmo, almejar a comercialização internacional. A quantidade de matéria-prima disponibilizada ao setor industrial é significativa, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que favoreçam a melhoria do produto e que a qualidade atenda à exigência do consumidor (NOGUEIRA *et al.*, 2003).

3.2 A matéria-prima

A maçã (*Malus domestica*), dentre as frutas de clima temperado, cultivadas no Brasil, apresentou a maior expansão em área plantada e em volume de produção, passando de 931 ha em 1972 a 37.413 ha em 1980 (EPAGRI, 2002). Em 2005 o Brasil ocupou o décimo quarto lugar na produção mundial, com 870.000 toneladas ou 1,33% da produção global (ALMEIDA; ALVES, 2006). De acordo com o IBGE em 2007 a produção nacional foi de 1.093.843 toneladas em uma área plantada de 37.562 hectares e com um rendimento médio de 29.121 quilogramas por hectare (IBGE, 2008).

No Brasil, as frutas destinadas à indústria sidrícola são as maçãs sem valor comercial para o consumo *in natura*, que apresentam defeitos fisiológicos e morfológicos, com destaque para tamanho pequeno, má distribuição de cor, formas inadequadas, marcas de cicatrizes e injúrias mecânicas. As maçãs de descarte industrial compreendem as infectadas por microorganismos. Ao contrário de outros

países, na França utiliza-se como matéria-prima maçãs cultivadas exclusivamente para a elaboração de Sidra (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

A matéria-prima para produção de sidra constitui-se em uma mistura de maçãs de cultivares comercial. No Brasil, não existem ainda atitudes concretas no sentido de procurar maçãs mais adequadas para o processamento, uma vez que a maioria disponibilizada ao setor industrial é das variedades Gala e Fuji, as quais são variedades selecionadas para consumo in natura (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

A composição físico-química das frutas de descarte é praticamente a mesma das maçãs comercializadas e, dessa forma, podem ser utilizadas pelas indústrias processadoras de suco, possibilitando a oferta de um produto nobre ao longo de todo o ano. Há possibilidade de valorizar economicamente essa fração da produção comercial, até então, sem muitas perspectivas (WOSIACKI *et al.*, 1992).

O mosto de maçã industrial brasileiro difere quantitativamente pouco do mosto de maçã industrial europeu. Os açúcares constituem a maior porção dos carboidratos e os maiores constituintes dos sólidos solúveis da maçã, sendo os principais a frutose, a glucose e a sacarose, os quais são distribuídos uniformemente por todas as partes da fruta (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005). Pode ser encontrado no mosto teores de açúcares entre 100 a 150 g.L⁻¹, a relação entre açúcares e acidez permite a classificação das variedades de maçã em sabor amarga, doce-amarga, doce, ácida e azeda (DRILLEAU, 1995).

O principal ácido orgânico presente na fruta é o málico (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005), em uma concentração que varia de 4 a 6 g.L⁻¹. Tipicamente estão presentes no mosto compostos nitrogenados com baixa concentração de prolina e compostos fenólicos, no entanto, antocianinas geralmente não são encontradas (DRILLEAU, 1995).

3.3 Operações pré-fermentação

Quando as frutas chegam à indústria são armazenadas em silos ou pequenas pilhas, as quais são transportadas até o local de processamento por canais, através de flotação, em um processo de pré-lavagem. Posteriormente são limpas em água corrente e trituradas em ralador ou moinho, obtendo uma polpa com textura fina e sólida (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

Após a trituração a massa ralada é acondicionada em telas plásticas, as quais são superpostas e levadas à prensa. O suco é extraído empregando-se uma determinada pressão em função do tempo. Para aumentar o rendimento, coadjuvantes como celulose ou cascas de arroz podem ser misturados a massa ralada, facilitando o escoamento do suco. (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

Ao sair da prensa o mosto ainda contém substâncias pécticas, hidrocolóides, que elevam a viscosidade do líquido e adsorvem pigmentos coloridos derivados da ação enzimática sobre compostos fenólicos. Para reduzir o tamanho das moléculas e a descaracterização dos polissacarídeos, é feito uma despectinização enzimática por hidrólise ou beta-eliminação, com o auxílio de enzimas comerciais contendo pectinases e celulasas, após, a clarificação é feita por flotação ou colagem. O dióxido de enxofre empregado na forma gasosa ou líquida, processo chamado sulfitagem, tem efeito antiséptico, antioxidante e antioxidásico (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

3.4 Fermentação

O processo de fermentação da sidra pode compreender duas etapas: a fermentação alcoólica e a malolática. A fermentação alcoólica abrange a oxidativa e a fermentativa e corresponde à formação de aromas e a transformação de açúcares em álcool, respectivamente. A fermentação malolática, conduzida por bactérias, tem por finalidade reduzir a acidez do fermentato por conversão do ácido málico em ácido láctico, melhorando o sabor da bebida (DRILLEAU, 1995).

3.4.1 Fermentação oxidativa

A fermentação oxidativa é feita por leveduras de baixa atividade enzimática (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998). Estágios prévios a produção de álcool, em fermentações naturais, são caracterizados geralmente pela atividade de leveduras do gênero *Kloeckera* spp e *Hanseniaspora valbyensis* (MARTINEZ; MILLAN; ORTEGA, 1989). Estas leveduras, em especial a *Metschnikowia pulcherrima* e a *Hanseniaspora valbyensis*, participam do processo de clarificação por flotação mediante a liberação de gás carbônico (CO₂) (NOGUEIRA, 2003).

A viabilidade das células pode durar de 5 a 15 dias após a preparação do mosto, o que corresponde ao consumo de cerca de 10 g.L⁻¹ de açúcares e 30 a 40 mg.L⁻¹ de nitrogênio (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998).

As leveduras apiculadas ou não *Saccharomyces*, presente nas frutas e materiais de processamento, podem alcançar populações ao redor de 10⁶ ufc.mL⁻¹ durante a fermentação do mosto (COTON *et al.*, 2006).

Em vinhos tintos a presença de leveduras apiculadas durante a fermentação pode alterar a composição aromática. Elas produzem concentrações elevadas de alguns compostos como glicerol, acetato de etila e acetoína (CIANI; FATICHENTI, 1998).

Interações metabólicas entre leveduras não *Saccharomyces* e *S. cerevisiae* durante a fermentação do vinho, podem interferir no crescimento e fermentação dos microrganismos, especialmente da *S. cerevisiae*. (CIANI; FATICHENTI, 1998). As leveduras oxidativas dão lugar a cepas mais tolerantes as condições do meio como *Saccharomyces cerevisiae* (MARTINEZ; MILLAN; ORTEGA, 1989).

O progressivo desaparecimento de espécies de leveduras não *Saccharomyces* durante a fermentação, geralmente é atribuído à sua ineficiência em sobreviver em ambientes com altas concentrações de etanol, o qual é produzido durante a fermentação alcoólica. O acúmulo de etanol no meio representa uma forma de estresse químico e estudos demonstram que a membrana plasmática é o primeiro alvo de ação do etanol (PINA *et al.*, 2004).

O tempo de ação das cepas oxidativas varia em função do microrganismo, sua população inicial e disponibilidade de oxigênio durante a fase de crescimento (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005). Temperatura, pH, concentração de sulfito e etanol também influenciam o crescimento (CIANI; FATICHENTI, 1998). Estes microrganismos podem ser inibidos pela adição de anidrido sulfuroso (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

3.4.2 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica, na maioria dos casos, acontece sob ação da microbiota selvagem presente na fruta e material de processamento, no entanto, é possível seu desenvolvimento pela adição de levedura seca-ativa disponível ao setor agroindustrial (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

As leveduras naturais do gênero *Saccharomyces* estão presentes no mosto em uma população de aproximadamente $6,0 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, apresentam crescimento e atingem a população máxima de cerca de $1,0$ a $4,0 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹, situação na qual, a velocidade de fermentação atinge seu valor máximo. A população estabiliza o crescimento após o consumo de 10 a 15 g.L⁻¹ de açúcares (LEQUÉRÉ; DRILLEAU, 1998). No entanto, quando células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* são inoculadas no mosto em uma população em torno de 10^6 ufc.mL⁻¹, atingem a fase estacionária com uma população ao redor de 10^7 ufc.mL⁻¹ (HERRERO *et al.*, 1999).

As leveduras utilizam prontamente os açúcares simples, glicose e frutose, os quais penetram na célula por difusão facilitada. Apresentam atividade invertásica, hidrolisando sacarose em glicose e frutose, porém não são capazes de metabolizar açúcares mais complexos (BELIN, 1995). Durante a fermentação alcoólica as leveduras esgotam os nutrientes do meio como amônio, hexoses, aminoácidos e vitaminas, pela fácil assimilação (REMIZE *et al.*, 2006).

Esta deficiência do meio, em vitaminas ou aminoácidos, pode torná-lo menos favorável para o desenvolvimento das bactérias nas primeiras semanas de fermentação (DRILLEAU, 1995). No entanto, como *Oenococcus oeni* é autotrófico apenas para alguns aminoácidos, necessita adquirir outros do meio para poder se

desenvolver, podendo desta forma, o crescimento das bactérias ser prejudicado pelo metabolismo das leveduras (GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 2006).

O primeiro mecanismo de inibição das bactérias durante a fermentação alcoólica estudado foi a produção de sulfito (SO_2) pelas leveduras (HENICK-KLING; PARK, 1994). Estudos demonstraram que as leveduras produziam altas concentrações de sulfito durante a fermentação, sob concentrações elevadas de nitrogênio. Contudo, a produção de SO_2 por leveduras não foi sempre considerada o fator de inibição de *Oenococcus oeni*, sugerindo a presença de outros mecanismos inibitórios (OSBORNE; EDWARD, 2006).

Pesquisas recentes verificaram que mesmo leveduras que produziam quantidades similares de sulfito, não inibiam igualmente a bactéria láctica *Oenococcus oeni*, durante a fermentação alcoólica. A inibição bacteriana diminuía quando o vinho era tratado com proteases, mas não através da adição de nutrientes. A fração do vinho responsável pelo efeito inibitório apresentava compostos com peso molecular abaixo de 3kDa e a habilidade deste peptídeo demonstrou ser dependente da presença de sulfito (OSBORNE; EDWARDS, 2007). O mecanismo pelo qual o peptídeo inibiu *Oenococcus oeni* não foi determinado, porém, o tamanho pequeno deste peptídeo sugere que a ação inibitória pode ser similar à ação das bacteriocinas, formando poros ou canais nas membranas, permitindo a entrada de SO_2 mais facilmente (OSBORNE; EDWARDS, 2007). De acordo com Oscaríz e Pisabarro, (2001) bacteriocinas são substâncias proteináceas, antibacterianas, produzidas por bactérias Gram positivas que apresentam um espectro de atividade contra as espécies relatadas e possuem tamanho normalmente menor que 10 kDa.

Durante o metabolismo as leveduras secretam aminoácidos (ácido glutâmico, valina) essenciais para o desenvolvimento das bactérias. Portanto, a

composição em aminoácidos sofre modificação qualitativa (DRILLEAU, 1995). Os nutrientes liberados durante a autólise das leveduras são responsáveis pelo efeito estimulatório no crescimento bacteriano (PATYNOWSKI; JIRANEK; MARKIDES, 2002).

A autólise da levedura durante o envelhecimento de vinhos pode afetar extremamente as concentrações dos compostos nitrogenados, incluindo aminoácidos, peptídeos e proteínas. A liberação de nitrogênio é devida à atividade proteolítica das leveduras. Em condições ácidas e usando inibidores de proteinase, a atividade da proteinase A da levedura foi responsável por 80% da liberação do nitrogênio durante a autólise. A liberação de nitrogênio durante a fermentação alcoólica ou durante a autólise poderia explicar a estimulação do crescimento da bactéria ácido láctica (LURTON; SEGAIN; FEUILLAR, 1989).

A fermentação alcoólica de um meio de composição definida foi estudada usando *Saccharomyces cerevisiae* e uma cepa mutante Δ pep4, na qual foi suprido o gene da proteinase A. A fermentação com a cepa mutante, Δ pep4, resultou em níveis de aminoácidos livres inferiores a 61% e concentração de peptídeos inferiores a 62%, no final da fermentação alcoólica, quando comparado ao controle. Diferenças qualitativas na concentração dos aminoácidos foram observadas. Depois da fermentação alcoólica cada meio foi inoculado com *Oenococcus oeni* e a fermentação malolática com a cepa na qual o gene da proteinase A foi suprido levou 10 dias a mais que o controle para completar a fermentação malolática, o que pode ser devido à diferença na composição de nitrogênio dos dois meios, além do que, os aminoácidos livres e os peptídeos foram menos consumidos por *Oenococcus oeni*. Portanto, o aspecto qualitativo da composição de nitrogênio, o qual depende em

parte do metabolismo da levedura pode ser um determinante para o crescimento ótimo de *Oenococcus oeni* em vinhos (GUILLOUX-BENATIER *et al.*, 2006).

3.4.3 Fermentação malolática

Nos anos 70 e 80 pesquisadores britânicos descobriram a presença de bactérias ácido-tolerantes, bactérias lácticas e acéticas onde comprovaram que nas frutas existiam espécies do gênero *Oenococcus* e *Lactobacillus* (SALIH *et al.*, 1988).

A fermentação malolática usualmente ocorre em vinhos após a fermentação alcoólica, sendo desejável por três fatores: diminuição da acidez, melhoramento geral das características sensoriais e da estabilidade microbiológica. Contudo, não é favorável para todos os tipos de vinhos, pois em áreas quentes as uvas tendem a ser menos ácidas e isto somado a diminuição da acidez promovida pela fermentação malolática pode ser prejudicial às propriedades sensoriais e a estabilidade dos vinhos (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEO, 1999).

Fermentação malolática é um processo microbiológico que permite a desacidificação da sidra por meio da descarboxilação do ácido L-málico (dicarboxílico) em ácido L-lático (mono-carboxílico) (LIU, 2002). É catalisada pela enzima malolática (L-malate: NAD⁺ carboxilase) na presença de NAD⁺ e Mn²⁺ e como um próton é consumido na reação de descarboxilação o pH interno diminui (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEO, 1999).

Segundo Lequéré e Drilleau (1998) em condições francesas a fermentação malolática (ou maturação) tem duração de 3 a 6 meses, apresenta um consumo limitado de açúcares (não ultrapassando de 2 a 4 g.L⁻¹ ao mês) em um meio que

contém 30 a 50 g.L⁻¹ (leveduras eliminadas por filtração), teor alcoólico de 2 a 3% (v/v), pH relativamente elevado (3,8 a 4,2) e presença de uma microbiota complexa.

A população de bactérias lácticas aumenta de 1000 a 10000 vezes do seu valor inicial (SALIH *et al.*, 1988), sendo que, o início da fermentação malolática pode ser influenciado pela taxa de inóculo em bactérias lácticas. Uma taxa superior a 10⁵ ufc.mL⁻¹ diminui o tempo de carência para o início da biotransformação e impede a formação da (*piqûre láctique*) na sidra, com uma alta velocidade de degradação do ácido málico (SALIH *et al.*, 1987). A fermentação malolática inicia quando a população de bactérias encontra-se em aproximadamente 10⁶ ufc.mL⁻¹ (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEI, 1999), sendo inibida ou retardada se a bactéria não alcançar esta população crítica (REMIZE *et al.*, 2006).

Altas concentrações de compostos fenólicos apresentam um efeito desfavorável ao início do processo, podendo apresentar como consequência a inibição do crescimento de bactérias lácticas ou de suas funções enzimáticas. No entanto, a velocidade de conversão de ácido L-málico é pouco afetada (SALIH *et al.*, 1987).

A fermentação malolática contribui para o aumento de *flavours* complexos na sidra. Atributos sensoriais como corpo são melhorados em vinhos submetidos à fermentação malolática (CABRANES; BLANCOB; MANGASA, 1998).

Leuconostoc oenos, mais recentemente reclassificado como *Oenococcus oeni*, é reconhecida como a bactéria mais tolerante para as condições do vinho (baixo pH, alto nível de SO₂ e presença de álcool) (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEO, 1999). Além de baixa temperatura e interações antagônicas entre as leveduras do vinho (*Saccharomyces cerevisiae*) e as bactérias maloláticas

(*Oenococcus oeni*). Este antagonismo é devido a compostos inibitórios produzidos pelas leveduras do vinho (BELLMAN; KEEN, 1982).

O pH do vinho é baixo, entre 3,0 e 3,8 e o conteúdo alcoólico é 10% para climas frios e aumenta para 15% em climas quentes. Vinhos podem conter uma série de outros inibidores para o crescimento bacteriano como ácidos graxos livres (ácido decanóico e dodecanóico), alguns ácidos fenólicos e taninos (LONVAUD-FUNEL, 1999).

O etanol induz mudanças na composição de lipídios das membranas das bactérias ácido lácticas, do mesmo modo, as distribuições de ácidos graxos celulares variam de acordo com a fase de crescimento, o meio fermentativo, a temperatura e o pH. A composição de ácidos graxos em cepas de *Oenococcus oeni* envolve os ácidos mirístico, palmítico, palmitoléico e ácido esteárico (GARBAY; ROZES; LONVAUD-FUNEL, 1995).

A fermentação malolática permanece até hoje como um processo imperfeitamente controlado. Fatores nutricionais e fatores físicos químicos afetam o crescimento e metabolismo das bactérias lácticas. A cepa de levedura usada promove a formação de diferentes aminoácidos, peptídeos e vitaminas disponíveis como fatores de crescimento para as bactérias lácticas. A presença de produtos do metabolismo da levedura, como ácidos graxos e etanol, atuam como inibidores. Podem ocorrer interações entre leveduras e bactérias lácticas (HERRERO *et al.*, 1999). Contudo, um melhor conhecimento da fermentação malolática é essencial para o controle (estímulo ou interrupção) deste importante processo (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEO 1999).

3.4.3.1 As bactérias lácticas

As bactérias lácticas caracterizam-se por apresentar produção de ácido láctico. Este grupo compreende os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Oenococcus* e *Pediococcus*. Podem incluir os gêneros *Eubacterium* e *Butyribacterium* (LARPENT, 1995). Na sidra são encontradas espécies representativas de *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis* e cepas de *Lactobacillus* hetero e homofementativos (DRILLEAU, 1995). *Oenococcus oeni* é um coco gram-positivo, heterofermentativo, presente em pares ou cadeias, caracterizando a bactéria láctica responsável pela fermentação maloláctica, após a fermentação alcoólica na moderna indústria de vinho de frutas (HERRERO *et al.*, 1999).

Esta bactéria possui necessidade de fatores complexos para seu crescimento, como a presença de vitamina B, aminoácidos, peptídeos, bases púricas e pirimídicas. É capaz de tolerar pHs ácidos (5,0 ou menos) (BELIN, 1995). Metaboliza muitos constituintes do meio no qual se desenvolve e modifica *flavours*. Seus principais metabólitos são: ácido láctico, ácido acético, etanol, diacetil e acetaldeído (DRILLEAU, 1995).

Relativas adaptações dos aminoácidos requeridos dependem da presença de ácidos orgânicos, tais como ácido L-málico e ácido cítrico, estes ácidos provavelmente fornecem energia adicional e constituem substratos para a síntese de aminoácidos (SAGUIR; MANCA DE NADRA, 2002).

As bactérias lácticas não podem crescer tendo o ácido L-málico como única fonte de energia, conseqüentemente estes microrganismos necessitam de uma fonte adicional de energia, açúcar residual da fermentação como a glicose ou frutose, ou

aminoácidos como a arginina, permitindo desta forma o crescimento celular (LIU; DAVIS; BROOKS, 1995).

Os ácidos orgânicos são metabolizados em uma ordem definida. Primeiro é metabolizado o piruvato. Os lactobacilos heterofermentativos o transformam em ácido lático e acético, os homofermentativos o transformam em ácido lático, já os *Oenococcus* combinam ambos os efeitos. O diacetil é igualmente produzido a partir do ácido málico ou cítrico e a partir de açúcares. Determinadas cepas lácticas proporcionam a presença de quantidades expressivas de ácido succínico, um componente prejudicial ao *flavour* da sidra devido ao sabor que apresenta (DRILLEAU, 1995). O ácido málico e ácido cítrico podem ser metabolizados com a formação de ácido acético. O ácido quínico e seus ésteres, os ácidos clorogênico e paracumárico, são degradados por uma série de reações de óxido-redução, em condições de anaerobiose (DRILLEAU, 1995).

Saguir e Manca de Nadra (2002) avaliaram o crescimento de culturas de bactérias (*Oenococcus oeni*) em meio sintético com condições nutricionais deficientes e na presença dos ácidos málico e cítrico. A taxa de crescimento de bactérias foi reduzida ou anulada quando um aminoácido era omitido do meio, especialmente para membros da família aspartato, exceto lisina. No entanto, os ácidos orgânicos aumentavam ou restauravam as taxas de crescimento para os respectivos valores de referência. Em cada meio deficiente de um aminoácido essencial, a utilização do ácido L-málico foi acompanhada de um aumento da concentração do ácido L-lático, quase 100% do ácido málico foi consumido. A produção de etanol e acetato não foi modificada.

Carr *et al.* (1956) verificaram que durante o crescimento das células o ácido quínico é totalmente metabolizado e aparece no meio o ácido dihidroxiquínico.

A influência da fermentação malolática, nas propriedades químicas e sensoriais, ainda não foi completamente elucidada (POZO-BAYÓN *et al.*, 2005).

A. Fermentação homofermentativa

No metabolismo homofermentativo o produto final formado é o ácido láctico (Figura 1). Por esta via são liberadas duas moléculas de ATP por mol de glicose (LARPENT, 1995).

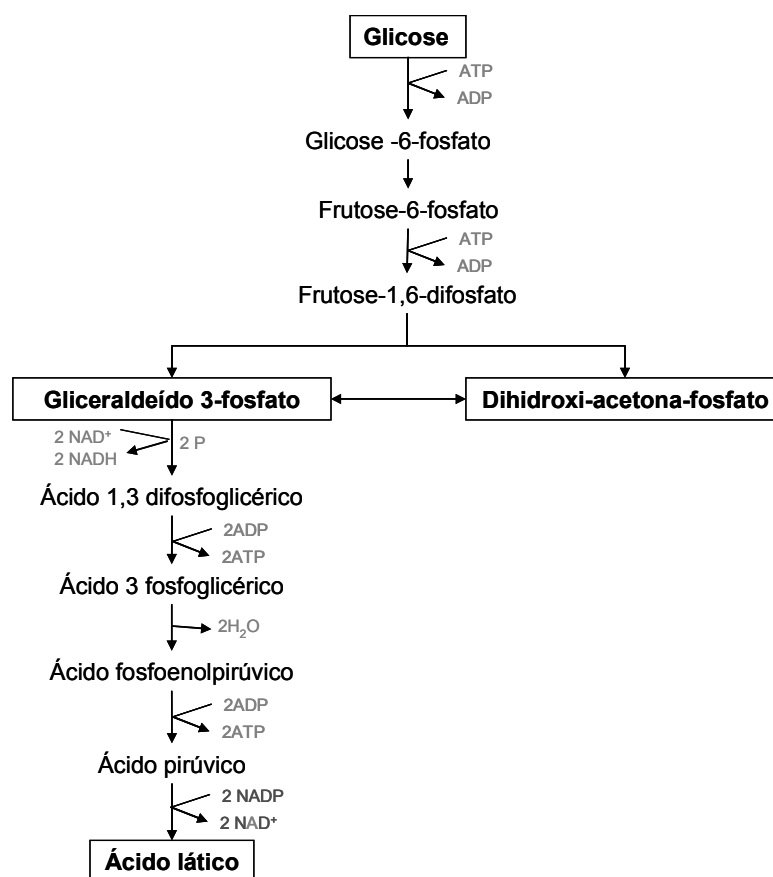


FIGURA 1. Via metabólica de bactérias lácticas homofermentativa (DRILLEAU, 1995).

B. Fermentação heterofermentativa

Na fermentação heterofermentativa, além do ácido láctico são formados etanol, acetatos e gás carbônico (CO_2) (Figura 2). As bactérias heterofermentativas não possuem frutose-difosfato-aldolase e degradam a glicose pela via pentose fosfato e hexose fosfato, promovendo a liberação de uma molécula de ATP por mol de glicose. As bactérias do gênero *Oenococcus* são exemplos heterofermentativos (LARPENT, 1995).

Entre os açúcares, a frutose é fermentada pelas bactérias heterofermentativas produzindo hexitol, manitol, acompanhado da produção de lactato, acetona e água (DRILLEAU, 1995).

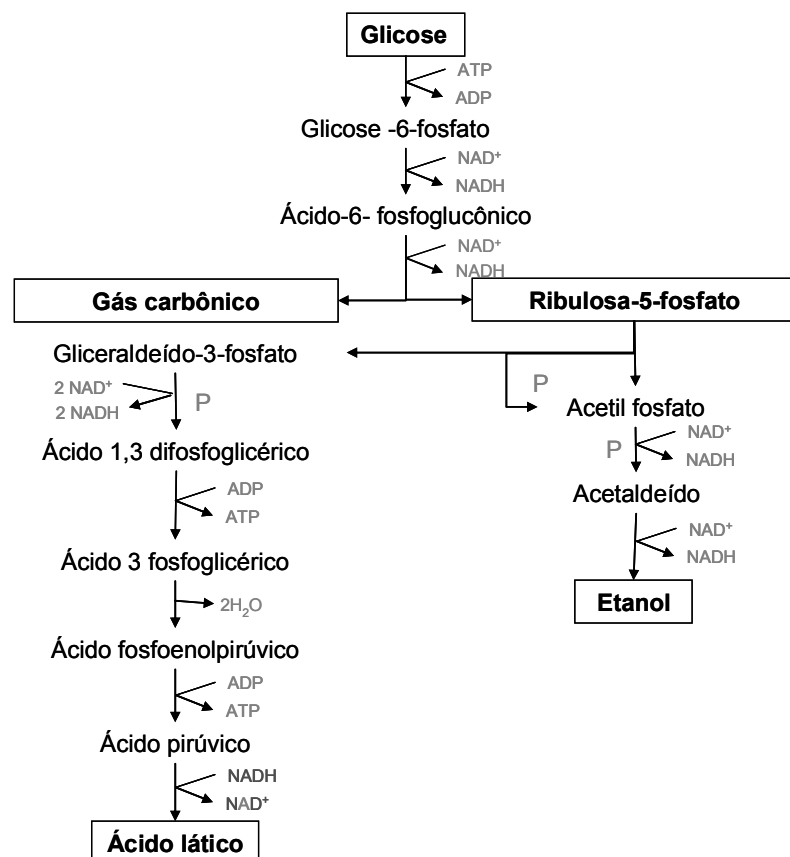


FIGURA 2. Via metabólica de bactérias lácticas heterofermentativa (DRILLEAU, 1995).

3.4.3.2 Fermentação malolática natural

Bactérias láticas como *Pediococcus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus brevis*, cepas de *Lactobacillus* homo e heterofermentativo estão presentes na flora lática da sidra. A população destas bactérias varia e depende das condições de trabalho. A população natural presente no mosto em torno de 10^4 ufc.mL⁻¹ pode chegar a uma população em torno de 10^7 ufc.mL⁻¹ ao final da fermentação malolática em condições francesas (em torno de 100 dias), sendo que, ao final da fermentação apenas *Oenococcus oeni* está presente. A microbiota lática pode ser controlada utilizando anidrido sulfuroso (DRILLEAU, 1995).

3.4.3.3 Fermentação malolática por inóculo

O uso de culturas iniciais na fermentação da sidra, tanto leveduras quanto bactérias, permite manter um produto final uniforme. Várias culturas liofilizadas para bioconversão malolática estão disponíveis no mercado, selecionadas apenas para fermentação de vinho. Segundo Herrero *et al.* (1999) estudos demonstraram que bactérias maloláticas naturais são mais adaptadas ao mosto e resultam em maior degradação do ácido málico.

As bactérias maloláticas podem ser inoculadas simultaneamente com o inóculo da levedura ou no término da fermentação alcoólica. No primeiro caso ocorre vantagem no desenvolvimento bacteriano devido ao baixo nível de etanol e alto nível de açúcares, mas pode ocorrer uma demora no crescimento bacteriano e degradação do ácido málico. Já no segundo caso, a presença de nutrientes

essenciais resultantes da excreção e autólices de leveduras está disponível para serem utilizados pelas bactérias (HERRERO *et al.*, 1999).

A indução da fermentação malolática por inoculação de uma cepa comercial de *Oenococcus oeni* não é sempre bem sucedida. Induzir a fermentação malolática em vinhos é difícil porque o vinho apresenta um ambiente muito desfavorável, a seleção de cepas para a inoculação em vinhos é conduzida por testes clássicos baseados essencialmente na composição de ácido L-málico (HENICK-KLING; SANDINE; HEATHERBELL, 1989).

3.4.3.4 Condições do meio

As propriedades físico-químicas como pH, acidez, concentração de etanol, concentração de sulfito e temperatura, influenciam o crescimento microbiano (VERSARI; PARPINELLO; CATTANEO 1999).

A. Temperatura

As fermentações, alcoólica e malolática, podem acontecer à temperatura ambiente ou a frio (DRILLEAU, 1995).

A temperatura influencia a atividade das leveduras e o seu aumento afeta a velocidade da fermentação. Entre 15 e 35°C a duração da fase latente é curta e o consumo de nitrogênio pelas leveduras aumenta (D'AMATO *et al.*, 2006).

Em baixas temperaturas (7 a 15°C) as fermentações são mais longas. O metabolismo das leveduras freqüentemente depende de uma absorção de nutrientes

conduzido por permeases. Essas enzimas são altamente dependentes de temperatura e mudanças podem causar alterações conformacionais na sua estrutura (BELTRAN *et al.*, 2007).

A fermentação malolática apresenta sua atividade máxima entre 20°C e 25°C. Em temperaturas superiores a 30°C e inferiores a 15°C a fermentação pode parar, mas reinicia quando a temperatura é aumentada. Portanto, a fermentação malolática deve ser conduzida à temperatura média máxima de 18°C, para evitar que as bactérias lácticas ataquem outros compostos distintos do ácido málico e aumentem desta forma a acidez volátil (MESAS, ALEGRE, 1999).

Faia (1999) avaliou o efeito da temperatura (18, 25 e 35°C) no crescimento e metabolismo dos ácidos, durante a produção de vinho Cabernet Sauvignon. Na menor temperatura de incubação avaliada (18°C), as taxas específicas de crescimento e a produção de biomassa foram menores. A velocidade de descarboxilação do ácido málico foi maior a 25°C do que a 32°C e 18°C; o ácido málico foi completamente metabolizado ao fim de 96, 192 e 264 horas, respectivamente. Nesta pesquisa verificou-se que com a maior temperatura de incubação avaliada (32°C), maior foi a degradação de frutose e conseqüentemente, maior a concentração final de manitol, exceto quando se adicionou citrato.

B. pH

O pH tem um efeito importante no crescimento das bactérias ácido lácticas. A acidificação do meio durante o crescimento produz uma queda do pH, a qual finalmente inibe o seu crescimento (CHAMPAGNE; GARDNER, 2002).

Herrero; Garcia e Díaz (2003) determinaram a alteração do pH em culturas de bactérias maloláticas usando suco de maçã reconstituído e suco de maçã

suplementado com YE comercial (0,5%, Biokar, France) e extrato de células liofilizadas (0,5 a 1%). Determinaram que o pH aumenta até 48 horas e esta fase corresponde ao consumo de ácido málico e a produção de ácido láctico. A partir de 48 horas os valores de pH do meio diminuem com a extensão do crescimento das bactérias maloláticas. A velocidade de degradação do ácido málico pela *Oenococcus oeni* é máxima em pH menor que 4,5. No entanto, o catabolismo de glicose e frutose são inibidos nesta faixa de pH, sendo o pH ótimo para catabolismo dos açúcares e crescimentos bacteriano observado a 5.5.

C. Metabissulfito

Na elaboração da sidra brasileira o dióxido de enxofre é indispensável face às temperaturas durante o processamento, próximas de 25°C, o que facilita a proliferação de microrganismos contaminantes (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005). O metabissulfito de potássio é adicionado no fermentado ao final da maturação como agente de conservação a uma concentração correspondente de 30 a 50 mg.L⁻¹ de dióxido de enxofre livre (WOSIACKI; CHERUBIM; SANTOS, 1997).

As bactérias maloláticas podem ser controladas pelo anidrido sulfuroso e a resistência destes microrganismos ao anti-séptico depende da concentração do anidrido sulfuroso livre e varia segundo o pH do mosto (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

Liu e Gallander (1983) avaliaram as velocidades da fermentação malolática em três amostras de vinho com o pH ajustado a 3,3; 3,5 e 3,7. As amostras para cada pH foram tratadas com 25, 50 e 75 mg.L⁻¹ de dióxido de enxofre, respectivamente. Inocularam em seguida *Saccharomyces cerevisiae* e quando o

fermentado apresentou 5° Brix inocularam *Oenococcus oeni*. Os autores verificaram que para os níveis de dióxido de enxofre utilizados, as taxas de fermentação malolática eram quase as mesmas, em valores de pH de 3.5 e 3.7, mas a fermentação foi muito mais lenta em pH 3.3. Para cada valor de pH, a fermentação malolática foi mais rápida frente a níveis mais baixos de dióxido de enxofre. Depois da inoculação a população bacteriana diminuiu e a menor contagem bacteriana foi observada na presença do menor valor de pH e na presença de alta concentração de SO₂.

D. Compostos nitrogenados

O nitrogênio aminado livre no mosto representa aproximadamente 50% do nitrogênio total da maçã, mesmo após um período de maturação. Entre os aminoácidos apenas aspargina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico e serina representam 86 a 95% dos aminoácidos totais do mosto. Estes aminoácidos são os primeiros a serem utilizados pelas leveduras (DRILLEAU, 1995).

A quantidade de nitrogênio nos mostos de maçãs pode ser muito baixa (<50 mg.L⁻¹) ou excessiva (>150 mg.L⁻¹), em função principalmente da idade dos pomares e das adubações, respectivamente, o que torna os compostos nitrogenados ora limitantes do crescimento das leveduras, causando lentidão e/ou paradas de fermentação, ora causadores de instabilidades microbiológicas, como explosões de garrafas no caso da sidra gaseificada naturalmente (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

Na fermentação, os compostos nitrogenados são utilizados pela *Saccharomyces* sp. durante a fase de crescimento, exercendo importantes funções na biossíntese de proteínas e nas funções enzimáticas. Estes compostos influenciam o crescimento e o metabolismo das leveduras, chegando a constituir

10% da sua matéria seca. Fatores como composição do mosto e o tipo de cepa de levedura podem afetar a sua assimilação (JULIEN *et al.*, 2000). O metabolismo das leveduras pode conduzir a eficiência da fermentação alcoólica e afetar a qualidade do produto final (SALMON; BARRE, 1998).

O consumo de aminoácidos pelas leveduras deixa o meio menos favorável para o desenvolvimento de bactérias nas primeiras semanas de fermentação. Posteriormente as leveduras secretam aminoácidos (ácido glutâmico e valina), essenciais para o desenvolvimento das bactérias lácticas. Portanto a composição dos aminoácidos no mosto é modificada qualitativamente (DRILLEAU, 1995). Durante a autólise a concentração de aminoácidos e peptídeos aumentam até valores máximos de 20 e 40 mg.L⁻¹, respectivamente (ALEXANDRE *et al.*, 2001).

Remize *et al.* (2006) verificaram que *Oenococcus Oeni* consumiu um nível significativo de nitrogênio somente em meio contendo aminoácidos livres. A concentração de nitrogênio do meio, ao redor de 5 mg.L⁻¹, foi suficiente para assegurar a formação de biomassa e o crescimento bacteriano foi maior na presença de nitrogênio de peptídios na forma de aminoácidos livres.

3.4.3.5 Efeito na qualidade da sidra

A produção de vinhos com qualidade depende da qualidade das uvas, dos microrganismos envolvidos na fermentação e do processamento na fabricação do vinho. A redução da acidez em mosto de uvas com alto teor de acidez é essencial para a produção de vinhos bem equilibrados (BEELMAN; GALLANDER, 1979).

Na fabricação da sidra, maçãs ácidas ajudam a evitar contaminações bacterianas e participam significativamente no corpo da bebida. Porém é necessária

a fermentação malolática para melhorar o sabor e a qualidade sensorial da sidra, além, de estabilizar microbiologicamente o produto pelo consumo de nutrientes residuais de carbono (LIU, 2002).

A. Acidez

A acidez do mosto e do vinho pode ser avaliada através do pH, o qual representa a concentração de hidrogênio iônico do vinho. A acidez titulável e a determinação da concentração dos ácidos orgânicos são outras duas maneiras. O pH do vinho depende do tipo e da concentração dos ácidos orgânicos e da concentração de cátions, especialmente do potássio. Os fatores relacionados à acidez do vinho têm participação importante nas características sensoriais, na estabilidade físico-química e biológica do vinho. A acidez do vinho está diretamente relacionada à composição do mosto, especialmente à sua concentração de potássio e à predominância do ácido tartárico em relação ao málico (RIZZON; MIELE, 2002).

Há vários métodos para diminuir a acidez do vinho, mas a desacidificação biológica é a mais usada. A desacidificação biológica pode ser feita através da fermentação malolática ou fermentação maloetanólica, sendo esta última desenvolvida geralmente pelas espécies de leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces* que convertem o ácido málico a piruvato por meio de uma enzima málica intracelular (REDZEPOVIC *et al.*, 2003).

Uma importante via de acidificação biológica é a seleção e utilização de leveduras produtoras de ácidos orgânicos, durante a fermentação alcoólica, as quais pertencem ao gênero *Saccharomyces*. A hipótese mais difundida postula a formação por fixação de CO₂ sobre o piruvato, produto final da glicólise, para formar oxaloacetato que é reduzido a ácido málico (YERAMIAN *et al.*, 2005).

A fermentação malolática produz na sidra uma diminuição da acidez, pela conversão do ácido málico (monoácido) em ácido láctico (diácido). Esta diminuição da acidez causa alterações nas propriedades sensoriais do vinho, tanto na cor quanto no sabor e aroma (MESAS; ALEGRE, 1999).

A fermentação malolática no vinho produz alterações como o aumento da acidez volátil, a qual se deve basicamente à transformação do ácido cítrico em ácido acético pelas mesmas bactérias lácticas (MESAS; ALEGRE, 1999).

Outros métodos usados pela indústria para reduzir a acidez de vinhos ou mosto de uvas incluem mistura, adição de carbonato, precipitação, maceração carbônica e diluição (HUSNIK *et al.*, 2006).

B. Aromas

Inicialmente a sidra resultava de uma fermentação lenta, estabilizada pela carência de nutrientes (vitaminas e nitrogênio). Era obtida através de uma clarificação prévia a fermentação, sendo a fermentação lenta responsável pelo *flavour* frutado e aromático da sidra (DRILLEAU, 1995).

Como resultado do metabolismo fermentativo das leveduras, compostos sensoriais são formados. Estes têm um efeito na qualidade do produto, tal como a concentração de etanol, ésteres e outros voláteis. O aroma da sidra é desenvolvido não somente por leveduras do gênero *Saccharomyces*, mas por leveduras apiculadas. Leveduras selvagens como *Hanseniaspora uvarum* e *Kloeckera apiculata* são potentes produtoras de ésteres (CABRANES; BLANCOB; MANGASA, 1998).

Na fermentação malolática a *Oenococcus* influencia as características aromáticas no produto final ou modificando os aromas da fruta, ou produzindo novos

compostos de aroma. Em específico, a *Oenococcus* metaboliza ácido L-málico em ácido cítrico (Figura 3) determinando a formação de acetoína e diacetil (NIELSEN; RICHELIEU, 1999).

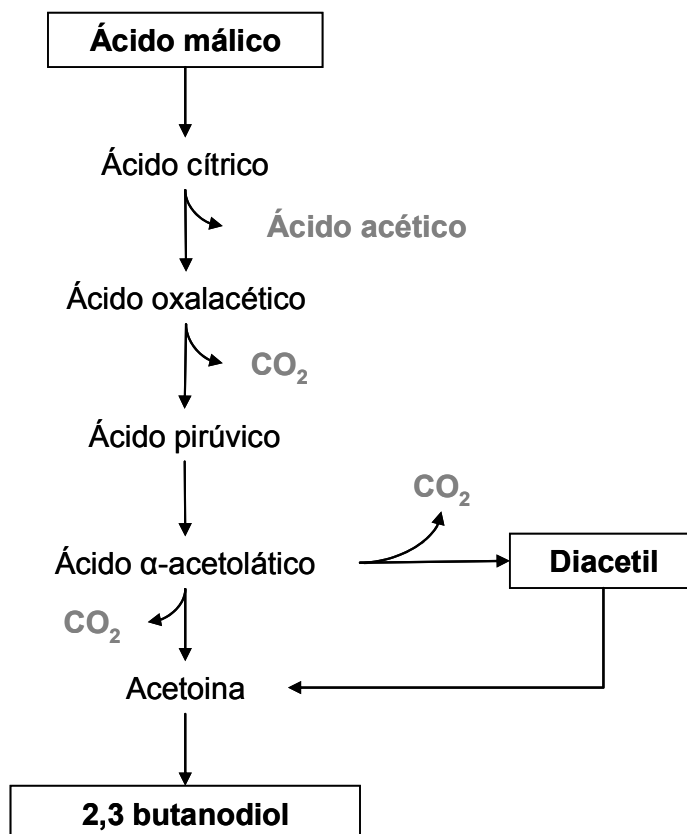


FIGURA 3. Metabolismo do ácido cítrico pela bactéria *Oenococcus oeni* (NIELSEN; RICHELIEU, 1999).

O ácido acetolático é um composto instável que, além da descarboxilação enzimática, pode ser originado por descarboxilação espontânea, formando a acetoína e em condições de oxidação, o diacetil. O diacetil é então reduzido pela *Oenococcus oeni* a acetoína e a 2,3-butanodiol, que em concentrações normais (1,3 g.L⁻¹) não apresentam influência sobre o aroma na maioria dos vinhos (NIELSEN; RICHELIEU, 1999).

O acetaldeído no vinho é formado por leveduras, bactérias acéticas e por auto-oxidação do etanol e compostos fenólicos. Pode-se ligar ao dióxido de enxofre

diminuindo assim a atividade antimicrobiana e o efeito antioxidante do mesmo. O crescimento microbiano pode ser estimulado ou inibido, dependendo da concentração do acetaldeído, o que tem implicações diretas nas fermentações alcoólica e malolática. Por outro lado, o catabolismo do acetaldeído pode gerar compostos de *flavours* que influenciam as propriedades sensoriais do vinho (LIU; PILONE, 2000).

Diferentes estudos têm focado a biossíntese de compostos de aroma durante a fermentação malolática e a concomitante consequência sensorial. Maicas *et al.* (1999) demonstrou que a fermentação malolática favorece a formação de compostos voláteis que são benéficos ao *flavour* do vinho. Em contraste, Sauvageot e Vivier (1997) conduziram análise sensorial em vinhos Chardonnay e Pinot Noir com e sem fermentação malolática e concluíram que os provadores não perceberam diferenças sensoriais entre os dois tipos de vinhos. Em outro estudo, conduzido por Sauvageot e Vivier (1997) a influência da cepa da bactéria ácido láctica usada para a fermentação malolática não apresentou interferência na composição e complexidade dos aromas do vinho.

3.4.4 Operações pós-fermentação

Os produtores de sidra fazem misturas dos fermentados para obter o equilíbrio gustativo e o teor de açúcares residuais. A fermentação é interrompida por vários tipos de filtração: sobre placas, com diatomáceas e em módulos de membranas para filtração tangencial, ambos têm a finalidade de eliminar as leveduras e as bactérias. A densidade na qual se efetua a filtração depende da

categoria da sidra desejada, que pode ser seca, semi-seca ou doce (NOGUEIRA; WOSIACKI, 2005).

Existem na literatura muitos estudos sobre o processamento do vinho e os fatores que afetam a qualidade. Do mesmo modo o processamento da sidra francesa já foi muito estudado e o comportamento dos microrganismos responsáveis pela transformação do mosto de maçã em sidra elucidado, no entanto, não está disponível na literatura dados sobre o comportamento dos microrganismos responsáveis pela fermentação do mosto de maçã nas condições brasileiras, que diferem significativamente da européia, o que afeta de maneira direta os processamentos industriais, resultando em um produto nacional atualmente de baixa qualidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Microorganismos

A levedura fermentativa utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* (FERMOL AROMÊ PLUS, da Pascal Biotech, Paris).

A bactéria láctica utilizada foi a *Oenococcus oeni* (ENOLAT DIR*01, Vêneto Mercantil), resistente ao sulfito, comercializada. Ambas foram utilizadas na forma seca ativa e conservadas à 7°C até utilização nesta pesquisa.

4.1.2 Frutas

Amostras de maçãs (*Malus domestica*) das cultivares Gala e Fuji, 2006/2007, fornecidas pela Empresa Agropecuária Boutin Ltda, localizada em Porto Amazonas, Paraná e adquiridas no comércio local, da cidade de Ponta Grossa. A cultivar Fuji somente foi utilizada no experimento de fermentação do mosto pasteurizado com inóculo de *Oenococcus oeni* (item 4.2.5.6). Nos demais experimentos utilizou-se a cultivar Gala.

4.2 Métodos

4.2.1 Processo

4.2.1.1 Mosto de maçãs

As maçãs devidamente classificadas em comerciais e industriais, foram pesadas em balança analítica (Gehaka) e em seguida fragmentadas em processador com facas (Processador Metvisa, tipo MPA) sendo, as massas raladas, transferidas para telas plásticas, superpostas, que foram submetidas a duas prensagens (Prensa hidráulica Eureka, Hoppe Ind. Ltda, Brasil). Sob pressão de $1,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ por 2 minutos e seguida de $4,0 \text{ kgf.cm}^{-2}$ por 5 minutos. O volume do suco bruto foi usado para o cálculo do rendimento e elaboração dos experimentos. O suco foi despectinizado com enzima Pectinex-Batch 1201371L à concentração $3,0 \text{ mL.hL}^{-1}$, em temperatura ambiente ($23 \pm 3^\circ\text{C}$) durante 4 horas. Em seguida, o suco foi trasfegado, filtrado em papel filtro qualitativo e distribuído nos fermentadores.

4.2.1.2 Processamento do fermentado de maçã

As microfermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 2000, 500 e 200 mL, lavados com água destilada e em seguida com etanol (99%). Estes erlenmeyers foram munidos de batoques e o volume útil utilizado foi de 1800, 450 e 150 mL, respectivamente, que corresponde entre 75 a 90% do volume total. Os sucos de maçãs clarificados adicionados foram mantidos em anaerobiose. Para

simulação de anaerobiose utilizou-se rolha de silicone na qual foi acoplada uma agulha conectada a uma mangueira de látex, que permitiu a liberação do gás carbônico (CO₂). A extremidade da mangueira de látex foi colocada dentro de um recipiente plástico contendo água destiladas com 200 mg.L⁻¹ de metabissulfito de potássio (Labsynth). Os números nos ensaios designados como P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀, P₃₅ e P₄₅ correspondem ao tempo em dias da fermentação.

A maioria dos experimentos foi realizada num total de 45 dias de fermentação, com exceção, aos experimentos com suco de maçã pasteurizado com inóculo da *Oenococcus Oeni*. Neste último, para verificar a capacidade de crescimento da bactéria utilizou-se um período de 1 a 3 dias, para verificar a capacidade de fermentação, 20 dias e para verificar a resistência ao sulfito, 5 a 25 dias.

4.2.2 Análises microbiológicas

4.2.2.1 Leveduras totais em placa

A determinação de leveduras fermentativas totais foi feita pela contagem de colônias em meio seletivo preparado com 39 g de meio BDA (Batata Dextrose Agar, Difco, 213400) diluído em 1000 mL de água destilada e aquecido em forno microondas para dissolução. As esterilizações do meio e da vidraria foram feitas em autoclave vertical (AV 13811, Phoenix) por 15 minutos (121°C a 1,01 Kgf.cm⁻²). Após a esterilização do meio foi adicionado o ácido tartárico (ACS-189, Ecibra), diluídos 1:10 (v/v), na concentração de 1,8%. Desse meio, 10 mL foram transferidos para placas de 90mm de diâmetro descartáveis (J. Prolab) e após solidificação, 100µL de

amostra foram inoculados na placa com o auxílio de um alça de Drigalski. Após incubação em estufa a 28°C durante 48 horas as colônias foram contadas manualmente e o resultado expresso em ufc.mL⁻¹ (NOGUEIRA, 2003).

4.2.2.2 Leveduras oxidativas

A determinação de leveduras apiculadas foi feita em meio seletivo preparado em duas etapas, na primeira, 11,75 g de extrato de levedura (Biobrás, cód. 155-1) foram diluídos em 500 mL de água destilada, posteriormente esterilizado em autoclave (AV 13811, Phoenix) por 15 minutos (121°C a 1,01 Kgf.cm⁻²). Na segunda etapa, o meio foi preparado com 2,3 g de lisina, 20 g de ágar-ágar (Rea-Tech), diluídos em 500 mL de água destilada, aquecidos até completa dissolução em forno microondas e esterilizado em autoclave. Após esterilização as duas etapas foram misturadas e 10 mL introduzidos em placas de 90mm de diâmetro descartáveis (J. Prolab). Após a solidificação do meio, 100µL de amostra foram inoculados em placas com o auxílio de um alça de Drigalski. Após incubação em estufa a 28°C durante 72 horas as colônias foram contadas manualmente e o resultado expresso em ufc.mL⁻¹ (NOGUEIRA, 2003).

4.2.2.3 Bactérias lácticas

A determinação de bactérias lácticas foi feita em meio seletivo, utilizando 50g de MRS (Lactobacilli MRS, Broth), diluído em 950 mL de água destilada, o pH foi ajustado a 4,8 com ácido fosfórico (Biotec) concentrado. Em seguida, foram adicionados 20 g de agar-agar (Rea-Tech) e o volume foi completado com água

bidestilada até 1000 mL. O meio foi aquecido até completa dissolução em forno microondas. A esterilização foi realizada em autoclave (AV 13811, Phoenix) por 15 minutos (121°C a $1,01\text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$). Foi preparada uma solução de antibióticos utilizando 20 mg de Actidione (Cycloheximide Sigma C1988-5G) e 5,0 mg de oxine (8-quinolinol Sigma H6878-25G) em 10,0 mL de água bidestilada e esterilizada por filtração em membrana estéril de 0,45 microns. Para a análise, foram introduzidos na placa 1,0 mL da amostra, 0,5 mL da solução de antibiótico e 10,0 mL do meio de cultura com a forma de cultivo Pour Plate. As placas foram dispostas em jarras de anaerobiose (Permutation) com pastilhas de consumo de oxigênio por reação de oxidação do ferro em meio ácido (Anaerobac, da Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda). Após a incubação por 8 dias a 28°C as colônias foram contadas manualmente e o resultado expresso em $\text{ufc}\cdot\text{mL}^{-1}$ (NOGUEIRA, 2003).

4.2.3 Análises físico-químicas

4.2.3.1 Açúcares

Açúcares redutores (AR) foram analisados pelo método colorimétrico de Somogyi-Nelson, assim como os **açúcares redutores totais** (ART) após a hidrólise da sacarose com HCl 1N ($50^{\circ}\text{C}/5\text{ min.}$). A **glucose** (GLC) foi quantificada pelo método enzimático da glucose oxidase (Glicose pp, 434E, Analisa), sendo que a **sacarose** (SAC) foi determinada pela diferença entre os açúcares redutores totais e solúveis e a **frutose** (FRU) pela diferença entre os açúcares redutores solúveis e a glucose. Todos os carboidratos foram expressos como monossacarídeos em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

(IAL, 1976) (TANNER; BRUNNER, 1985). Os resultados das análises de glucose e frutose foram confirmados por Kit enzimático (cód. 0139106, Roche).

4.2.3.2 Acidez titulável

A acidez titulável total foi determinada por neutralização com NaOH 0,1 N até pH 8,3 com fenolftaleína, sendo expresso em g.L^{-1} (IAL, 1976).

4.2.3.3 Acidez volátil

Na determinação da acidez volátil 10,0 mL da amostra foram transferidos para o aparelho de Casenave-Ferré acoplado a um frasco Erlenmeyer de 500 mL. Em seguida foram adicionados 200 mL de água destilada. O Erlenmeyer foi acoplado a um refrigerador de Liebig e aquecido em bico de Bunsen com chama baixa até destilar o volume de 100 mL, o destilado foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 20 mL de água destilada. Em seguida 2,0 mL de indicador de Fenolftaleína foram adicionados para a titulação com solução de hidróxido de sódio (0,1N) até coloração rósea (IAL, 1976).

4.2.3.4 Ácidos orgânicos

Foram determinados os ácidos L-málico, D-lático e L-lático por Kits enzimáticos (L-Malic acid, cód. 10139068035 e D-Lactic, L-lactic, cód. 11112821035, Roche) de acordo com Herrero *et al.*, (1999).

4.2.3.5 pH

Foi determinado por imersão direta na amostra utilizando um Phmetro digital (pH digital microprocessado Tecnal, modelo TEC3-MP) (IAL, 1976).

4.2.3.6 Nitrogênio

O nitrogênio total foi quantificado por neutralização com HCl 0,02N, com solução de ácido bórico (2% e indicadores), após ter sido destilado em destilador de nitrogênio com NaOH 50%, sendo expresso em mg.L^{-1} (BARON; BOHUON; DRILLEAU, 1977).

4.2.3.7 Dióxido de enxofre total

Foram transferidos 50 mL da amostra em Erlenmeyer de 250 mL, com tampa esmirlhada. Adicionou-se 25 mL da solução de hidróxido de potássio 0,02N. O Erlenmeyer foi fechado, agitado e deixado repousar por 15 minutos. Foi adicionado 15 mL de ácido sulfúrico a 20% (Biotec) e de solução de amido a 1%. Titulou-se com iodo e o resultado foi expresso em mg.L^{-1} (IAL, 1976).

4.2.3.8 Álcool

A determinação da concentração de etanol (% de etanol em volume, à 20°C) no fermentado foi feita utilizando-se o equipamento ebuliômetro (Ebuliômetro

3300, Metalúrgica Leonardo). O ebulliômetro é composto de uma caldeira, onde fica a amostra a ser analisada, um condensador que é acoplado à caldeira onde são condensados vapores provenientes do líquido contido na caldeira e uma lamparina que fornece aquecimento à caldeira do ebulliômetro. Foram transferidos 50 mL da amostra para a caldeira do ebulliômetro e, logo após, o condensador foi preenchido com água fria e a lamparina acesa. Com um termômetro acoplado à caldeira, pôde-se medir a temperatura de ebulição da amostra, aguardando-se que a temperatura se estabilizasse, por um tempo de aproximadamente 5 minutos. Com o auxílio de uma régua graduada é feita a conversão da temperatura de ebulição para a concentração de etanol. O resultado é expresso em % (v/v).

4.2.4 Cinéticas de fermentação

A cinética de fermentação foi avaliada pela perda de peso dos fermentadores (Figura 4) causada pela liberação de gás carbônico (BELY; SABLAYROLLES; BARRE, 1990, NOGUEIRA *et al.*, 2007). As pesagens foram feitas a cada duas horas, no período diurno, em balança analítica (Gehaka) com sensibilidade de 0,001 g durante 45 dias (tempo de fermentação), em temperatura ambiente (22 a 30°C).

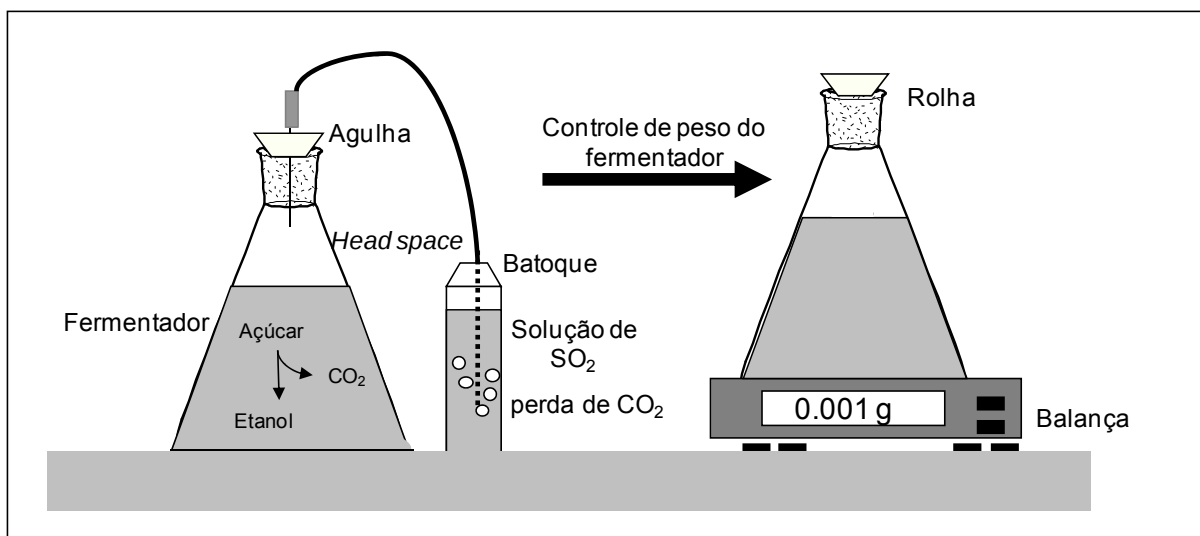


FIGURA 4. Esquema de um fermentador e da determinação de perda de gás carbônico para obtenção da cinética da fermentação (NOGUEIRA *et al.*, 2007).

Após as pesagens foi feita uma curva de tendência ou regressão de ordem 4 como R^2 e utilizada para corrigir os pontos de perda de peso. Após esta correção, foi calculada a derivada da perda de peso em função do tempo que consiste na velocidade de fermentação.

4.2.5 Experimentos

4.2.5.1 Microbiota natural de mostos de maçãs

Os microrganismos naturais de interesse neste trabalho foram os microrganismos responsáveis pela [1] fermentação alcoólica, os [2] potenciais produtores de aromas frutados e as [3] bactérias da bioconversão malolática. Para avaliar a quantidade de microrganismos provenientes das frutas, as maçãs foram classificadas em função das características morfológicas e fitossanitárias. As frutas

foram trituradas e prensadas segundo o método descrito anteriormente no item 4.2.1.1, retirada uma amostra do mosto para análise quantitativa de leveduras fermentativas totais, leveduras apiculadas totais e bactérias lácticas totais (Figura 5).

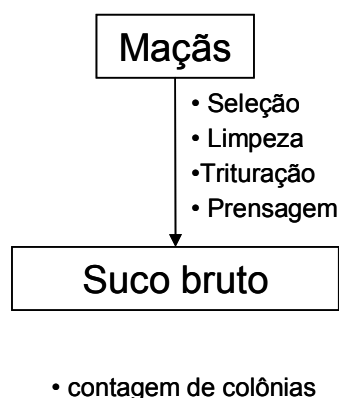


FIGURA 5. Fluxograma representativo do experimento da microbiota natural de mostos de maçãs.

4.2.5.2 Monitoramento da microbiota em fermentações naturais

O suco despectinizado foi distribuído em 6 fermentadores: P_0 , P_3 , P_{10} , P_{20} , P_{30} e P_{45} , e estes foram colocados em anaerobiose como descrito no item 4.2.1.2. A fermentação ocorreu com a microbiota natural (Figura 6). O experimento foi realizado em duplicata. A microbiota natural foi monitorada pela contagem de leveduras totais, oxidativas e de bactérias lácticas em meios seletivos em placas de Petri descartáveis (J. Prolab).

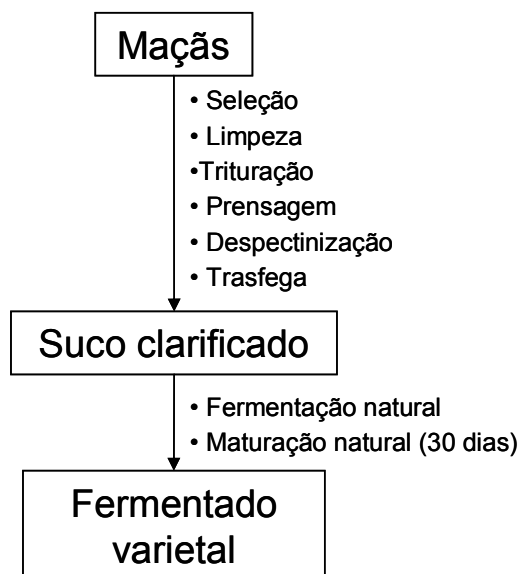


FIGURA 6. Fluxograma representativo do experimento de monitoramento da microbiota em fermentações naturais.

4.2.5.3 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* nas bactérias lácticas naturais

Para avaliar o crescimento das bactérias lácticas em fermentações com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*, o suco despectinizado foi distribuído em 6 fermentadores com volume útil de 450 mL: P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅. Em cada fermentador foram introduzidos 135 mg da levedura, que corresponde ao inóculo de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Figura 7). O experimento foi realizado em duplicata.

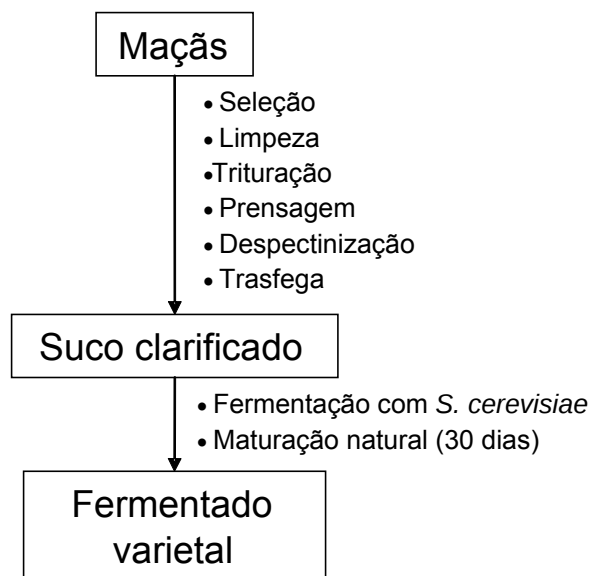


FIGURA 7. Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do inóculo de *S. cerevisiae* nas bactérias lácticas naturais.

4.2.5.4 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e redução de biomassa

Para avaliar a microbiota com a redução de biomassa foi introduzido um inóculo de 675 mg de *Saccharomyces cerevisiae* em 2250 mL de suco de maçã despectinizado, que corresponde ao inóculo de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Este foi fermentado por 12 horas, centrifugado por 20 min a 1500 rpm, com o objetivo de retirar parte da biomassa de *S. cerevisiae*. O sobrenadante foi retirado e distribuído em 6 fermentadores: P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅ (Figura 8). Para controle, foi realizado o experimento como descrito no item anterior (4.2.2.3).

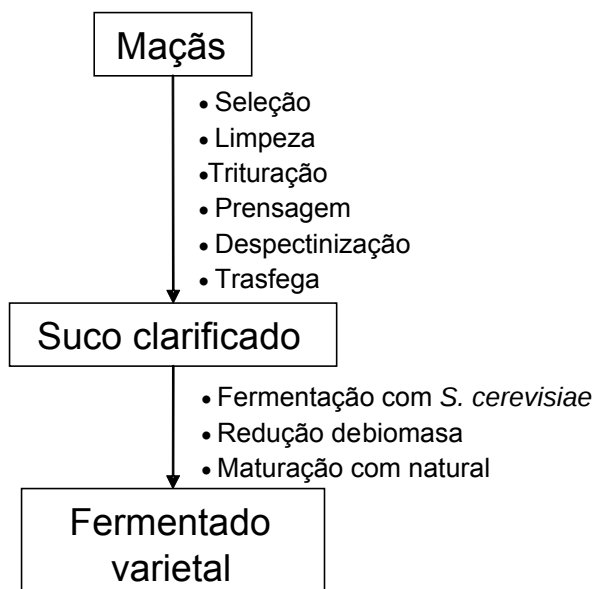


FIGURA 8. Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do inóculo de levedura e redução de biomassa.

4.2.5.5 Crescimento da *Oenococcus oeni* em suco de maçã clarificado

Para avaliar o crescimento da cepa comercial *Oenococcus oeni*, o suco de maçã foi processado, acondicionado em garrafas hermeticamente fechadas e pasteurizado (80°C/25 minutos). A fim de verificar o seu crescimento, o suco foi diluído 1:1 (v/v) com água destilada e autoclavado em autoclave vertical (AV 13811, Phoenix) por 15 min (121°C a 1,01 Kgf.cm⁻²) e foi distribuído em 4 fermentadores com volume útil de 450 mL cada: P_{1A}, P_{1B}, P_{2B} e P_{3B} (os números correspondem aos dias de fermentação). Em seguida, ao fermentador “A” foram adicionados 10 mg da bactéria láctica *Oenococcus oeni* e aos fermentadores “B” (P_{1B}, P_{2B} e P_{3B}) 50 mg, que corresponde a população de aproximadamente 1,00x10⁶ e 5,00x10⁶ células.mL⁻¹, respectivamente (Figura 9).

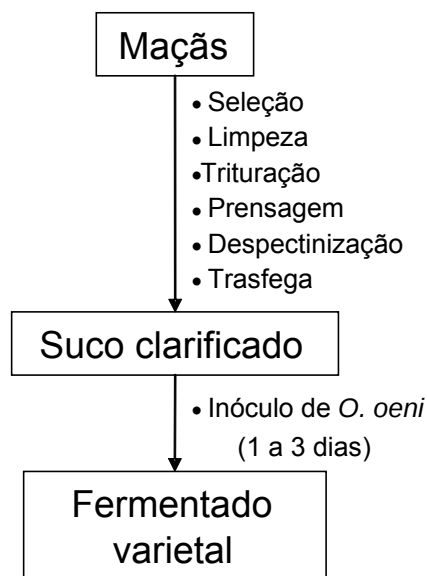


FIGURA 9. Fluxograma representativo do experimento para avaliar o crescimento de *Oenococcus oeni* em suco de maçã clarificado.

4.2.5.6 Fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado

Ao suco de maçãs das cultivares Fuji e Gala despectinizado e pasteurizado (80°C/25 minutos), foi inoculado a população de aproximadamente $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ de bactéria láctica *O. oeni* em fermentadores (P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅ dias) com 150 mL de volume útil (Figura 10).

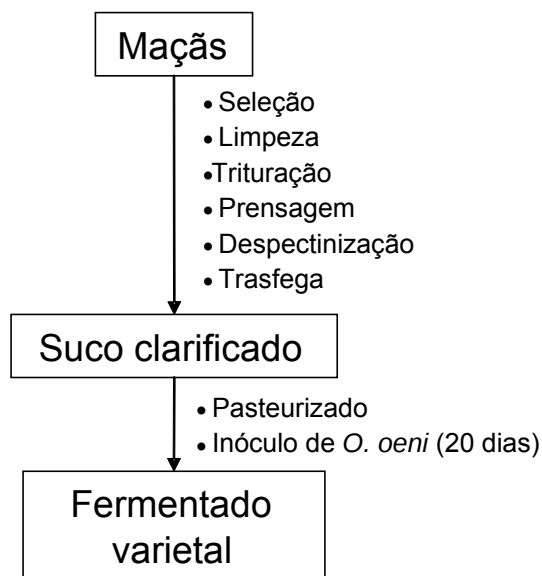


FIGURA 10. Fluxograma representativo do experimento para avaliar a fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado.

4.2.5.7 Efeito do sulfito no crescimento de *O. oeni* em suco de maçã

O suco de maçã despectinizado foi pasteurizado (80°C/25 minutos) e em seguida o suco foi distribuído em 8 fermentadores com volume útil de 150 mL. Em 4 fermentadores *Oenococcus oeni* foi inoculado à população de $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹, os tratamentos consistiram em: fermentador 1 (F₁) não foi adicionado sulfito e os fermentadores 2 (F₂); 3 (F₃) e 4 (F₄) foram adicionados 50,0; 100,0; 150,0 mg.L⁻¹ de sulfito (metabissulfito de potássio, Labsynth), respectivamente. Após 5 dias de fermentação foi feita a contagem das colônias em placas com meio seletivo.

Nos 4 fermentadores restantes foram inoculados 135 mg de *Saccharomyces cerevisiae*, que corresponde à população de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Os tratamentos consistiram em: fermentador 5 (F₅) sem sulfito; fermentadores 6 (F₆); 7 (F₇) e 8 (F₈) 50,0; 100,0 e 150,0 mg.L⁻¹ de sulfito. Após 20 dias de fermentação alcoólica foi feito o inóculo de 10 mg de *Oenococcus oeni* à população

aproximada de $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Figura 11) e após 5 dias foi feita a contagem das bactérias em placas contendo meio de cultura seletivos.

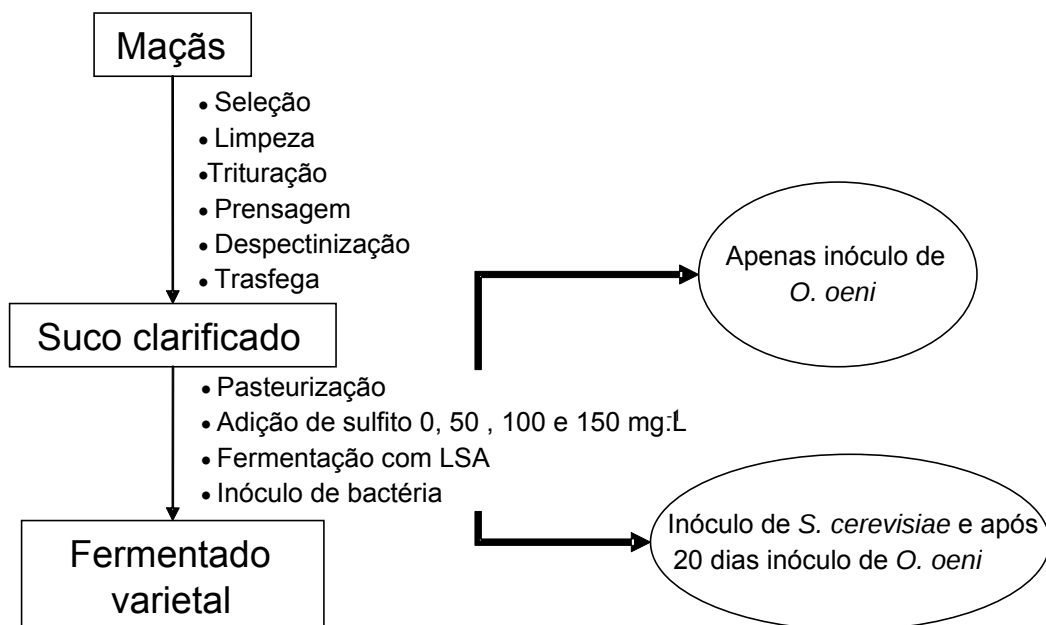


FIGURA 11. Fluxograma representativo do experimento para avaliar o efeito do sulfito no crescimento de *Oenococcus oeni* em suco de maçã.

4.2.5.8 Efeito do inóculo simultâneo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*

O suco despectinizado foi distribuído em 6 fermentadores: P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅ em cada fermentador foi adicionado *Saccharomyces cerevisiae* na população de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e *O. oeni* ao redor de $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹. O experimento foi realizado em duplicata.

4.2.5.9 Efeito do inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*

O suco despectinizado foi transferido para um fermentador com volume útil de 1800 mL. Em seguida foi feito o inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* na população de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e após 10 dias de fermentação em temperatura ambiente (média de 27°C) o fermentado de maçãs foi distribuído em 4 fermentadores: P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅ dias. Nesses fermentadores foram adicionados 10 mg de *Oenococcus Oeni*, que correspondem à população de aproximadamente $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹. As bactérias, bem como a fermentação malolática foram monitoradas por 35 dias.



(A)



(B)

FIGURA 12. Fotos do experimento de fermentação no início (A) e após 48 horas (B)

4.2.5.10 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* em suco pasteurizado

O suco pasteurizado foi distribuído em 6 fermentadores: P₀, P₃, P₁₀, P₂₀, P₃₀ e P₄₅ e cada fermentador recebeu o inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* na população de aproximadamente $6,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ e de *Oenococcus oeni* ao redor de $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹ (Figura 13).

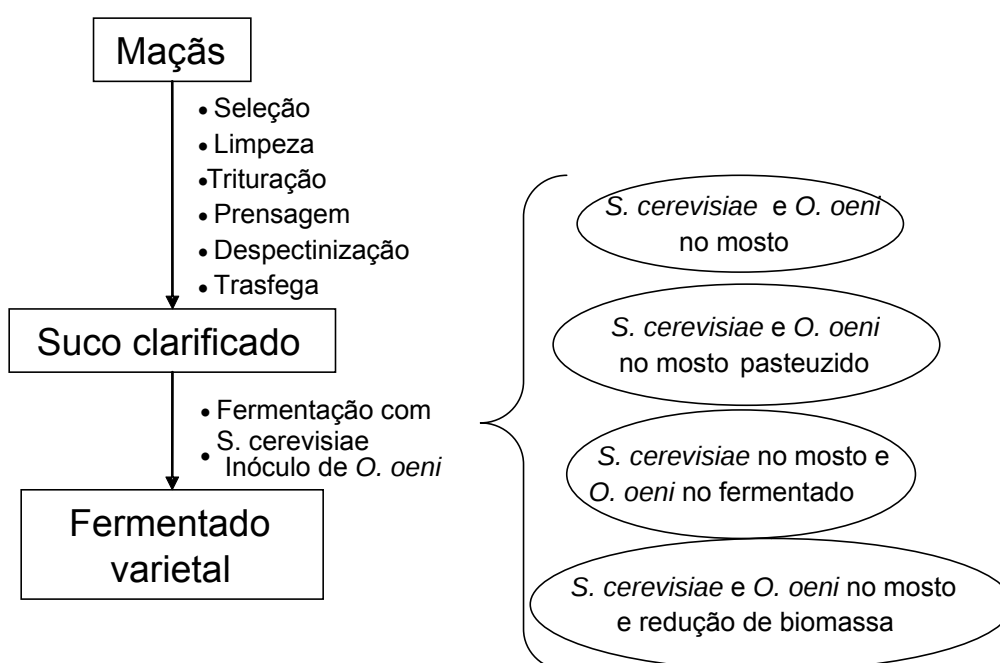


FIGURA 13. Fluxograma representativo das fermentações com inóculo *S. cerevisiae* e *O. oeni* em diferentes condições de inoculação da bactéria láctica.

4.2.5.11 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* com redução de biomassa

No suco despectinizado foi feito o inóculo de 810 mg de *Saccharomyces cerevisiae* e 60 mg de *Oenococcus oeni*, que correspondem aproximadamente a $6,00 \times 10^6$ e $1,00 \times 10^6$ células.mL⁻¹, respectivamente. Após 12 horas de fermentação,

o fermentado foi centrifugado por 20 minutos à 1500 rpm, o sobrenadante foi separado e a população de microrganismos foi reduzida para próximo ao valor do inóculo. Em seguida, o sobrenadante foi distribuído em 5 fermentadores (P_3 , P_{10} , P_{20} , P_{30} e P_{45}) em anaerobiose, para que ocorresse um novo crescimento das leveduras. Para controle, foi feito o experimento como descrito no item 4.2.2.10.



(A)



(B)

FIGURA 14. Fotos do experimento de fermentação no início (A) e após redução de biomassa (B).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microbiota natural de mostos de maçãs

As maçãs comerciais e industriais (descarte) (Figura 15) foram processadas separadamente. Nestes dois sucos foram avaliadas as populações totais de leveduras fermentativas e oxidativas, denominadas apiculadas e de bactérias lácticas (Tabela 1). Este processo foi repetido dez (10) vezes, com diferentes lotes de frutas para as leveduras fermentativas e oxidativas e oito (8) vezes para as bactérias lácticas. Estes microrganismos são os responsáveis pela transformação do mosto em fermentado de maçã (MICHEL; BIZEAU, 1988).



FIGURA 15. Amostras de maçãs comerciais e industriais (descarte) contendo defeitos, injúrias e/ou podridões.

As leveduras fermentativas, tipo *Saccharomyces* sp., variaram de $1,00 \times 10^2$ a $2,02 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹ nas maçãs comerciais, enquanto que nas maçãs industriais de $7,80 \times 10^1$ a $4,27 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, ou seja, valores semelhantes (Tabela 1). Os valores médios de $4,3 \times 10^3$ e $9,14 \times 10^3$ ufc.mL⁻¹ para os mostos comerciais e industriais, foram menores do que os valores encontrados por Nogueira *et al.* (2007) de $3,00 \times 10^4$ e $6,50 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹ em maçãs comerciais e industriais, respectivamente.

As populações de leveduras oxidativas variaram de $2,60 \times 10^3$ a $2,40 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹ nos mostos de maçãs comerciais, enquanto que nos mostos de maçãs industriais os valores foram superiores, compreendidos entre $1,03 \times 10^4$ a $1,24 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹. Nogueira *et al.* (2007) encontraram uma população média de leveduras apiculadas de $5,50 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹ em maçãs industriais da variedade Gala.

As bactérias lácticas variaram de 0 a $1,17 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹ nos mostos das maçãs comerciais. Nas maçãs industriais as populações foram semelhantes, variando de 0 a $1,41 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹.

TABELA 1. Microrganismos naturais em mostos de maçãs.

Microrganismos	Contagem (ufc.mL ⁻¹)					
	N	Mínimo	Média	Máximo	DP	CV(%)
<i>Maçãs comerciais</i>						
Leveduras fermentativas	10	$1,00 \times 10^2$	$4,31 \times 10^3$	$2,02 \times 10^4$	$6,64 \times 10^3$	153,84
Leveduras oxidativas	10	$2,60 \times 10^3$	$1,13 \times 10^4$	$2,40 \times 10^4$	$6,71 \times 10^3$	59,50
Bactérias lácticas	8	Ausente	$1,48 \times 10^1$	$1,17 \times 10^2$	$4,13 \times 10^1$	280,11
<i>Maçãs industriais</i>						
Leveduras fermentativas	10	$7,80 \times 10^1$	$9,14 \times 10^3$	$4,27 \times 10^4$	$1,38 \times 10^4$	150,84
Leveduras oxidativas	10	$1,03 \times 10^4$	$3,20 \times 10^5$	$1,24 \times 10^6$	$4,90 \times 10^5$	152,91
Bactérias lácticas	8	Ausente	$2,53 \times 10^1$	$1,41 \times 10^2$	$4,96 \times 10^1$	196,44

NOTA: (DP) Desvio padrão; (CV) coeficiente de variação.

5.2 Monitoramento da microbiota em fermentações naturais

Para monitorar o processo fermentativo natural, maçãs da cultivar Gala foram processadas e o mosto foi despectinizado. Em seguida foi transferido para fermentadores em anaerobiose para que a fermentação ocorresse. Durante o experimento a temperatura no interior do fermentador variou de 24,9 a 30,7°C (Figura 16).

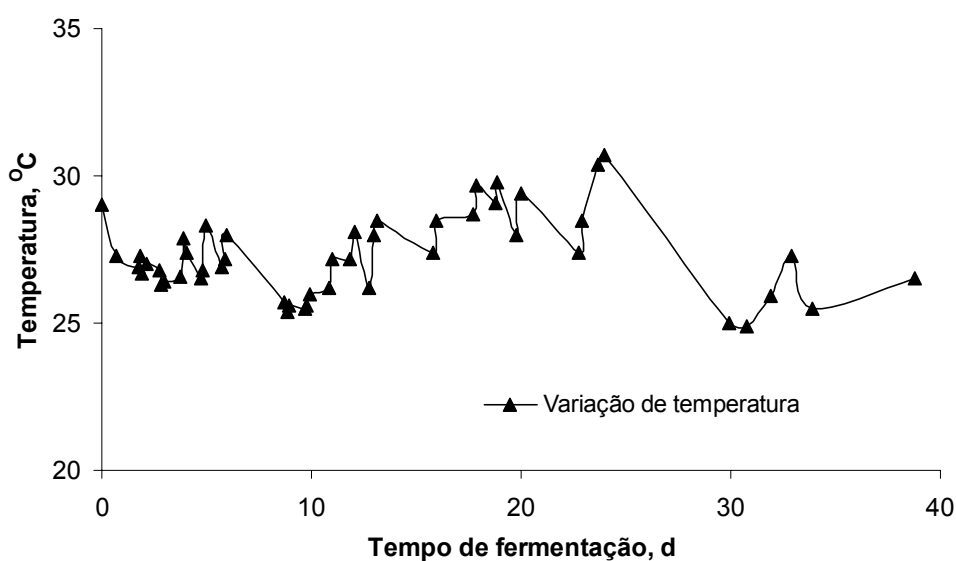


FIGURA 16. Variação de temperatura no interior do fermentador.

A composição inicial do mosto pode ser observada na Tabela 2, no tempo zero. A concentração de açúcares redutores totais e os redutores foram de 111,83 e 80,75 g.L⁻¹, respectivamente, o que atesta o estágio de maturidade das frutas. A frutose foi o açúcar em maior concentração (64,61g.L⁻¹), a sacarose esteve presente em concentração de aproximadamente 50% do teor de frutose (31,08 g.L⁻¹) enquanto que glicose foi o açúcar fermentescível de menor concentração (15,15 g.L⁻¹). Estes dados estão de acordo com os valores encontrados por Paganini *et al.* (2004); Wosiacki; Pholman e Nogueira (2004) e Nogueira *et al.* (2006).

A concentração de nitrogênio total de 150,00 mg.L⁻¹ corresponde a uma concentração considerada o limite máximo do valor normal (75-150 mg.L⁻¹) (NOGUEIRA, 2003).

Os valores de pH (4,03), acidez total (2,35 g de ácido málico e/ou láctico.L⁻¹) e acidez volátil (0,72 g de ácido acético.L⁻¹), são considerados normais para sucos de maçãs de mesa (OLIVEIRA *et al.*, 2006) (NOGUEIRA *et al.*, 2006).

A concentração de ácido málico, principal ácido encontrado em maçãs (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2005), foi de 2,60 g.L⁻¹, valor menor do que o encontrado por Drilleau (1995) de 4,0 a 6,0 g.L⁻¹. Uma pequena quantidade de ácido L-lático foi detectada (0,16 mg.L⁻¹) e ausência de ácido D-lático.

TABELA 2. Composição do mosto de maçãs e monitoramento durante a fermentação natural.

Análises	Período de fermentação (dias)				
	0	3	10	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	111,83±0,04	108,82±0,21	22,02±0,01	4,61± 0,01	2,89±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	80,75±0,20	79,74±0,20	10,09±0,02	2,82±0,00	2,72±0,01
Frutose, g.L ⁻¹	64,61±0,19	63,89±0,21	9,22±0,02	2,81±0,01	2,70±0,03
Sacarose, g.L ⁻¹	31,08±0,16	29,08±0,22	11,94±0,01	1,79±0,00	0,18±0,03
Glucose, g.L ⁻¹	16,15±0,01	15,85±0,01	0,87±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
Etanol, % (v/v)	0,00	0,20	4,90	5,60	5,60
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	150±0,00	150±0,00	50±0,00	30±0,00	90±0,00
pH	4,03	4,29	3,53	3,48	3,42
Acidez total, g.L ⁻¹	2,35±0,01	2,05±0,00	4,05±0,01	5,08±0,01	6,25±0,00
Ácido málico, g.L ⁻¹	2,60	2,17	0,43	0,01	0,005
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,72±0,00	0,74±0,00	0,56±0,00	0,82±0,00	1,27±0,01
Ácido L-lático, g.L ⁻¹	0,16	0,20	3,06	4,25	4,97
Ácido D-lático, g.L ⁻¹	***	--	***	--	***
Anidrido sulfuroso g.L ⁻¹	0,00	2,56	5,12	3,84	3,84

Nota: (--) Não analisada; (***) Traços.

Durante o experimento de fermentação natural do mosto de maçã, as leveduras fermentativas inicialmente presentes em uma população de 4,25x10⁴ ufc.mL⁻¹ apresentaram um rápido crescimento e após 3 dias de fermentação a população encontrada foi de 1,94x10⁶ ufc.mL⁻¹. Esta população permaneceu estável com 7,10x10⁶ e 2,27 x10⁶ ufc.mL⁻¹ após 10 e 20 dias, respectivamente. Na fermentação alcoólica (20 dias) as leveduras consumiram 120 mg.L⁻¹ de nitrogênio para formação de biomassa. Com o término dos açúcares fermentescíveis as leveduras começaram a perder a viabilidade, passando a populações de 1,95x10⁵ e 3,15x10³ ufc.mL⁻¹ em 30 e 45 dias de fermentação, respectivamente.

A produção de anidrido sulfuroso pelas leveduras variou de 2,56 a 5,12 g.L⁻¹, fator que não influenciou a inibição das bactérias lácticas (OSBORNE; EDWARDS, 2006).

As leveduras utilizaram em 3 dias de fermentação 2,69% dos açúcares redutores totais na produção de 0,20% (v/v) de etanol. Este consumo aumentou gradativamente e 95,88% dos açúcares redutores totais foram fermentados em 30 dias com produção de 5,60% (v/v) de etanol (Figura 17).

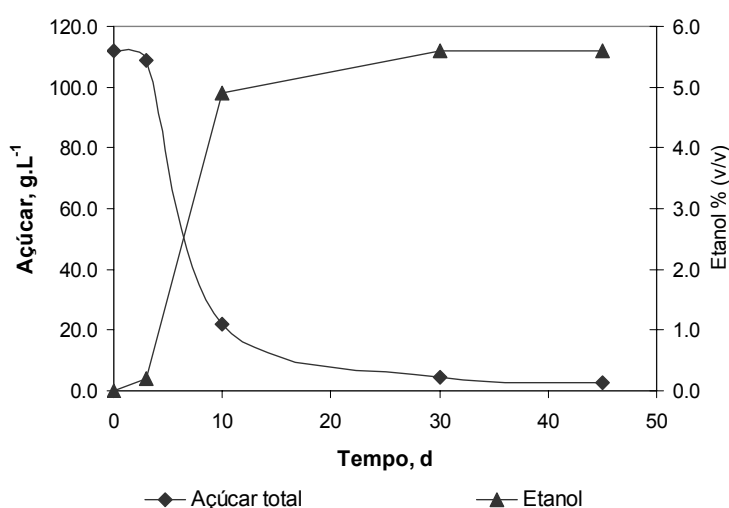


FIGURA 17. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação natural.

As leveduras apiculadas presentes no suco em uma população superior às leveduras fermentativas, apresentaram um rápido crescimento, passando de $2,00 \times 10^5$ a $3,78 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 3 dias de fermentação. Este mesmo comportamento foi observado por Nogueira (2003), que constatou neste período uma população de leveduras apiculadas superior às leveduras fermentativas em mosto de maçã da cultivar Gala.

Durante o crescimento das leveduras fermentativas ocorreu a inibição das leveduras apiculadas, fato que foi observado por Martinez et al. (1989). Após 10 dias de fermentação a população de células vivas foi de $7,60 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹. Com a perda de viabilidade e a autólise das leveduras fermentativas (final da fermentação alcoólica), as leveduras apiculadas iniciaram um novo crescimento, apresentando após 30 dias de fermentação $3,65 \times 10^3$ ufc.mL⁻¹. Este crescimento foi momentâneo e a população voltou a diminuir, mantendo-se estável até o término do experimento (Figura 18).

A baixa população de bactérias lácticas provenientes das maçãs ($1,14 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹), diminuiu ainda mais devido a competição e compostos inibitórios, conforme descrito por Osborne e Edwards (2007). Estes compostos são secretados pelas leveduras durante seu crescimento e em 10 dias de fermentação a população observada foi de 8,50 ufc.mL⁻¹. Ao final da fermentação alcoólica com a morte das leveduras fermentativas e liberação de compostos que estimulam o crescimento (PATYNOWSKI; JIRANEK; MARKIDES, 2002) a população passou a $4,13 \times 10^4$. Esta população manteve-se até o término do experimento (Figura 18).

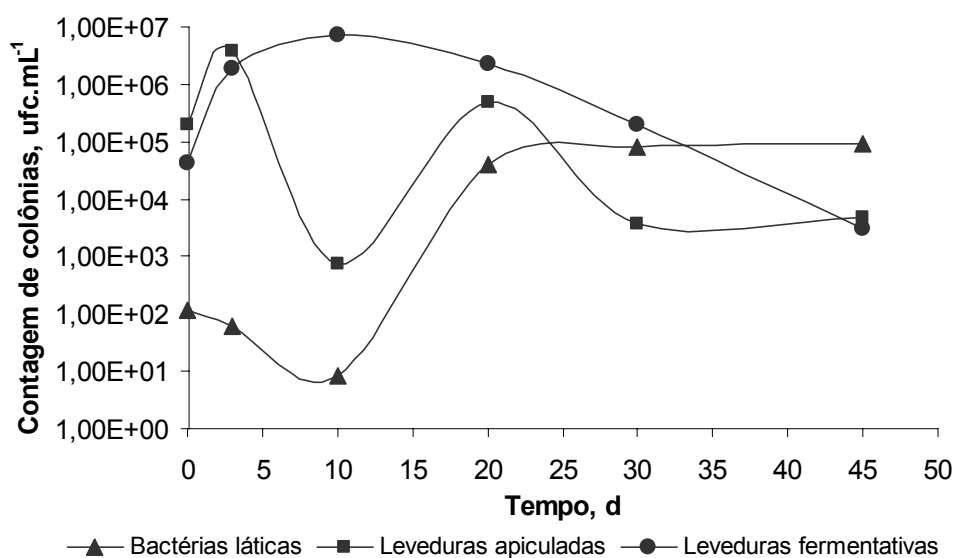


FIGURA 18. Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação natural.

O pH inicial do mosto de 4,03 passou a 3,42 em 45 dias de fermentação e a acidez total de 2,35 g.L⁻¹ aumentou para 6,25 g.L⁻¹, devido a transformação de monossacarídeos em ácidos orgânicos pelas bactérias láticas, com destaque para o ácido lático (Tabela 2).

Os microrganismos metabolizaram o ácido málico proveniente das maçãs que de 2,60 g.L⁻¹ passou para 0,43 e 0,005 g.L⁻¹ em 10 e 45 dias de fermentação, respectivamente. A concentração de ácido L-lático passou de 0,16 para 3,06 e 4,97 g.L⁻¹ em 10 e 45 dias, respectivamente (Figura 19). O ácido D-lático foi encontrado em uma quantidade muito pequena, demonstrando que o ácido málico foi convertido pelas bactérias láticas em ácido L-lático (LONVAUD-FUNEL, 1999).

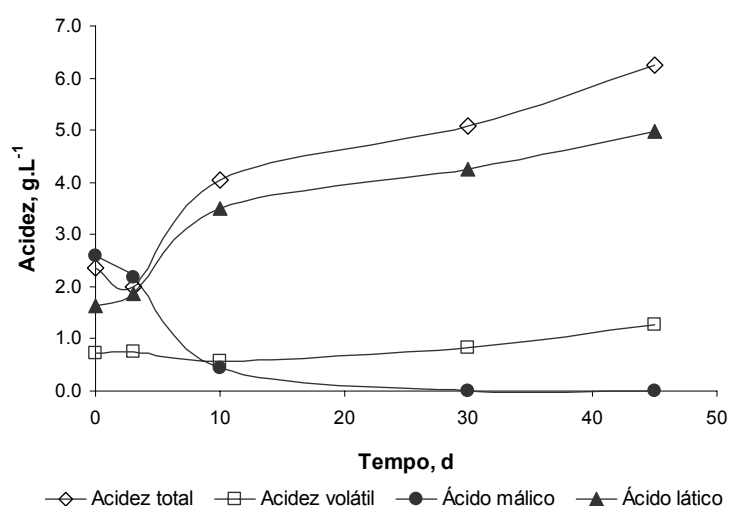


FIGURA 19. Evolução dos ácidos orgânicos durante a fermentação natural.

Durante a fermentação natural foram liberados 23,54 g.L⁻¹ de gás carbônico. A velocidade máxima da fermentação foi de 2,57 g.L⁻¹.d⁻¹ em 3 dias de processo. Após 24 dias, o peso do fermentador permaneceu constante, indicando o término dos açúcares fermentescíveis (Figura 20).

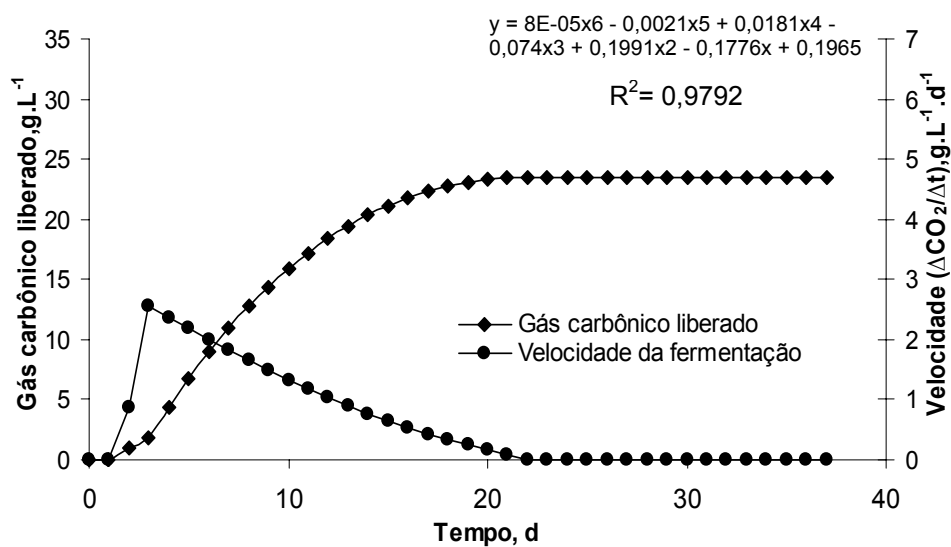


FIGURA 20. Cinética da fermentação natural em função da perda de peso dos fermentadores decorrente da liberação de gás carbônico.

5.3 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* nas bactérias lácticas naturais

O mosto de maçã utilizado na fermentação com inóculo de levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o mesmo descrito no primeiro experimento do item 5.2 e os resultados foram demonstrados na Tabela 3. Durante a fermentação a temperatura média do interior do fermentador foi de $27,29 \pm 3,41$ °C, ideal para o crescimento das bactérias lácticas, o que está de acordo com o que foi descrito por Britz e Tracey (1990).

TABELA 3 Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de leveduras *S. cerevisiae*.

Análises, g.L ⁻¹	Período de fermentação (dias)					
	0	3	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	111,83±0,04	47,53±0,06	1,53±0,00	0,76±0,00	0,39±0,00	0,33±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	80,75±0,20	43,33±0,20	1,52±0,00	0,60±0,00	0,18±0,00	0,11±0,00
Frutose, g.L ⁻¹	64,61±0,19	36,89±0,18	1,51±0,00	0,59±0,00	0,17±0,00	0,10±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	31,08±0,16	4,19±0,14	0,00±0,00	0,16±0,00	0,21±0,00	0,22±0,00
Glucose, g.L ⁻¹	16,15±0,01	6,44±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	3,75	6,50	6,20	6,50	6,35
pH	4,03	3,96	4,22	4,14	4,06	3,82
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,72±0,00	0,64±0,00	0,64±0,00	0,83±0,00	0,97±0,00	0,91±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,35±0,01	2,66±0,00	1,99±0,00	2,20±0,00	2,30±0,00	3,20±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	150±0,00	60±0,00	50±0,00	110±0,00	110±0,00	100±0,00
Ácido málico, g.L ⁻¹	2,60	1,80	0,36	0,05	0,001	0,0005
Ácido L-lático, g.L ⁻¹	0,16	0,22	0,99	1,37	1,33	2,29
Ácido D-lático, g.L ⁻¹	***	--	***	--	--	***
Anidrido sulfuroso, g.L ⁻¹	0,00	3,84	4,48	6,40	3,84	3,85

Nota: (--)Não analisada; (***) Traços.

As leveduras inoculadas em uma população de $6,02 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ passaram para $2,43 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 3 dias de fermentação. Esta população permaneceu estável até o décimo dia de fermentação. Nesse período, foram metabolizados 97,66 e 99,94% de glicose e frutose, respectivamente.

A autólise das leveduras afetou extremamente as concentrações dos compostos nitrogenados que passaram de 50 mg.L⁻¹ no décimo dia de fermentação

para 110 mg.L^{-1} no vigésimo dia. Lurton; Segain e Feuillat (1989) verificaram aumentos na concentração de nitrogênio durante a autólise das leveduras em vinhos. A partir do vigésimo dia de fermentação as células viáveis diminuíram gradativamente apresentando em 45 dias $6,40 \times 10^2 \text{ ufc.mL}^{-1}$, conforme Figura 22.

A produção de anidrido sulfuroso pelas leveduras variou de $3,84$ a $6,30 \text{ g.L}^{-1}$, porém não influenciou a inibição das bactérias lácticas isoladamente, o que foi observado no trabalho de Osborne e Edwards (2006).

As leveduras inoculadas fermentaram 57,50% dos açúcares redutores totais para a produção de 3,75% de etanol (v/v) em 3 dias de fermentação (Figura 21). A sacarose foi rapidamente hidrolisada (86,51%), resultados que concordam com os de Herrero *et al* (1999). As análises realizadas no décimo dia demonstraram que foram fermentados 98,63% de açúcares redutores totais para a produção de 6,5% de etanol (v/v) e 100 mg.L^{-1} de nitrogênio foram utilizados na produção de biomassa.

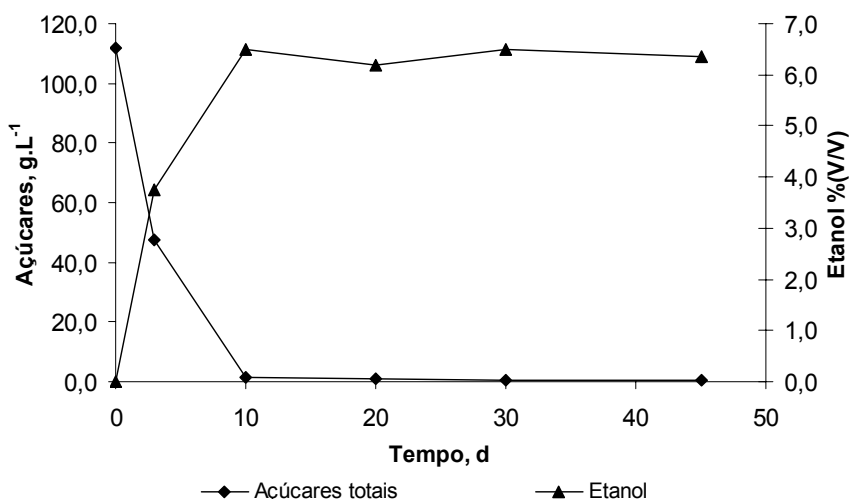


FIGURA 21. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo da levedura *S. cerevisiae*.

As leveduras apiculadas provenientes das maçãs ($2,00 \times 10^5 \text{ ufc.mL}^{-1}$) aumentaram para $5,60 \times 10^5 \text{ ufc.mL}^{-1}$ até serem inibidas, o que ocorreu no terceiro dia

de fermentação (Figura 22). Comportamento similar foi observado por Martinez; Millan e Ortega (1989) na fermentação de vinho.

A população de bactérias lácticas provenientes das maçãs foi de $1,14 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹, este valor está de acordo com Drilleau (1995).

A população de bactérias lácticas manteve-se baixa até a perda de viabilidade das leveduras fermentativas. A partir do décimo dia de fermentação a população aumentou gradativamente até atingir $1,14 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias e $4,59 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 45 dias (Figura 22).

O consumo de nitrogênio para formação de biomassa e crescimento microbiano foi em torno de 10 mg.L⁻¹, valores similares foram observados por Remize *et al.* (2006) em condições vinícolas.

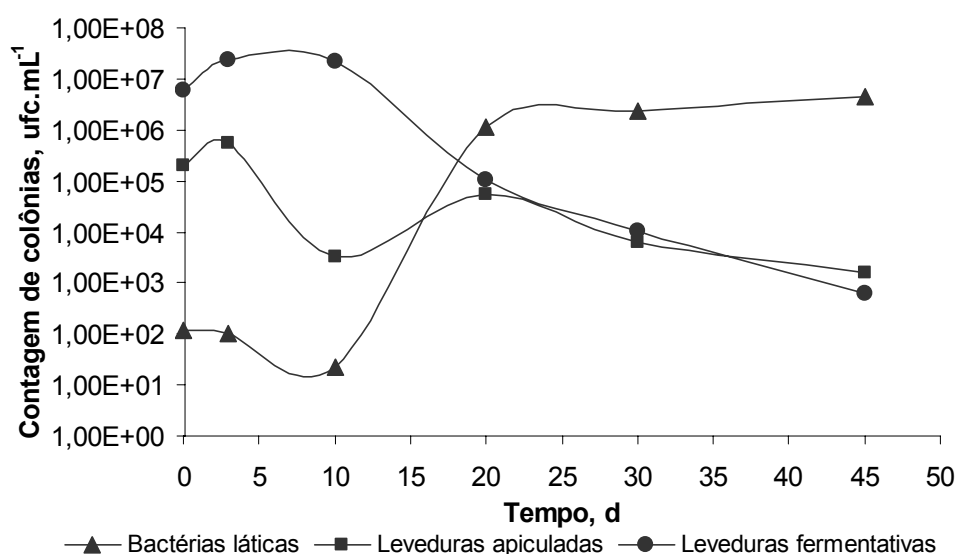


FIGURA 22. Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae*.

As bactérias lácticas metabolizaram o ácido málico proveniente das maçãs, o qual passou de 2,60 do primeiro dia para 0,36 g.L⁻¹ e 0,001 g.L⁻¹ no décimo e trigésimo dia de fermentação, respectivamente. Concomitantemente, os valores de

ácido L-lático aumentaram nesse período, passando de 0,16 para 0,99 e 1,33 g.L⁻¹ (Figura 23). Ainda neste período o pH diminuiu de 4,03 para 3,82 e a acidez total apresentou uma pequena variação, sendo observada 2,30 g.L⁻¹ no trigésimo dia de fermentação.

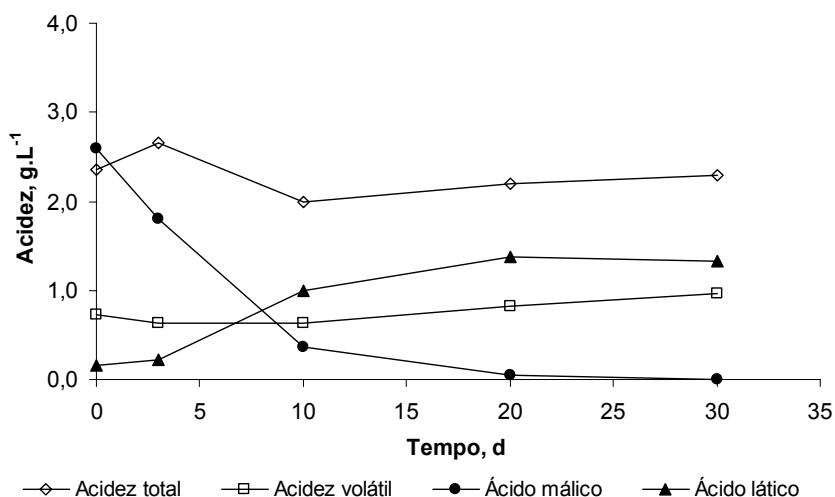


FIGURA 23. Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae*.

Durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* foram liberados 25,89 g.L⁻¹ de gás carbônico, valor menor que encontrado por Nogueira *et al.* (2007) de 29,23 g.L⁻¹ para fermentação de mosto de maçã Gala. A velocidade máxima da fermentação foi de 6,11 g.L⁻¹.d⁻¹ em 1 dia de processo. Após 9 dias o peso do fermentador permaneceu constante indicando o fim dos açúcares fermentescíveis (Figura 24).

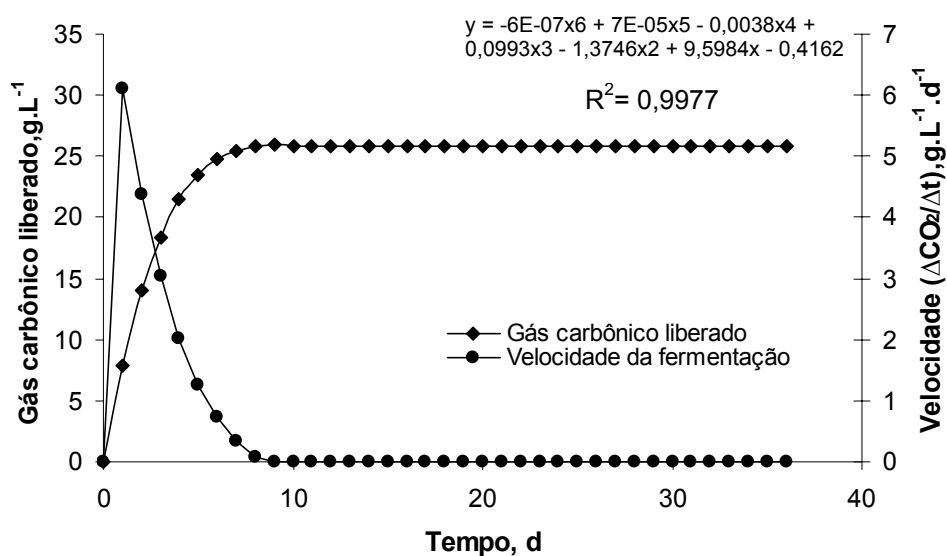


FIGURA 24. Cinética da fermentação com inóculo de leveduras *S. cerevisiae*.

5.4 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e redução de biomassa

Para monitorar o efeito do inóculo de leveduras fermentativas *S. cerevisiae* e a redução de biomassa na população de bactérias lácticas provenientes das maçãs, o mosto de maçã despectinizado foi transferido a fermentadores em anaerobiose. Para monitoramento da fermentação, a variação de temperatura dentro do fermentador foi avaliada e apresentada na Figura 25.

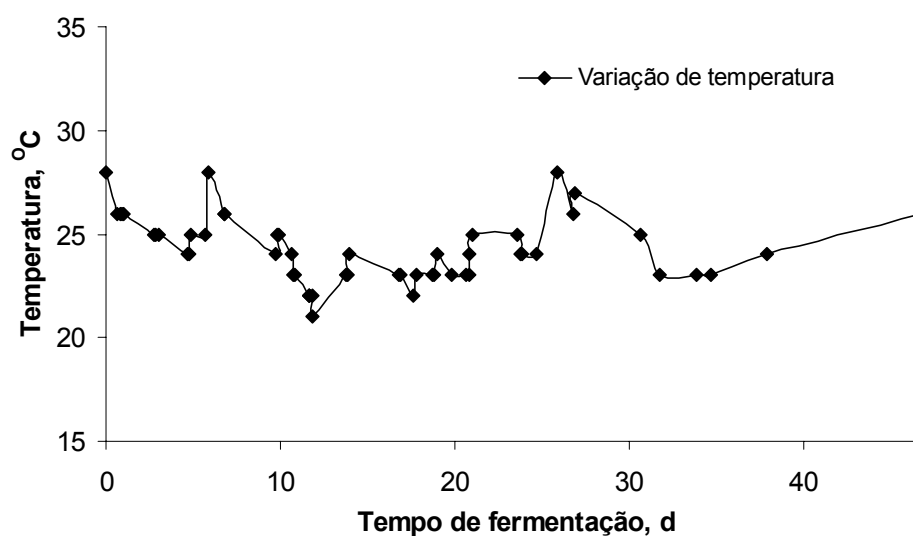


Figura 25. Variação de temperatura durante o experimento.

A composição inicial do mosto está demonstrada na Tabela 4. Os açúcares redutores totais e os redutores foram 114,83 e 88,83 g.L⁻¹ respectivamente, o que atesta o estágio de maturidade das frutas. A frutose foi o açúcar em maior concentração (66,25 g.L⁻¹), seguida da sacarose (26,00 g.L⁻¹) e da glicose (22,58 g.L⁻¹), ambas com concentrações próximas. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados por Paganini *et al.* (2004); Wosiacki; Pholman e Nogueira (2004) e Nogueira *et al.* (2006), que trabalharam sobre produtos derivados da maçã (suco, sidra, etc.).

TABELA 4. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação da sidra com inóculo de *S. cerevisiae*, com centrifugação do fermentado após 12 horas de fermentação.

Análises	Período de fermentação (dias)				
	0	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	114,83±0,76	22,45±0,02	2,06±0,01	1,19± 0,01	1,12±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	88,83±0,08	21,35±0,02	1,02±0,00	1,09±0,00	0,95±0,01
Frutose, g.L ⁻¹	66,25±0,01	20,63±0,00	1,00±0,00	1,07±0,00	0,94±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	26±0,69	1,11±0,00	1,04±0,01	0,03±0,01	0,24±0,01
Glucose, g.L ⁻¹	22,58±0,01	0,72±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	5,13	6,26	6,31	6,32
pH	3,88	3,79	--	4,16	4,08
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,71±0,00	0,52±0,00	0,44±0,00	0,55±0,00	0,57±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,19±0,00	3,12±0,01	1,26±0,00	1,81±0,00	2,12±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	200±0,00	--	80±0,00	80±0,00	80±0,00

Nota: (--) Não analisada.

O nitrogênio total dosado em 200 mg.L⁻¹ corresponde a uma concentração considerada acima do valor limite máximo (75-150 mg.L⁻¹), significando que a levedura não utilizará todo o nitrogênio assimilável (NOGUEIRA, 2003).

Foi observado o pH de 3,88, acidez total de 2,19 g.L⁻¹ e a acidez volátil de 0,71 g.L⁻¹ (demonstrados na Tabela 5) no suco de maçã, os quais estavam dentro dos padrões legais vigentes (BRASIL, 2000).

TABELA 5. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae*.

Análises	Período de fermentação (dias)					
	0	3	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	114,83±0,76	34,11±0,06	2,38±0,02	1,09±0,01	1,24±0,00	0,54±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	88,83±0,08	32,71±0,10	2,35±0,00	1,05±0,00	1,10±0,00	0,46±0,00
Frutose, g.L ⁻¹	66,25±0,08	30,11±0,10	2,34±0,00	1,03±0,00	1,07±0,00	0,45±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	26±0,69	1,4±0,10	0,03±0,02	0,04±0,00	0,13±0,00	0,08±0,00
Glucose, g.L ⁻¹	22,58±0,01	2,60±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	4,48	6,25	6,32	6,31	6,35
pH	3,88	3,72	4,10	--	4,27	4,18
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,71±0,00	0,77±0,01	0,50±0,00	0,61±0,01	0,38±0,00	0,71±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,14±0,00	3,21±0,01	1,66±0,00	1,61±0,00	1,70±0,00	1,70±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	200±0,00	70±0,00	--	90±0,00	150±0,00	160±0,00

Nota: (--) Não analisada.

Durante o experimento de fermentação com redução de biomassa, as leveduras fermentativas inoculadas em uma população de $6,60 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ diminuíram para $4,58 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ após a centrifugação em 13 horas, demonstrando desta forma, que o objetivo de reduzir a população para valores próximos ao inóculo foi alcançado.

Em 10 dias de fermentação a população de leveduras aumentou para $2,66 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹, permanecendo estável até o término do experimento. Diferentemente na fermentação controle (sem redução de biomassa) a população de leveduras aumentou de $4,25 \times 10^6$ para $5,78 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, do vigésimo ao quadragésimo quinto dia de fermentação (Figura 26).

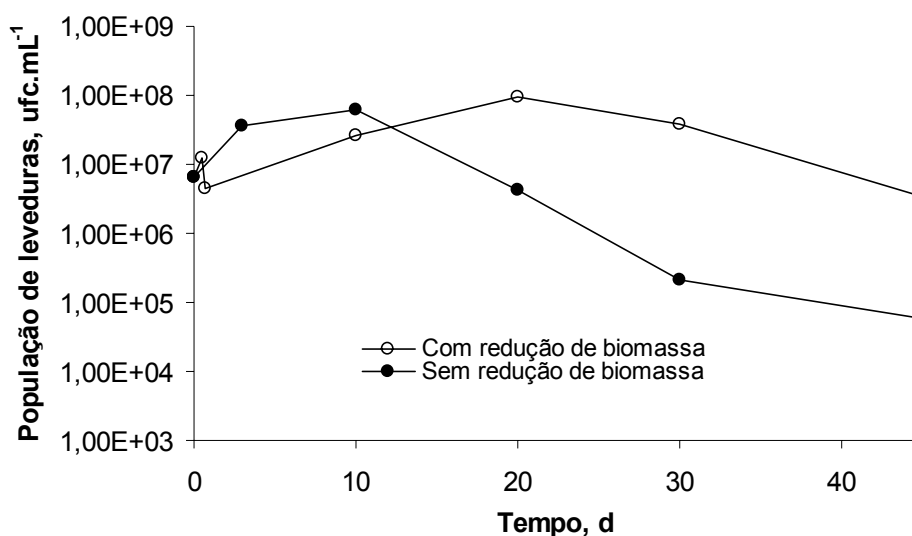


FIGURA 26. Efeito da redução de biomassa no crescimento das leveduras fermentativas.

Durante a fermentação com redução de biomassa, em 10 dias de fermentação, as leveduras fermentativas utilizaram 80,45% dos açúcares redutores totais na produção de 5,13% de etanol (v/v). Em 30 dias utilizaram 98,96% dos açúcares redutores totais e produziram 6,31% de etanol (v/v). A fermentação dos

açúcares foi lenta, quando comparado à fermentação controle sem redução de biomassa, a qual utilizou 97,93% dos açúcares redutores totais na produção de 6,25% de etanol (v/v) em 10 dias de fermentação (Figura 27).

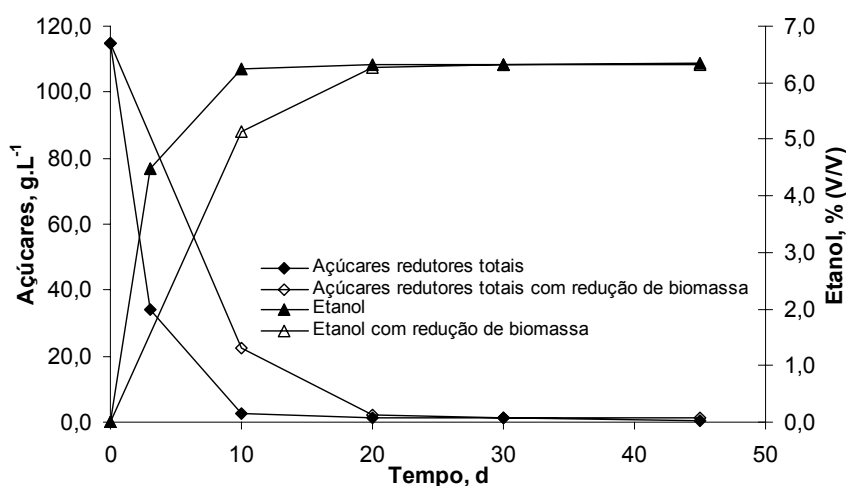


Figura 27. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo da levedura e com redução de biomassa.

As bactérias lácticas provenientes das maçãs ($8,30 \times 10^1$ ufc.mL⁻¹), durante a fermentação com redução de biomassa, aumentaram gradativamente sua população, passando para $4,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias e para $1,92 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 45 dias (Figura 28). As bactérias lácticas durante a fermentação controle (sem redução de biomassa) passaram de $8,30 \times 10^1$ para $3,60 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹ em 3 dias e atingiram $5,36 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias de fermentação. Os resultados denotaram que a população de bactérias durante a fermentação controle foi maior.

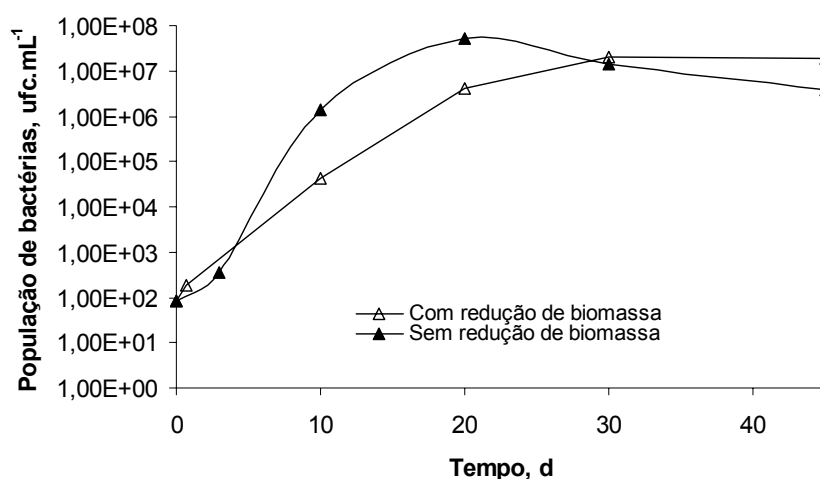


FIGURA 28. Efeito da redução de biomassa no crescimento das bactérias lácticas naturais.

Durante a fermentação com redução de biomassa a acidez total aumentou de 2,19 g.L⁻¹ no tempo zero para 2,12 g.L⁻¹ em 45 dias de fermentação. O pH evoluiu de 3,88 para 4,08 (Figura 29). Valores semelhantes foram observados durante a fermentação controle.

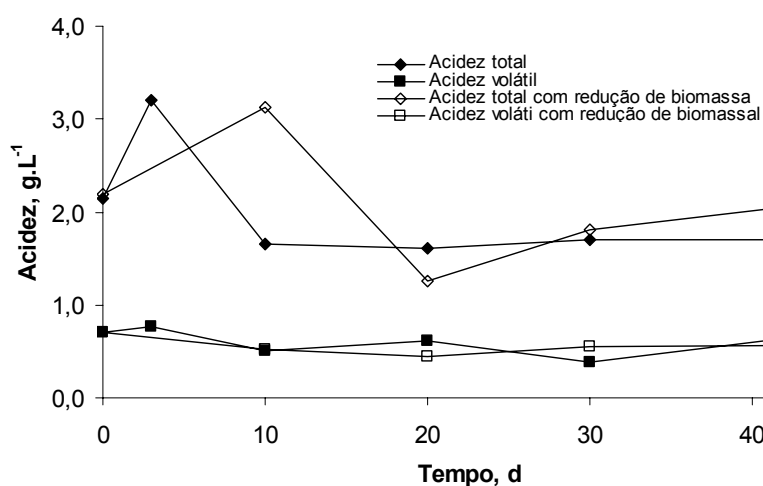


FIGURA 29. Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e lático durante a fermentação com inóculo da levedura e com redução de biomassa.

Durante a fermentação controle sem redução de biomassa foram liberados 30,45 g.L⁻¹ de gás carbônico, com velocidade máxima da fermentação de 4,42 g.L⁻¹.d⁻¹ nas primeiras 24 horas do processo. Após 13 dias o peso do fermentador permaneceu constante (Figura 30), indicando o término dos açúcares fermentescíveis.

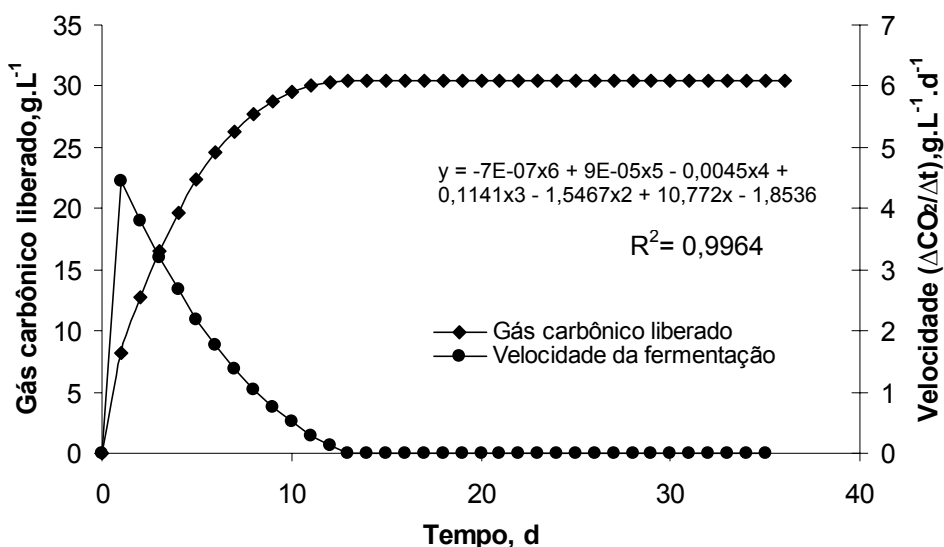


FIGURA 30. Cinética da fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e sem redução de biomassa.

Durante a fermentação com redução de biomassa foram liberados 21,54 g.L⁻¹ de gás carbônico, sendo que o peso do fermentador permaneceu constante após 26 dias. A velocidade máxima da fermentação foi de 2,33 g.L⁻¹.d⁻¹ nas primeiras 48 horas do processo (Figura 31). Indicando que a redução de biomassa resulta em uma fermentação lenta.

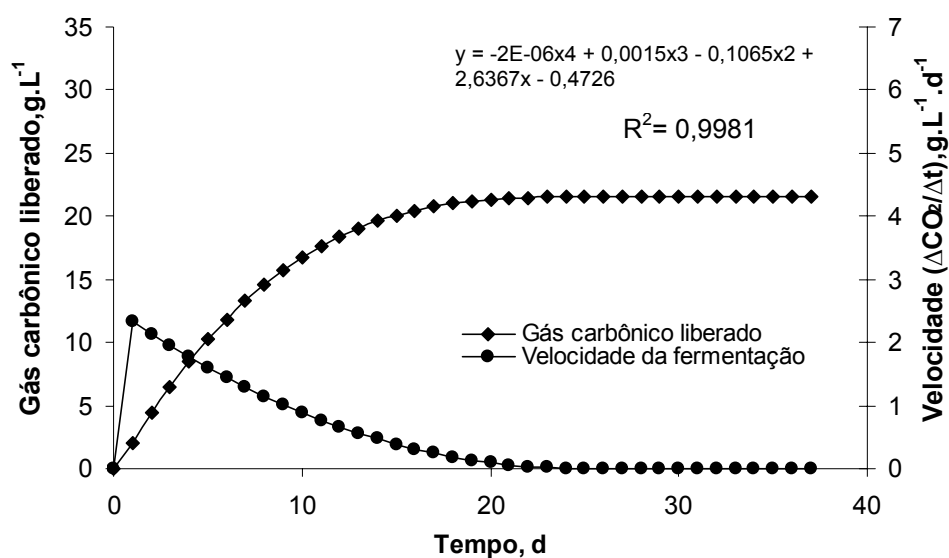


FIGURA 31. Cinética da fermentação com inóculo da levedura e redução de biomassa.

5.5 Crescimento de *Oenococcus oeni* em suco de maçã clarificado

As bactérias láticas inoculadas no mosto em uma população de $1,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ resultaram em uma população de $5,83 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ após 24 horas. Contudo, quando inoculadas em uma população de $5,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ resultaram em populações de $1,00 \times 10^7$, $1,48 \times 10^7$ e $9,10 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ após 24, 48 e 72 horas de fermentação, respectivamente. Notou-se desta forma, que esta cepa de bactéria tem a capacidade de crescer no mosto de maçã.

5.6 Fermentação malolática em suco de maçã pasteurizado

As bactérias láticas *Oenococcus oeni* inoculadas no mosto de maçã pasteurizado da cultivar Gala em uma população inicial de $1,81 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹,

aumentaram para $1,15 \times 10^7$ e $2,11 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ no terceiro e vigésimo dia de fermentação, respectivamente.

Quando inoculadas no mosto pasteurizado da cultivar Fuji aumentaram de $3,50 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ para $1,20 \times 10^7$ e $8,61 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ do terceiro para o vigésimo dia de fermentação, respectivamente (Figura 32), população superior à apresentada na fermentação do mosto da cultivar Gala.

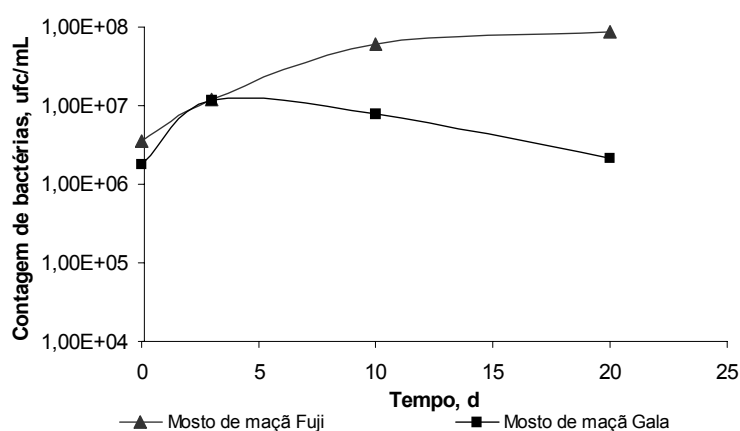


FIGURA 32. Desenvolvimento da bactéria láctica *O. oeni* durante a fermentação do mosto de maçãs da cultivar Gala e Fuji pasteurizado.

Durante a fermentação do mosto da cultivar Gala a acidez total passou de $2,32 \text{ g.L}^{-1}$ no início da fermentação para $1,39 \text{ g.L}^{-1}$ em 20 dias. Para a cultivar Fuji foi observado um aumento de $0,59 \text{ g.L}^{-1}$ na acidez total durante os 20 dias de fermentação (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae*.

Análises	Período de fermentação (dias)			
	0	3	10	20
<i>Cultivar Gala</i>				
Acidez total, g.L ⁻¹	2,32±0,01	1,86±0,01	1,37±0,00	1,39±0,01
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,34±0,01	0,46±0,01	0,48±0,01	0,52±0,01
<i>Cultivar Fuji</i>				
Acidez total, g.L ⁻¹	1,53±0,01	1,72±0,01	1,15±0,01	2,12±0,00
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,57±0,01	0,12±0,01	0,08±0,00	0,16±0,01
pH	3,96	4,21	4,52	4,20

5.7 Efeito do sulfito no crescimento de *O. oeni* em suco de maçã

Nas fermentações com inóculo de *Oenococcus oeni*, após 5 dias a contagem das populações de bactérias foram de $3,25 \times 10^7$, $4,02 \times 10^7$, $2,88 \times 10^7$ e $3,39 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ para os experimentos com ausência, 50, 100 e 150 mg.L⁻¹ de sulfito, respectivamente. Nas fermentações com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. Oeni*, as populações de microrganismos encontradas foram de $2,37 \times 10^7$, $3,28 \times 10^7$, $2,27 \times 10^7$ e $1,29 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ para os experimentos em ausência de sulfito, adição de 50, 100 e 150 mg.L⁻¹ de sulfito, respectivamente (Figura 33). A maior população observada foi para a adição de 50 mg.L⁻¹ de sulfito na fermentação com inóculo de *O. Oeni* e na fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*. A menor população foi observada para adição de 150 mg.L⁻¹ de sulfito. Sendo assim, esta bactéria demonstrou resistência ao sulfito.

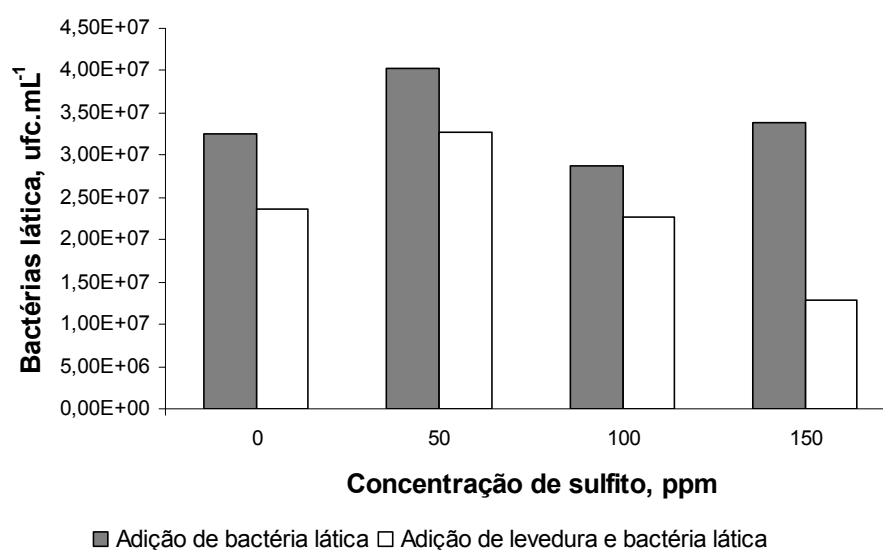


FIGURA 33. Crescimento da bactéria *O. Oeni*, adicionado ou não de *S. cerevisiae*, em suco de maçã pasteurizado, após 5 dias de fermentação.

A acidez total do mosto ($1,99 \pm 0,00 \text{ g.L}^{-1}$) diminuiu ao final do experimento e o pH aumentou, tanto na fermentação com inóculo de bactéria, quanto na fermentação com inóculo de levedura e bactéria (Tabela 7).

Tabela 7. Monitoramento da acidez total e volátil durante a fermentação do mosto de maçã com inóculo de *O. oeni* e sulfito.

Análises	Mosto	Concentração de sulfito (mg.L ⁻¹)			
		ausência	50	100	150
<i>Oenococcus oeni</i> (5 dias de fermentação)					
Acidez total, g.L ⁻¹	1,99±0,00	1,70±0,01	1,61±0,01	1,37±0,00	1,37±0,00
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,68±0,00	0,57±0,01	0,57±0,00	0,63±0,00	0,57±0,00
pH	3,76	4,06	4,08	4,07	4,10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Oenococcus oeni</i> . (25 dias de fermentação)					
Acidez total, g.L ⁻¹	1,99±0,00	1,61±0,00	1,79±0,01	1,68±0,00	1,57±0,00
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,68±0,00	0,44±0,01	0,55±0,01	0,36±0,00	0,30±0,01
pH	3,76	3,90	3,89	3,89	3,92

5.8 Efeito do inóculo simultâneo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*

A fermentação com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* e *Oenococcus oeni* foi realizada com o mesmo mosto descrito no primeiro experimento do item 5.2. e apresentado na Tabela 8. Durante a fermentação a temperatura média do interior do fermentador foi de $27,29 \pm 3,41$ °C.

TABELA 8. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e de *O. oeni* no mosto.

Análises	Período de fermentação, d					
	0	3	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	111,83±0,04	46,34±0,15	1,47±0,00	0,68±0,00	0,58±0,00	0,59±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	80,75±0,20	40,70±0,27	1,43±0,00	0,64±0,00	0,35±0,00	0,19±0,00
Frutose, g.L ⁻¹	64,61±0,19	33,47±0,15	1,42±0,00	0,63±0,00	0,34±0,00	0,18±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	31,08±0,16	5,65±0,44	0,03±0,00	0,04±0,01	0,23±0,00	0,40±0,00
Glucose, g.L ⁻¹	16,15±0,01	7,23±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	3,90	6,55	6,30	6,20	6,50
pH	4,03	3,89	4,04	4,02	4,10	3,80
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,72±0,00	0,52±0,00	0,66±0,00	1,17±0,01	1,06±0,00	0,91±0,01
Acidez total, g.L ⁻¹	2,35±0,01	2,54±0,01	2,12±0,00	2,58±0,00	2,36±0,01	2,98±0,01
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	150±0,00	80±0,00	60±0,00	120±0,00	130±0,00	120±0,00
Ácido málico, g.L ⁻¹	2,60	2,40	0,02	0,01	0,001	0,0001
Ácido L-lático, g.L ⁻¹	0,16	0,18	1,44	2,05	2,06	2,07
Ácido D-lático, g.L ⁻¹	--	***	--	***	***	0,00

Nota: (--) Não analisada; (***) Traços.

A *S. cerevisiae* inoculada em uma população correspondente a $6,02 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ cresceu rapidamente e em 3 dias de fermentação a população encontrada foi de $1,96 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹. Essa população iniciou a fase de perda de viabilidade das células apresentando em 20 dias a população de $6,20 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹. Herrero *et al.* (1999) observaram que as leveduras, no processamento da sidra, iniciavam a fase de perda de viabilidade em aproximadamente 10 dias, a temperatura de 22°C. A população permaneceu estável a partir do vigésimo dia até o término do experimento.

A *S. cerevisiae* fermentou 58,56 e 98,68% dos açúcares redutores com produção de 3,90 e 6,55% de etanol (v/v) em 3 dias e 10 dias de fermentação, respectivamente (Figura 34).

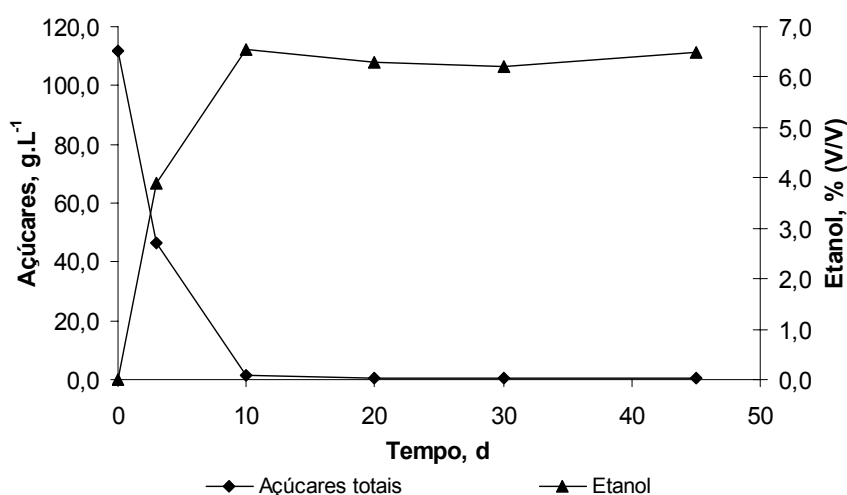


FIGURA 34. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

As leveduras apiculadas presentes no suco em uma população de $2,00 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹ cresceram ligeiramente apresentando em 3 dias de fermentação a população de $6,88 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹. Durante o crescimento das leveduras fermentativas ocorreu a inibição do desenvolvimento das leveduras apiculadas. Em 10 dias de fermentação a população observada foi de $1,09 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, permanecendo estável até o término do experimento (Figura 35).

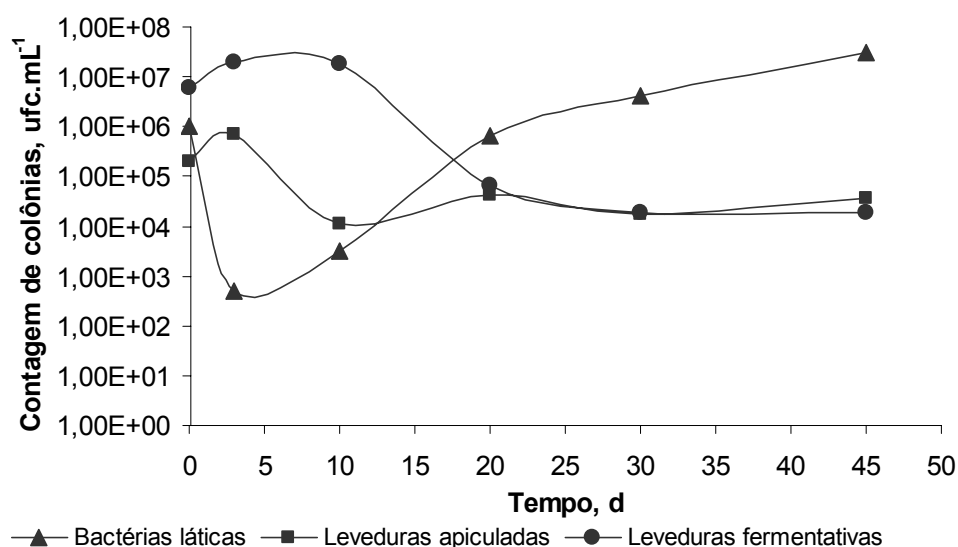


FIGURA 35. Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo simultâneo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

A população de bactérias lácticas inoculadas no suco ($1,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹) diminuiu, permanecendo baixa até o término da fermentação alcoólica. Com a autólise das leveduras, comprovado pelo aumento do nitrogênio que passou de 60 mg.L⁻¹ em 10 dias de fermentação para 120 mg.L⁻¹ em 20 dias, as bactérias iniciaram o aumento populacional. Em 20 dias de fermentação a população observada foi de $6,70 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹ e ao final do experimento $3,04 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹.

O ácido málico proveniente das maçãs (2,60 g.L⁻¹) teve sua concentração drasticamente diminuída para 0,02 g.L⁻¹ em 10 dias de fermentação, segundo Herrero et al (1999) isso ocorre devido à reação de descarboxilação do ácido málico durante a fermentação alcoólica. A concentração de ácido L-lático dosado passou de 0,16, para 1,44 e 2,07 g.L⁻¹ no décimo e quadagésimo quinto dia de fermentação, respectivamente (Figura 36).

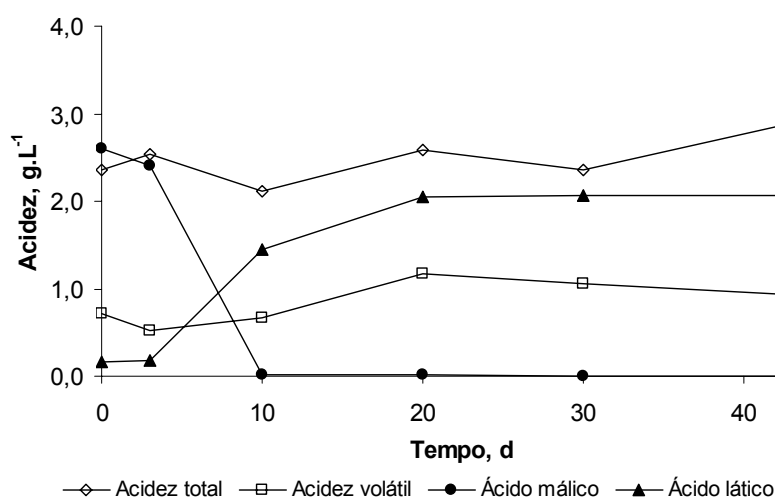


FIGURA 36. Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e láctico durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Durante a fermentação foram liberados 26,87 g.L⁻¹ de gás carbônico e a velocidade máxima da fermentação foi de 5,61 g.L⁻¹.d⁻¹ nas primeiras 24 horas do processo. Após 10 dias, o peso do fermentador permaneceu constante, indicando a capacidade fermentativa da *S. cerevisiae* inoculada (Figura 37).

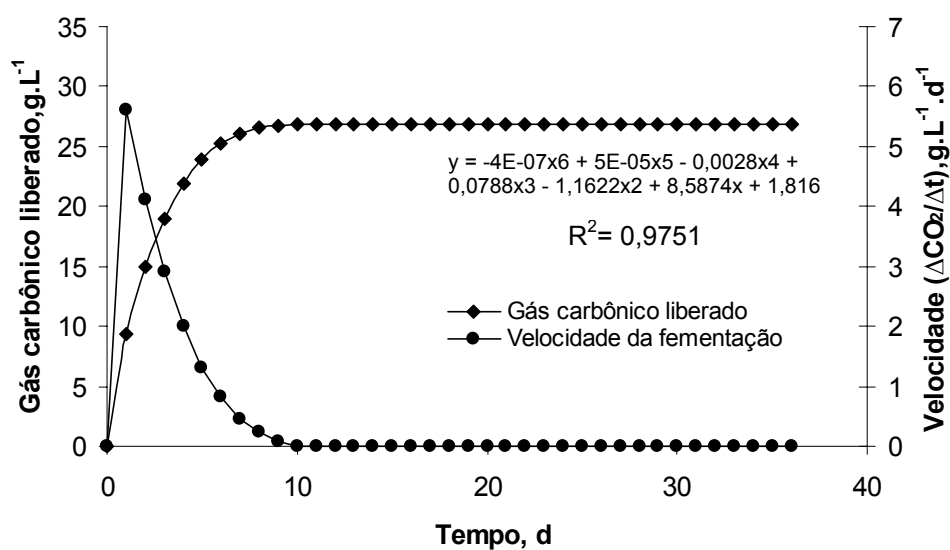


FIGURA 37. Cinética da fermentação com inóculo simultâneo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

5.9 Efeito do inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*

A fermentação com inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e de *O. oeni* foi realizada utilizando o mesmo mosto descrito no primeiro experimento do item 5.2 (Tabela 9). A temperatura do interior do fermentador foi monitorada e a média observada foi de $27,29 \pm 3,41$ °C.

TABELA 9. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Análises, g.L ⁻¹	Período de fermentação (dias)				
	0	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	111,83±0,04	1,35±0,00	0,77±0,00	0,34±0,00	0,32±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	80,75±0,20	1,24±0,00	0,74±0,00	0,10±0,00	0,08±0,00
Frutose, g.L ⁻¹	64,61±0,19	1,24±0,00	0,73±0,00	0,09±0,00	0,07±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	31,08±0,16	0,11±0,00	0,03±0,00	0,24±0,00	0,24±0,00
Glucose, g.L ⁻¹	16,15±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	5,60	5,75	6,10	5,75
pH	4,03	4,20	4,10	4,10	4,00
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,72±0,00	0,79±0,01	1,21±0,00	1,07±0,00	1,07±0,01
Acidez total, g.L ⁻¹	2,35±0,01	1,93±0,00	2,28±0,00	2,66±0,00	2,84±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	130±0,00	150±0,00	80±0,00	110±0,00	120±0,00
Ácido málico, g.L ⁻¹	2,60	0,066	0,06	0,01	0,0066
Ácido L-lático, g.L ⁻¹	0,16	1,07	1,74	1,75	1,76
Ácido D-lático, g.L ⁻¹	***	***	--	--	***

Nota: (--) Não analisada; (***) Traços.

A *Saccharomyces cerevisiae* inoculada em uma população correspondente a $6,02 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹, apresentou após o décimo dia de fermentação a população de $1,16 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹. Com o término dos açúcares fermentescíveis, iniciou a fase de perda de viabilidade e no vigésimo dia a população observada foi de $1,00 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹, a qual permaneceu estável até o quadragésimo quinto dia de fermentação.

Foram fermentados 98,79% dos açúcares redutores totais para a produção de 5,6% de etanol (v/v) em 10 dias de fermentação (Figura 38).

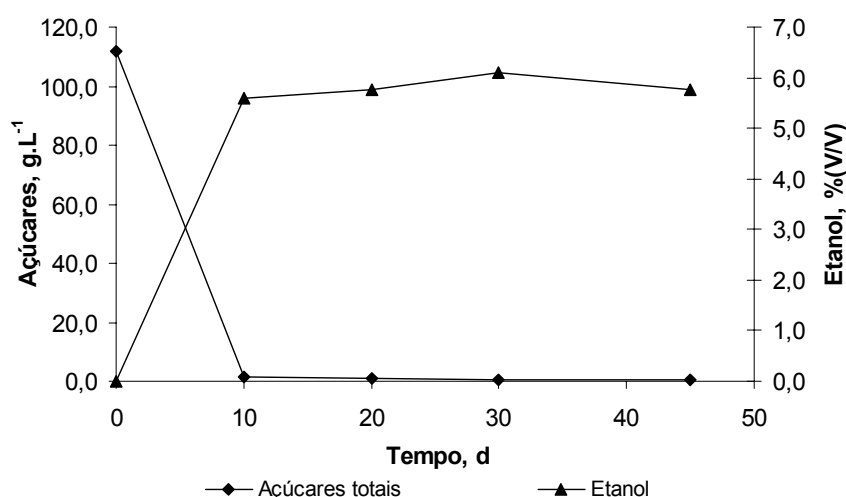


FIGURA 38. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

As leveduras apiculadas presentes no suco inicialmente em uma população de $2,00 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹, passaram para $1,00 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹ no décimo dia e $5,50 \times 10^3$ ufc.mL⁻¹ no quadragésimo quinto dia de fermentação (Figura 39).

As bactérias láticas, que estavam presentes inicialmente no suco em uma população de $1,14 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹, passaram para $7,24 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹ após 10 dias de fermentação. No décimo segundo dia de fermentação foi feito o inóculo de uma população correspondente a $1,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ de *Oenococcus oeni*. Essa população diminuiu para $2,52 \times 10^5$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias e permaneceu estável até o término do experimento (45 dias), demonstrado na Figura 39.

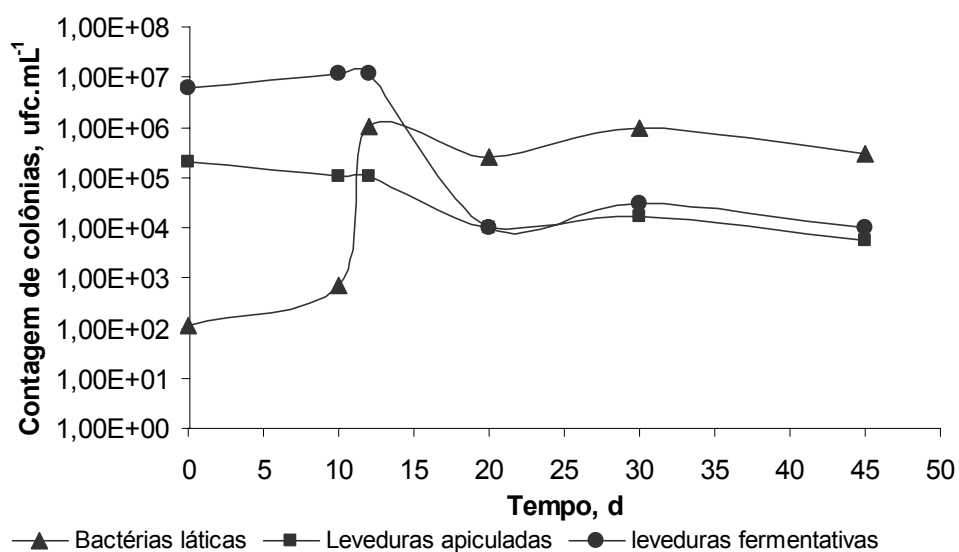


FIGURA 39. Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação com inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

A concentração de ácido málico no mosto de maçã Gala diminuiu de 2,60 para 0,006 g.L⁻¹, enquanto que a concentração de ácido L-lático passou de 0,16 para 1,75 g.L⁻¹ durante o tempo do experimento (45 dias). A acidez total aumentou de 1,93 g.L⁻¹ no décimo dia para 2,84 g.L⁻¹ no quadragésimo quinto dia de fermentação (Figura 40).

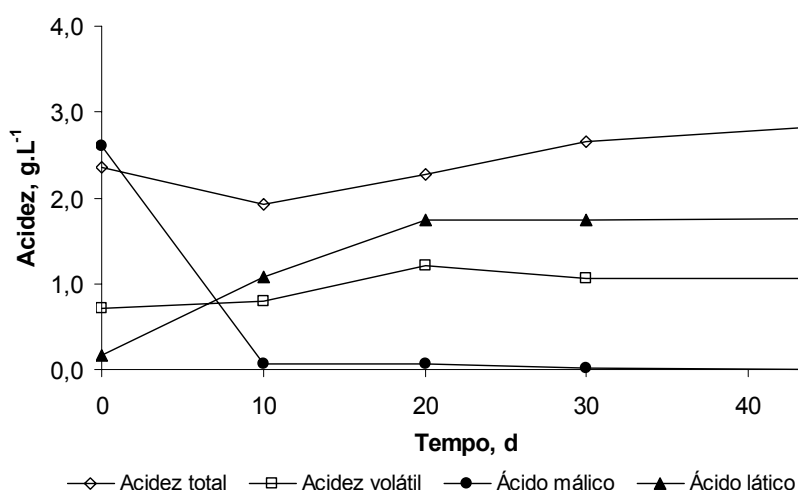


FIGURA 40. Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e láctico durante a fermentação com inóculo seqüencial de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

O inóculo de *O. oeni* no início do processo fermentativo diminuiu rapidamente, permanecendo apenas algumas células viáveis. Após o término dos açúcares fermentescíveis e da perda da viabilidade das células leveduriformes, o crescimento das bactérias foi rápido. Estas bactérias tornaram-se mais adaptadas ao meio do que as bactérias inoculadas após o 12º dia de fermentação, apresentando populações maiores (Figura 41). Sendo assim, um inóculo inicial de *O. oeni* pode tornar o processo de fermentação malolática mais eficiente.

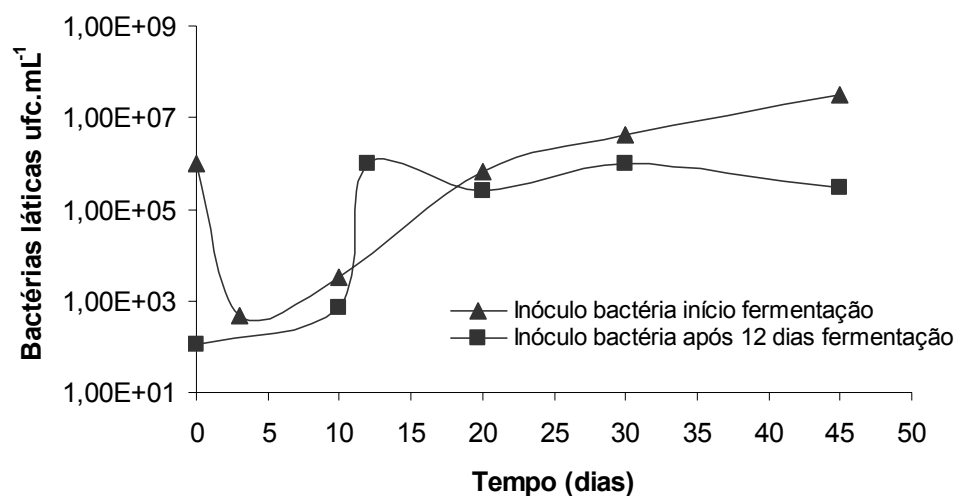


FIGURA 41. Curva de crescimento de *O. Oeni* com inóculo simultâneo e seqüencial.

5.10 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* em suco pasteurizado

A fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e de *O. Oeni* foi realizada com o mosto utilizado no experimento descrito no item 5.2 (Tabela 10). O mosto foi pasteurizado e distribuído em microfermentadores para que a fermentação ocorresse. Durante a fermentação, a temperatura média do interior do fermentador foi de $27,29 \pm 3,41$ °C.

TABELA 10. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Análises	Período de fermentação (dias)				
	0	3	10	20	35
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	111,83±0,04	48,55±0,02	1,27±0,00	0,58±0,00	0,57±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	80,75±0,20	26,18±0,19	0,61±0,00	0,11±0,00	0,43±0,00
Frutose, g.L ⁻¹	64,61±0,19	18,54±0,21	0,59±0,00	0,09±0,00	0,42±0,00
Sacarose, g.L ⁻¹	31,08±0,16	22,37±0,21	0,66±0,00	0,47±0,00	0,14±0,00
Glucose, g.L ⁻¹	16,15±0,01	7,65±0,02	0,01±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	3,40	5,60	6,10	5,50
pH	4,03	3,89	4,22	4,12	4,13
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,72±0,00	0,46±0,00	0,87±0,00	1,05±0,00	1,01±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,35±0,01	2,52±0,00	1,69±0,00	2,22±0,00	2,16±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	150±0,00	60±0,00	60±0,00	110±0,00	110±0,00

A *Saccharomyces cerevisiae* inoculada ($6,02 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹) cresceu nos 10 primeiros dias de fermentação. Com a diminuição dos açúcares fermentescíveis iniciaram a fase de perda de viabilidade celular. A população observada em 45 dias de fermentação foi de $3,00 \times 10^2$ ufc.mL⁻¹.

A *Saccharomyces cerevisiae* em 10 dias de fermentação utilizou 98,86% dos açúcares redutores totais para produção de 5,60% de etanol (v/v) (Figura 42).

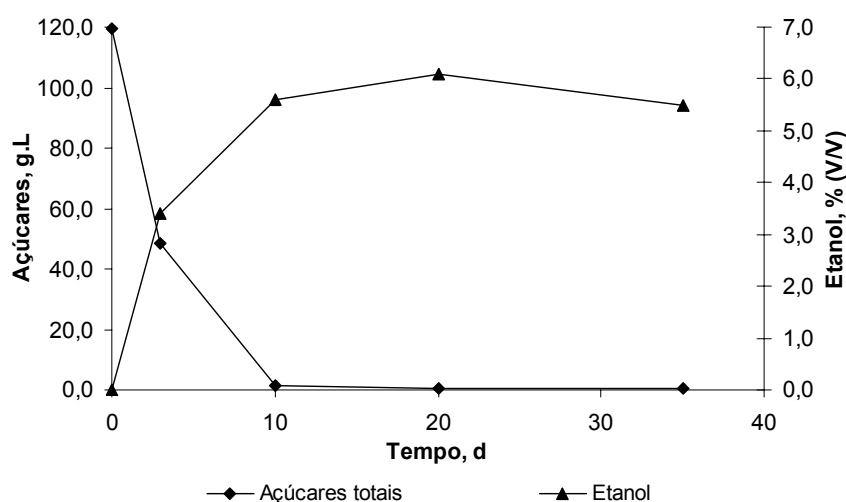


FIGURA 42. Consumo dos açúcares redutores totais e produção de etanol durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

A *Oenococcus oeni* inoculada no suco em uma população de $1,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ diminuiu para $2,80 \times 10^4$ ufc.mL⁻¹ em 10 dias de fermentação, devido à competição com as leveduras que, nesta etapa, dominam o meio rapidamente. Com a perda de viabilidade e autólise das células, as bactérias lácticas encontraram um meio favorável para iniciar o crescimento. Neste crescimento, a população máxima de bactérias lácticas foi $4,50 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 35 dias de fermentação (Figura 43).

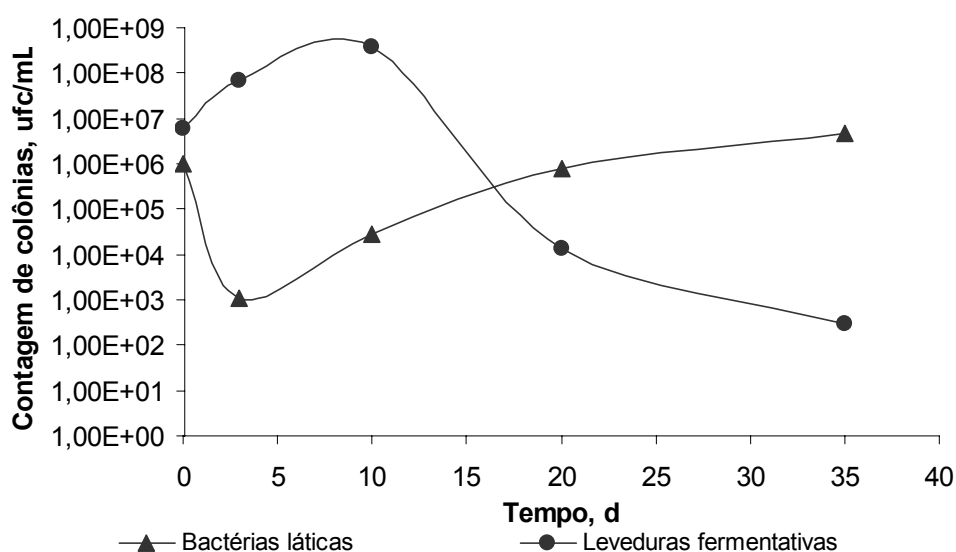


FIGURA 43. Desenvolvimento dos microrganismos durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Durante a fermentação foram liberados $26,60 \text{ g.L}^{-1}$ de gás carbônico com a velocidade máxima de fermentação de $5,94 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em 2 dias de processo. Após 24 dias o peso do fermentador permaneceu constante, indicando o término dos açúcares fermentescíveis (Figura 44).

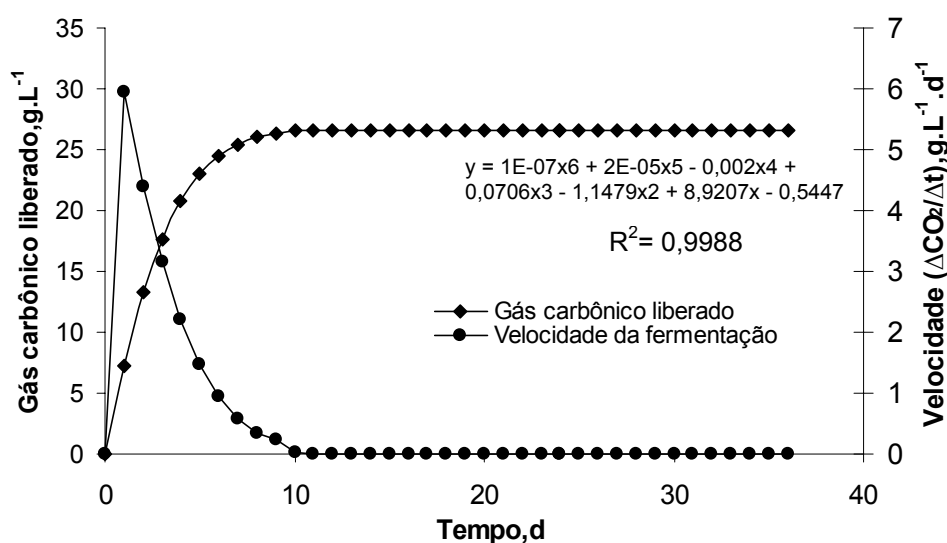


FIGURA 44. Cinética da fermentação em função da perda de peso dos fermentadores decorrente da liberação de gás carbônico durante a fermentação do mosto de maçã pasteurizado e com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

5.11 Efeito do inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* com redução de biomassa

A fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* com redução de biomassa foi realizada com o mesmo mosto descrito no item 5.4 e nas Tabelas 11 e 12 (ponto zero). A temperatura média durante o experimento foi de 24,24±2,3 °C.

TABELA 11. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*, com redução de biomassa.

Análises	Período de fermentação (dias)				
	0	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	114,83±0,76	19,71±0,10	1,73±0,01	1,18±0,01	1,16±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	88,83±0,08	19,33±0,02	1,63±0,00	1,09±0,00	0,86±0,01
Frutose, g.L ⁻¹	66,25±0,08	18,51±0,02	1,61±0,00	1,08±0,00	0,85±0,01
Sacarose, g.L ⁻¹	26±0,69	0,39±0,12	0,10±0,00	0,09±0,00	0,3±0,01
Glucose, g.L ⁻¹	22,58±0,01	0,82±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	5,28	6,28	6,31	6,32
pH	3,88	4,01	--	4,06	4,05
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,71±0,00	0,55±0,00	0,57±0,00	0,57±0,00	0,61±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,19±0,00	1,92±0,01	1,79±0,00	2,03±0,00	2,28±0,00
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	200±0,00	--	110±0,00	80±0,00	80±0,00

Nota: (--) Não analisada.

As leveduras fermentativas inoculadas inicialmente em uma população de $5,20 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ diminuíram para $2,07 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ após a centrifugação em 12 horas de fermentação, demonstrando desta forma, que o objetivo de reduzir a população para valores próximos ao inóculo foi alcançado.

TABELA 12. Parâmetros físico-químicos durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Análises	Período de fermentação (dias)					
	0	3	10	20	30	45
Açúcar redutor total, g.L ⁻¹	114,83±0,76	28,55±0,09	2,88±0,01	1,19±0,01	1,12±0,01	1,03±0,00
Açúcar redutor, g.L ⁻¹	88,83±0,08	28,54±0,17	2,70±0,04	1,10±0,00	1,10±0,00	0,46±0,03
Frutose, g.L ⁻¹	66,25±0,08	25,06±0,17	2,69±0,04	1,08±0,00	1,06±0,00	0,45±0,03
Sacarose, g.L ⁻¹	26±0,69	0,01±0,10	0,18±0,04	0,09±0,01	0,02±0,01	0,57±0,04
Glucose, g.L ⁻¹	22,58±0,01	3,49±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00
Etanol, °GL	0,00	4,79	6,22	6,31	6,32	6,32
pH	3,88	3,87	4,09	--	4,19	4,19
Acidez volátil, g.L ⁻¹	0,71±0,00	0,55±0,00	0,52±0,00	0,61±0,00	0,59±0,00	0,74±0,00
Acidez total, g.L ⁻¹	2,14±0,00	2,61±0,00	1,66±0,00	1,77±0,00	1,99±0,00	1,72±0,00±0,
Nitrogênio, mg.L ⁻¹	200±0,00	130±0,00	--	140±0,00	150±0,00	80±0,00

Nota: (--) Não analisada.

Na fermentação com redução de biomassa a população de leveduras fermentativas aumentou para $3,14 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 10 dias de fermentação e permaneceu estável até 30 dias devido à presença de açúcares residuais. Durante a fermentação controle, sem redução de biomassa, as leveduras demonstraram perda de viabilidade celular depois de 3 dias de fermentação (Figura 45).

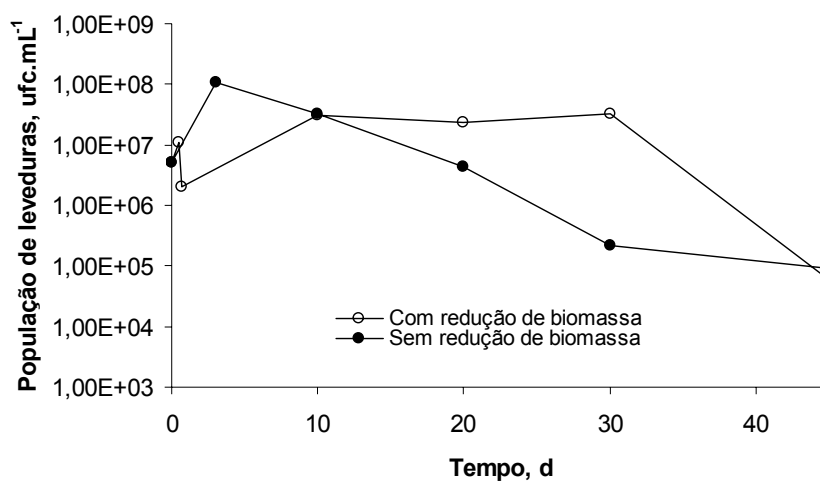


FIGURA 45. Efeito da redução de biomassa no crescimento das leveduras fermentativas.

Durante a fermentação com redução de biomassa as leveduras fermentaram 82,84 e 98,48% dos açúcares redutores totais e redutores para produção de 5,28 e 6,28% de etanol (v/v) em 10 e 20 dias de fermentação, respectivamente. As leveduras da fermentação controle utilizaram 97,49% dos açúcares redutores totais para produção de 6,22% de etanol (v/v) em 10 dias de fermentação (Figura 46).

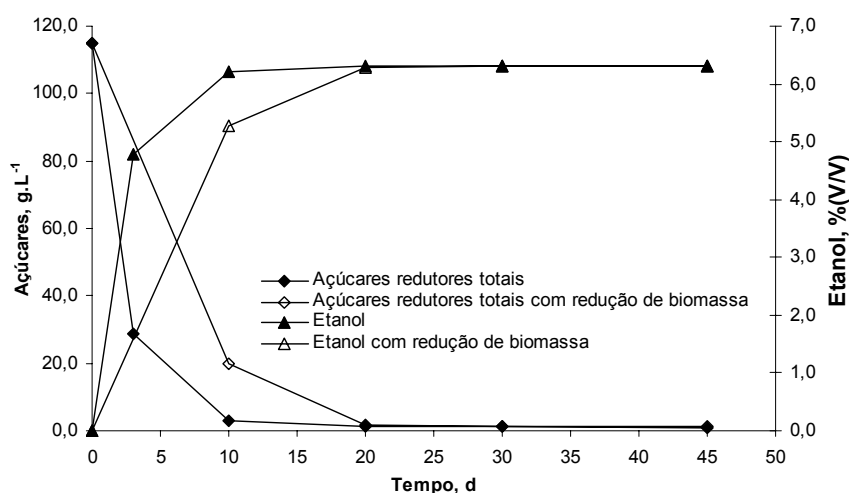


FIGURA 46. Consumo dos açúcares reductores totais e produção de etanol durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*, com redução de biomassa.

A *O. oeni* inoculada passou de $6,56 \times 10^6$ para $3,36 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ após a redução de biomassa. No entanto, com o crescimento lento das leveduras fermentativas e menor liberação de compostos inibitórios, as bactérias aumentaram sua população para $5,79 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias e $6,62 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 45 dias de fermentação (Figura 47).

Durante a fermentação controle, sem redução de biomassa, a população de bactérias inoculadas passou de $6,56 \times 10^6$ para $4,80 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹ em 10 e $2,23 \times 10^7$ ufc.mL⁻¹ em 20 dias de fermentação. No final do experimento a população observada foi de $6,00 \times 10^6$ ufc.mL⁻¹.

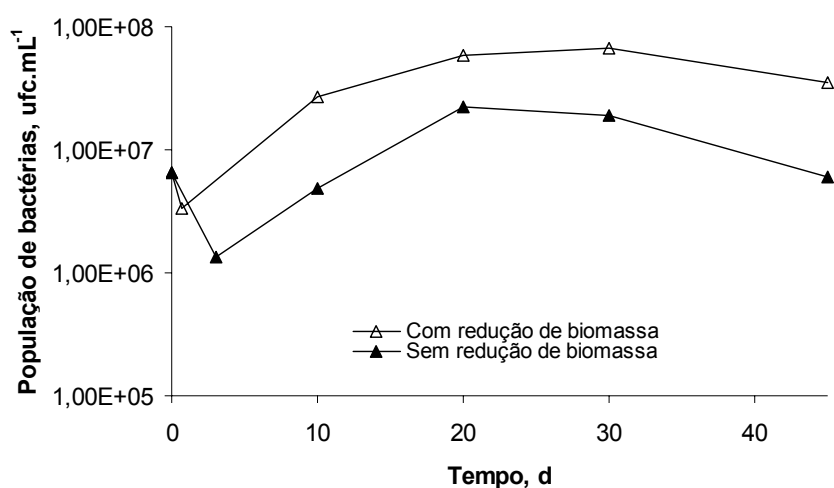


FIGURA 47. Efeito da redução de biomassa no crescimento das bactérias láticas.

A acidez total diminuiu durante o crescimento das leveduras fermentativas na fermentação com redução de biomassa, posteriormente passou de 1,79 g.L⁻¹ no vigésimo dia para 2,28 g.L⁻¹ no quadragésimo quinto dia de fermentação. Na fermentação controle, nesse mesmo período, a acidez total passou de 2,14 g.L⁻¹ para 1,72 g.L⁻¹ (Figura 48). A evolução da acidez volátil durante as fermentações com e sem redução de biomassa foi semelhante.

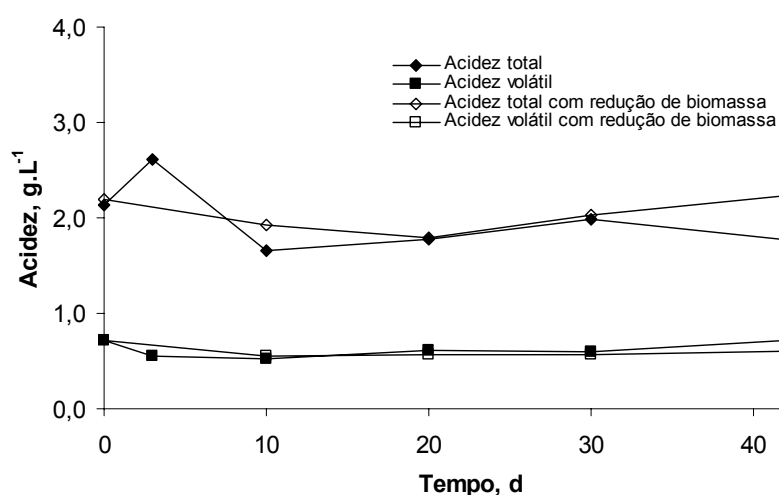


FIGURA 48. Evolução da acidez total e volátil e dos teores de ácidos málico e láctico durante a fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*, com redução de biomassa.

Durante a fermentação controle (sem redução de biomassa) foram liberados 29,14 g.L⁻¹ de gás carbônico e a velocidade máxima da fermentação foi de 6,56 g.L⁻¹.d⁻¹ nas primeiras 24 horas de processo. Após o décimo terceiro dia, o peso do fermentador permaneceu constante indicando o término dos açúcares fermentescíveis (Figura 49).

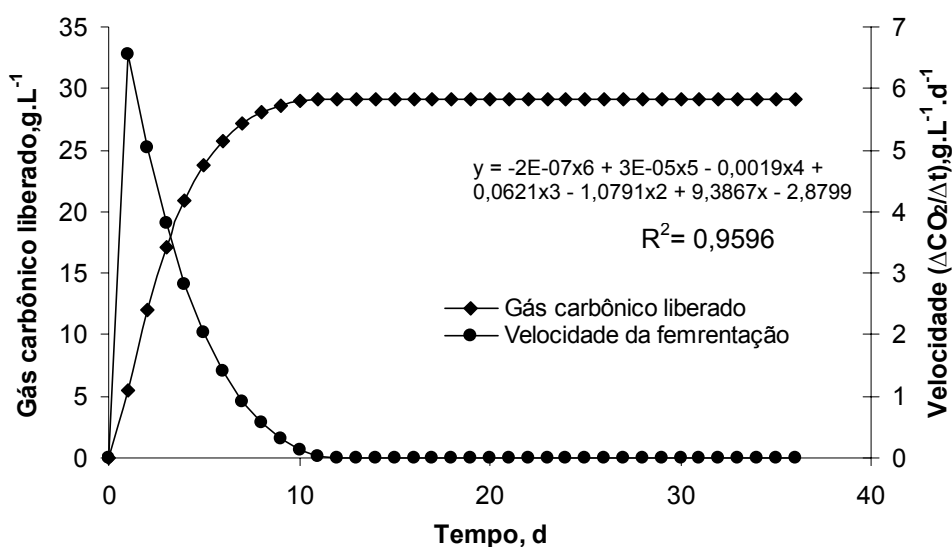


FIGURA 49. Cinética da fermentação com inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni*.

Na fermentação com redução de biomassa foram liberados 22,42 g.L⁻¹ de gás carbônico e a velocidade máxima da fermentação foi de 2,94 g.L⁻¹.d⁻¹ nas primeiras 48 horas do processo. Após o décimo oitvo dia, o peso do fermentador permaneceu constante (Figura 50). Menor velocidade de fermentação foi observada em comparação à fermentação controle, o que demonstra que a redução de biomassa proporciona uma fermentação mais lenta.

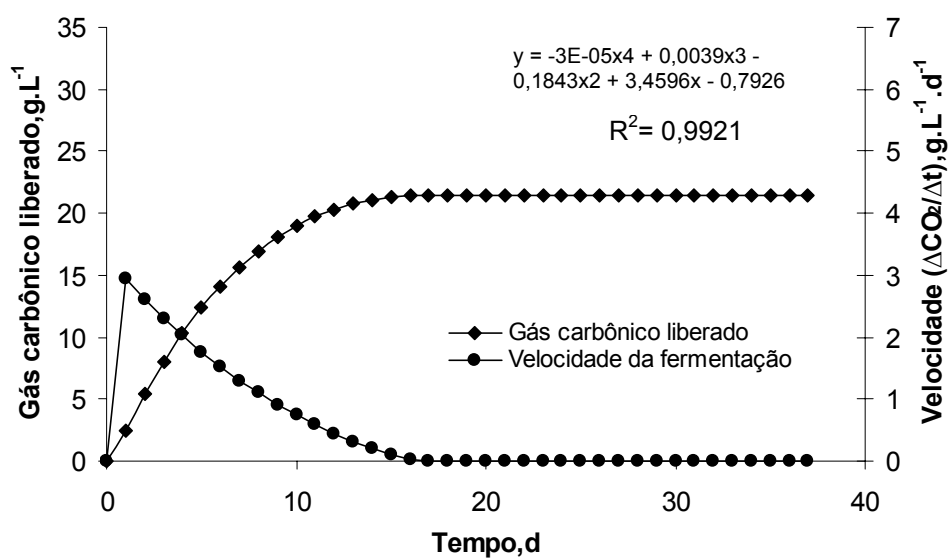


FIGURA 50. Cinética da fermentação com inóculo de *S. cerevisiae*, *O. oeni* e redução de biomassa.

6. CONCLUSÕES

Entre os três microrganismos de interesse no processamento de fermentados de maçã e de sidra, a população natural de leveduras apiculadas presentes nas maçãs e conseqüentemente nos mostos, foi superior.

As leveduras apiculadas naturais do mosto de maçã cresceram mais rapidamente no início da fermentação, apresentando crescimento durante a fase de desenvolvimento das *Saccharomyces*, sendo supridas após o terceiro dia de fermentação. Durante o crescimento das leveduras na fermentação alcoólica, as bactérias láticas tiveram seu crescimento inibido. Posteriormente durante a perda de viabilidade das leveduras, as bactérias foram estimuladas ao desenvolvimento.

Comportamento semelhante do crescimento das leveduras apiculadas, fermentativas e bactéria lática durante a fermentação natural foi observado pelos microrganismos durante a fermentação com inóculo de *Saccharomyces cerevisiae*.

Nas fermentações com inóculo de levedura e redução de biomassa, a operação diminuiu a velocidade de fermentação, resultando em populações de leveduras fermentativas menores no início do experimento e maiores no término, quando comparado à fermentação controle. As bactérias láticas naturais apresentaram populações maiores que o controle ao final do experimento.

A *Oenococcus oeni* apresentou crescimento no suco de maçã, demonstrando capacidade fermentativa. Quando inoculada em mosto com adição de sulfito, apresentou crescimento em todas as concentrações de sulfito (50 a 150 g.L⁻¹), mostrando-se resistente.

As bactérias inoculadas com as leveduras apresentaram uma rápida mortalidade, porém voltaram a crescer após o décimo dia de fermentação, momento em que houve diminuição da população de leveduras e término dos açúcares

fermentecíveis. Nesse novo crescimento, a população foi superior à fermentação inoculada por *O. oeni* após 10 dias de fermentação, indicando uma melhor condição para o crescimento das bactérias láticas. O mesmo comportamento foi observado na fermentação com o inóculo de *S. cerevisiae* e *O. oeni* no mosto pasteurizado.

Nas fermentações com inóculo de *S. cerevisiae*, *O. oeni* e redução de biomassa, houve uma diminuição velocidade, resultando em populações menores durante o experimento, quando comparado à fermentação controle. As bactérias láticas inoculadas apresentaram populações maiores durante todo o período de fermentação, quando comparadas ao controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, H.; HEINTZ, D.; CHASSAGNE, D.; GUILLOUX-BENATIER, M.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 235-240, 2001.

ALMEIDA, G. V. B.; ALVES, A. A. **Mercado de maçã: situação atual, ameaças, oportunidades e estratégias para o futuro.** Disponível em: <http://Www.Todafruta.Com.Br/Todafruta/Mostra_Conteudo.Asp?Conteudo=12448> Acesso em: 26/05/2006.

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.

BEELMAN, R. B., GALLANDER, J. F. Wine deacidification. **Adv. Food Res**, v. 25, p. 1-53, 1979.

BEELMAN, R. B.; KEEN, R. M. Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 23, p. 107-121, 1982.

BELIN, J. M. Las Leveduras. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editotial Acirbia, 1995. cap. 2, p. 19-33.

BELTRAN, G.; ROZÈS, N.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p. 809-815, 2007.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 70, p. 246-252, 1990.

BRASIL. Normas gerais sobre registro, padronização, classificação e, ainda, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Decreto 3.510 de 2000. Diário Oficial da União, 2000.

BRITZ, T. J.; TRACEY, R. P. The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 1990, p. 23-31.

CABRANES, C.; BLANCOB, D.; MANGASA, J. J. Characterisation of fermented apple products using data obtained from GC analysis. **Analyst**, v. 123, p. 2175–2179, 1998.

CARR J. G.; POLLARD A.; WHITING, G. C.; WILLIAMS, A. H. The reduction of quinic acid to dihydroshikimic acid by certain lactic acid bacteria. **Research Station Long Ashton**, v. 66, p. 283-285, 1956.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of process parameters on the production and drying of *Leuconostoc mesenteroides* cultures. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 28, p. 291–296, 2002.

CIANI, M.; FATICHENTI, F. Seletive sugar consumption by apiculates yeast. **The Society for Applied Microbiology**, v. 28, p. 203-206, 1998.

COTON, E.; COTON, M.; LEVERT, D.; CASAREGOLA, S.; SOHIER, D. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 130-135, 2006.

D'AMATO, D.; CORBO, M. R.; DEL NOBILE, M. A.; SINIGAGLIA, M. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1152-1157, 2006.

DRILLEAU, J. F. La Sidra. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editotial Acribia, 1995. cap. 4. p. 113-123.

EPAGRI. **A cultura da macieira**. Florianópolis: GMC/EPAGRI, 2002. 743p.

FAIA, A. M. **A importância das bal no vinho**. Jornadas universitárias viticultura e enologia. Associação das universidades da região norte. Universidade do Minho. 4 a 6 de fevereiro de 1999.

GARBAY, S.; ROZES, N.; LONVAUD-FUNEL, A. Fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*, incidence of growth conditions and relationship with malolactic efficiency. **Food Microbiology**, v.12, p. 387-395, 1995.

GUILLOUX-BENATIER, M. *et al.* Effects of yeast proteolytic activity on *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation, **Federation of European Microbiological Societies**, v. 263, p. 183-188, 2006.

HENICK-KLING, T., SANDINE, W.E., HEATHERBELL, D. A. Evaluation of malolactic bacteria isolated from Oregon wines, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 2010–2016, 1989.

HENICK-KLING, T.; PARK, Y. H. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, p. 464-469, 1994,

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

HERRERO, M.; GARCIA, L. A.; DÍAZ, M. Malolactic bioconversion using a *Oenococcus oeni* strain for cider production: effect of yeast extract supplementation. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 30, p. 699–704, 2003.

HUSNIK, J.I.; VOLSCHENK, H.; BAUER, J.; COLAVIZZA, D.; LUO, Z.; VAN VUUREN, H.J. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. **Metabolic Engineering**, v. 8, p. 315-323, 2006.

IBGE. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos e químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976.

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

LAPLACE, J. M.; JACQUET, A.; TRAVERS, I.; SIMON, J. P.; AUFFRAY, Y. Incidence of land and physicochemical composition of apples on the qualitative and quantitative development of microbial flora during cider fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, London. v. 107, n. 4, p. 227-233, 2001.

LARPENT, J. P. Lãs bactérias lácticas. In: BOUGEOIS, C. M.; LARPENT, J. P. **Microbiologia alimentaria**. Zaragoza: Editotial Acribia, 1995, cap. 1. p. 3-17.

LE QUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, J. F. Microbiologie et technologie du cidre. **Rev. Enologues**, n. 88, p. 17-20, 1998.

LIU, J. R.; GALLANDER, J. F. Effect of pH and sulfur dioxide on the rate of malolactic fermentation in red table wines . **Am. J. Enol. Vitic**, v. 34, n. 1, p. 44-46, 1983.

LIU, S. Q.; DAVIS, C. R.; BROOKS, J. D. Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. **Am J Enol Vitic**, v. 46, p. 166–174, 1995.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 35, p. 49–61, 2000.

LIU, S. Q. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 589-596, abril 2002.

LONVAUD-FUNEL. A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 317-331, 1999.

LURTON, L.; SEGAIN, J. P.; FEUILLAT, M. Étude de la proteolyse au cours de l'autolyse de levures en milieu acide, **Scienza Alimentaria**, v. 9, p. 111–124, 1989.

MAICAS, S.; GIL, J. V.; PARDO, I.; FERRER, S. Improvement of volatile composition of wines by controlled addition of malolactic bacteria. **Food Research International**, v. 32, p. 491-496, 1999.

MARTINEZ, J., MILLAN, C., ORTEGA, J.M. Growth of natural flora during the fermentation of inoculated musts from “Pedro Ximenez” grape. **S. Afr. J. Enol. Vitic.**, v. 10, p. 31-35, 1989.

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

MICHEL, A.; BIZEAU, C. Flore levurienne presente dans les cidreries de l'ouest de la France. **Sciences des Aliments**, v. 8, n. 3, 1988, p. 359-368.

NELSON, N. A fotometric adaptaion of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Biol.Chen.** , v. 153, p. 375-80, 1944.

NIELSEN, J. G.; RICHELIEU, M. Diacetile e le carattersitiche organolettiche del vino. **Appl. Environ. Microbiol**, n. 65, p. 740-745, 1999.

NOGUEIRA, A. **Tecnologia de processamento sidrícola. Efeitos do oxigênio e do nitrogênio na fermentação lenta da sidra**. 2003. 201 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) – Setor de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

NOGUEIRA, A.; PRESTES, R. A. ; SIMÕES D. R. S.; DRILLEAU, J. F.; WOSIACKI, G. Análise dos indicadores físico-químicos de qualidade da sidra brasileira. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 24, n. 2, p. 289-298, jul./dez. 2003.

NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Sidra. In: VENTURINI, W. G. **Tecnología de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 16, p. 383-422.

NOGUEIRA, A.; SWIECH, B. P.; DENARDI, F.; WOSIACKI, G. características físico-químicas e sensoriais de suco de maçã clarificado e fermentado. **Publ. UEPG**, v. 13, p. 1523, dez. 2006.

NOGUEIRA, A.; ALBERTI, A.; DANTAS, A. P. C.; MONGRUEL, C. N.; WOSIACKI, G. Influência da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* na cinética de fermentação do vinho de maçã. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, p. 30-36, 2007.

OLIVEIRA, M.C.S.; SILVA, N.C.C.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Avaliação do método de liquefação enzimática na extração de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 906-915, out.-dez. 2006.

OSBORNE, J. P.; EDWARDS, C. G. Inhibition of malolatic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* during the alcoholic fermentation under low and hight conditions: a study in synthetic media. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 12, p. 69-78, 2006.

OSBORNE, J. P.; EDWARDS, C. G. Inhibition of malolatic fermentation by a peptide produced by *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 27-34, 2007.

OSCARÍZ, J. C. O.; PISABARRO, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 4, p. 13-19, 2001.

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). **Ciênc. Agrotec., Lavras**, v. 28, n. 6, p. 1336-1343, nov./dez. 2004.

PATYNOWSKI, R. J.; JIRANEK, V.; MARKIDES, A. J. Yeast viability during fermentation and sur lie ageing of a defined medium and subsequent growth of *Oenococcus oeni*. **Australian journal of grape and wine research**, v. 8, p. 62-69, 2002.

PINA, C.; SANTOS, C.; COUTO, J. A.; HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - influence of different culture conditions. **Food Microbiology**, v. 21, p. 439-447, 2004.

POZO-BAYÓN, M. A.; ALEGRÍA, E. G.; POLO, M. C.; TENORIO, C.; MATÍN-ÁLVAREZ, P. J.; CALVO DE LA BANDA, M. T. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* Starter Cultures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8729-8735, 2005.

REDZEPOVIC, S.; ORLIC, S.; MAJDAK, A.; KOZINA, B.; VOLSCHENK, H.; VILJOEN-BLOOM, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 49-61, 2003.

REMIZE, F.; GAUDIN, A.; KONG, Y.; GUZZO, J.; ALEXANDRE, H.; KRIEGER, S.; GUILLOUX-BENATIER, M. *Oenococcus oeni* preference for peptides: qualitative and quantitative analysis of nitrogen assimilation. **Archives of Microbiology**, v. 185, p. 459-469, 2006.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Acidez na vinificação em tinto das uvas isabel, cabernet sauvignon e cabernet franc. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 511-515, maio/jun. 2002.

ROBIN, P.; DE LA TORRE, M. **Le cidre, la pomme, le calvados**. Paris: Editions du Papyrus, 1988. p.192.

SAGUIR, F. M.; MANCA DE NADRA, M. C. Effect of L-malic and citric acids metabolism on the essential amino acid Requirements for *Oenococcus oeni* growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 295-301, 2002.

SALIH, A. G.; DRILLEAU, J. F.; DIVIES, C.; LENZI, P. Facteurs contribuant au contrôle de la transformation malolactique dans les cidres. **Sci. Aliments**, Paris, v. 7, n. 2, p. 205-221, 1987.

SALIH, A. G. *et al.* A survey of microbiological aspect of cider-making. **J. Inst. Brew.**, London, v. 94, p. 5-8, 1988.

SALMON, J. M.; BARRE, P. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3831-3837, 1998.

SAUVAGEOT, F.; VIVIER, P. Effects of malolactic fermentation on sensory properties of four Burgundy wines. **Am. J. Enol. Vitic**, v. 48, p. 187-192, 1997.

SOMOGY, M. A. New Reagent for Determination of Sugars. **A new Sugar Reagent**, p. 61 - 68, mai. 1945.

TANNER, H.; BRUNNER, H. R. **Getränke analytik**: untersuchungsmethode für die Labor und Betriebspraxis. Wädenswil: Verlag Helles, 1985. p. 206.

VERSARI, A.; PARPINELLO, G. P.; CATTANEO, M. *Leuconostoc oenos* and malolactic fermentation in wine: a review. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 447-455, 1999.

WOSIACKI, G.; KAMIKOGA, A. T. M.; SATAQUE, E. Y.; CÉSAR, E. O. Características de qualidade de sucos despectinizados de maçãs: safra 1988/89. **Semina**, Londrina, v. 13, n. 1, p. 7-14, 1992.

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

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA, A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 24, n. 3, Campinas, July/Sept. 2004.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: VENTURINI, W. G. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado**. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 12, p. 255-291.

YERAMIAN, N.; VARELA, F.; CALDERÓN, F.; COLOMO, B.; MORATA, A.; SUÁREZ LEPE, J. A.; SANCHO, E. D. **Acidificación del mosto por *Saccharomyces* spp.** Microbiología. VI Jornadas Científicas 2001. Grupos de Investigación Enológica. Valencia, 5-7 de junio del 2001.