



**Universidade de
Aveiro**

2016/2017

Departamento de Química

**JOÃO FILIPE GOMES
DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DA PRODUÇÃO DE SIDRA A
PARTIR DO CONCENTRADO DE SUMO DE MAÇÃ E
RETENTATO**



**JOÃO FILIPE GOMES
DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO DA PRODUÇÃO DE SIDRA A
PARTIR DO CONCENTRADO DE SUMO DE MAÇÃ E
RETENTATO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica do Doutor Manuel António Coimbra, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Elisabete Coelho, bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

“Not all those who wander are lost”

J.R.R. Tolkien

Dedico este trabalho à minha avó Beatriz e ao meu avô João.

O Júri

Presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva

Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof^a. Doutora Dulcineia Maria de Sousa Ferreira Wessel

Professora Adjunta da Escola Agrária do Instituto Politécnico de Viseu (arguente)

Doutora Elisabete Verde Martins Coelho

Bolseira de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Agradecimentos

A todos os que tornaram esta jornada mais fácil, o meu obrigado. A todos os que nem sempre lhes foi possível tornarem o meu caminho mais fácil, obrigado por me tornarem mais apto para o futuro.

Gostaria de começar por agradecer aos meus orientadores Professor Doutor Manuel António Coimbra e Doutora Elisabete Coelho pelo apoio, pelos conhecimentos transmitidos e pela paciência ao longo destes últimos 3 anos. Obrigado por acreditarem em mim. Um obrigado muito especial à Rita, por me acolher quando tudo parecia perdido e confuso. Agradecer ao Eng. Nicolas Billard por acreditar na realização deste projeto e pelos ensinamentos prestados ao longo deste ano, tanto a nível pessoal como profissional. Assim como aos meus colegas “vadios” por me fazerem ver que o trabalho também pode ser uma casa.

Quero agradecer também àqueles que foram os pilares desta jornada, desde o primeiro dia em que entrei na Universidade de Aveiro até ao último. À Inês Ribau pela amizade que nasceu desde o primeiro dia em que me mudei para o Departamento de Química. Obrigado por me fazeres ver que a grandeza de alguém está nos pequenos atos do dia-a-dia. À Sónia por entrar na minha vida sem que eu tenha dado por isso e por nunca ter partido. Obrigado por me fazeres ver que sem perseverança não se consegue alcançar os nossos objetivos. Ao Ricardo e à Mécia, os meus “pais de Aveiro”. Palavras são poucas para expressar a gratidão por tudo o que fizeram por mim ao longo destes últimos anos. A jornada não teria sido a mesma sem vocês. À Catarina Sousa por esta amizade de outro mundo. Por saberes o que sinto e penso, mesmo sem estares por perto. Por saberes sempre quando e o que preciso de ouvir. Obrigado por seres “peixes” comigo. À Carina Carvalho por me fazer olhar para a vida com os olhos de um artista. Por me fazer ver a beleza que há para além do vulgar. Ao Henrique e ao Pedro, os meus companheiros e amigos desde o primeiro dia em que me mudei para Aveiro. Obrigado por provarem que mesmo longe a amizade é possível e verdadeira. À Filipa, Maroca e Kevin, os meus veteranos. Cada um em diferentes partes do mundo, mas sempre tão presentes. Ao João Ramos e André Flores, os meus irmãos. Os anos passam, mas a amizade mantém-se. As experiências vividas são o melhor retrato da nossa amizade. À Margarida, porque onde quer que eu esteja, ela está sempre presente.

Por fim, agradecer a quem faz de mim o que sou hoje. Quem me transmitiu os valores basilares pelos quais me rejo na vida. Quem está sempre presente com um apoio incondicional. São os primeiros a acreditar quando mais ninguém o faz. Porque sem eles o meu caminho teria sido diferente. Porque sem eles nunca teria chegado aqui. Obrigado ao meu pai, o meu ídolo e modelo de Homem. Obrigado à minha mãe, a mulher da minha vida. Obrigado à minha irmã, a minha princesa. Obrigado ao meu avô e à minha avó, os meus segundos pais.

Palavras-chave

Hidrólise de proteínas, meio nutritivo, subproduto da clarificação dos sumos, mosto de maçã, *scale-up* industrial

Resumo

A sidra é uma bebida obtida a partir da fermentação do sumo de maçã. Portugal não é um país com tradição no consumo de sidra, no entanto, há um claro padrão de crescimento, tanto em termos de volume, como em valor do consumo. Assim, a sidra apresenta-se com um forte potencial inexplorado, com um reduzido número de concorrentes, principalmente se utilizar como matéria-prima o concentrado de sumo de maçã, pelo que o lançamento de uma nova sidra poderá ser uma boa aposta no mercado das bebidas alcoólicas. O presente trabalho de estágio, realizado na microcervejeira Vadia, teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma sidra a partir da fermentação do concentrado de sumo de maçã. Como o concentrado de sumo de maçã tem carência em aminoácidos e minerais necessários ao metabolismo das leveduras durante a fermentação, foi posta a hipótese de se criar um meio nutritivo, rico e adequado ao crescimento da levedura através da incorporação do subproduto resultante da ultrafiltração dos sumos concentrados de maçã, designado por “retentato”. Para a formulação do meio nutritivo promoveu-se a hidrólise das proteínas do retentato através das enzimas proteolíticas presentes no malte de cevada. Testaram-se diferentes rácios de malte e retentato (1:1 e 1:10) de forma a colmatar a carência de aminoácidos. Definiu-se o rácio ideal de 1:10 do meio nutritivo e fez-se um *scale-up* industrial. Por fim, quantificaram-se os aminoácidos livres provenientes da hidrólise das proteínas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrofotometria de massa, de modo a avaliar a extensão da hidrólise enzimática em duas produções distintas. Na produção 1, o meio nutritivo contendo uma concentração total de aminoácidos de 1,627 g/L foi diluído para um volume final de 1000 L, e na produção 2, uma concentração de 1,559 g/L diluiu-se para um volume final de 2000 L. Os valores de aminoácidos obtidos no meio nutritivo encontram-se dentro dos valores considerados ideais para uma fermentação eficiente (0,500-2,000 g/L). Com o objetivo de otimizar os parâmetros de produção de sidra em função da apreciação sensorial, foi feita uma terceira produção de 2000 L. Durante cada produção monitorizou-se o perfil fermentativo, tendo-se obtido o produto final ao fim de 10 dias nas 3 produções. Para avaliar a recetividade do consumidor à sidra foram realizadas três análises sensoriais, uma após cada produção. Ao nível do sabor doce e acidez, obteve-se uma avaliação 4 em 5, nas 3 produções. No entanto, o aroma a maçã obteve uma avaliação 2 em 5 na produção 2, em comparação com os 3 valores da produção 1. Na produção 3 esta nota passou a 4 valores, confirmando que o aroma a maçã se intensifica com um tempo de maturação maior. Os resultados obtidos demonstram que o desenvolvimento da sidra a partir do concentrado de sumo de maçã e do retentato foi bem-sucedido, o que foi comprovado pela introdução do produto no mercado.

Keywords

Protein hydrolysis, nutrient medium, by-product of juice clarification, apple wort, industrial scale

Abstract

Cider is a beverage obtained from the fermentation of apple juice. Portugal is not a country with a cider drinking tradition, however, there is a clear pattern of growth, both in terms of volume and value of consumption. Thus, cider presents itself as a product with a large unexploited potential an untapped potential, with a small number of competitors, especially if the apple juice concentrate is used as raw material. Therefore, the launching of a new cider may be a good bet on the market of alcoholic beverages. The present internship work, made at the microbrewery Vadia, had as a main objective, the development of a cider from the fermentation of the concentrate of apple juice. As apple juice concentrate is deficient in amino acids and minerals important for yeast metabolism during fermentation, it was theorized to create a rich, nutritive and suitable medium for yeast growth by incorporating the by-product resulting from the ultrafiltration of concentrated apple, referred to as retentate. For the formulation of the nutritive medium, the hydrolysis of the retentate proteins was promoted through the existent proteolytic enzymes in the barley malt. Different malt and retentate ratios (1:1 and 1:10) were tested in order to overcome the lack of amino acids. The ideal ratio of 1:10 of the nutrient medium was defined and an industrial scale-up was made. Finally, the free amino acids from protein hydrolysis were quantified by gas chromatography–mass spectrometry in order to evaluate the extent of the enzymatic hydrolysis in two different productions. In production 1, the nutrient medium containing a total amino acid concentration of 1.627 g/L was diluted to a final volume of 1000 L, and in production 2, a concentration of 1.559 g / L was diluted to a final volume of 2000 L. The values of amino acids obtained in the nutrient medium are within the values considered ideal for an efficient fermentation (0.500-2.000 g/L). A third production of 2000 L was made according to a sensorial appreciation of the previous ones, in order to optimize the parameters of cider production. During each production, the fermentation profile was monitored and the final product was obtained after 10 days in all 3 productions. To evaluate the consumer receptivity to cider, three sensorial analyzes were performed, one after each production. According to sweetness and acidity, an evaluation of 4 out of 5 was obtained in the three productions. However, the apple aroma obtained an evaluation of 2 out of 5 in production two, compared to the evaluation of 3 in production one. In production three this note passed to an evaluation of 4, confirming that the apple aroma intensifies in a larger maturation time. The results obtained demonstrate that the development of cider from apple juice concentrate and retentate was successful, as proved by the introduction of the product on the market.

Índice

Índice de Imagens	5
Índice de Tabelas	7
Abreviaturas	9
1. Introdução	11
1.1. A empresa: Microcerveja Vadia	11
1.2. Produção e Mercado da Sidra em Portugal	12
1.3. Matérias-primas	13
1.3.1. Concentrado de sumo de maçã	13
1.3.1.1. Processo de obtenção	13
1.3.1.2. Composição Química	14
1.3.2. Retentato	17
1.3.2.1. Processo de obtenção	17
1.3.2.2. Composição química	18
1.3.3. Malte	19
1.3.3.1. Composição química	20
1.3.3.2. Enzimas do malte	20
1.4. Fatores determinantes na fermentação para o crescimento e metabolismo das leveduras	22
1.4.1. Composição do mosto e metabolismo dos seus constituintes	22
1.4.1.1. Metabolismo dos açúcares	23
1.4.1.2. Hidratos de carbono	27
1.4.1.3. Ácidos Orgânicos	27
1.4.1.4. Compostos azotados	28
1.4.1.5. Minerais	29
1.4.2. Temperatura	30
1.4.3. pH	31
1.4.4. Inoculação e seleção de leveduras	32
1.5. Aplicações na valorização do retentato	34
1.5.1. Produção de Ácido Cítrico (AC)	35

1.5.2.	Produção de enzimas lenhínicas e libertação de compostos polifenólicos.	36
1.5.3.	Dietas alimentares para insetos	37
2.	Objetivos do trabalho de estágio	39
3.	Materiais e Métodos	41
3.1.	Amostragem	41
3.1.1.	Concentrado de sumo de maçã	41
3.1.2.	Retentato	42
3.1.3.	Malte	42
3.2.	Formulação do meio nutritivo	42
3.2.1.	Otimização da composição do meio nutritivo	42
3.2.1.1.	Rácio	43
3.2.1.2.	Tempo	43
3.2.1.3.	Temperatura	43
3.2.2.	Análise de aminoácidos livres por qGC-MS	43
3.3.	Scale-up do meio nutritivo	44
3.4.	Processo fermentativo	45
3.4.1.	Estirpe de levedura	45
3.4.2.	Inoculação e condições de fermentação	45
3.4.3.	Monitorização da fermentação	45
3.5.	Caracterização do produto final	45
3.5.1.	Determinação de açúcares redutores	45
3.5.2.	Determinação da concentração de Etanol	46
3.5.3.	Análise Sensorial	48
4.	Resultados e Discussão	49
4.1.	Formulação do meio nutritivo	49
4.2.	Produção industrial de sidra	51
4.2.1.	Caracterização do meio nutritivo	51
4.2.2.	Processo fermentativo	53
4.2.2.1.	Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)	53
4.2.2.2.	Percentagem de álcool	54

4.3.	Análise produto final.....	55
4.3.1.	Açúcares redutores.....	55
4.3.2.	Porcentagem de etanol	56
4.3.3.	Análise Sensorial	57
5.	Conclusão.....	69
6.	Bibliografia	71
7.	Anexos	79
	Anexo 1 – Inquérito 1ª análise sensorial.....	79
	Anexo 2 – Inquérito 2ª análise sensorial.....	80
	Anexo 3 – Inquérito 3ª análise sensorial.....	81

ÍNDICE DE IMAGENS

Figura 1 - Fluxograma do processamento da maçã e origem do bagaço de maçã e retentato (adaptado de [40]).	13
Figura 2 - Esquema de uma unidade de Ultrafiltração (adaptado de [7]).	18
Figura 3 - Transporte de glucose e frutose na membrana plasmática.	24
Figura 4 - Via da glicólise.	26
Figura 5 - Conversão piruvato em etanol (fermentação alcoólica).	27
Figura 6 - Variação do crescimento populacional das leveduras durante a fermentação alcoólica em diferentes temperaturas: □15 ^a C, ◇20 ^a C, ●25 ^a C, Δ30 ^a C, ▼35 ^a C.	31
Figura 7 - Concentração total de aminoácidos presentes no retentato.	49
Figura 8 - Concentração de aminoácidos presentes no retentato.	50
Figura 9 - Concentração total de aminoácidos presentes no retentato para a primeira e segunda produções de sidra a diferentes tempos de hidrólise.	52
Figura 10 - Concentração de aminoácidos presentes no retentato para a primeira e segunda produções de sidra a diferentes tempos de hidrólise.	53
Figura 11 - Sólidos solúveis totais (°Brix) das Sidras 1,2 e 3.	54
Figura 12 - Percentagem de álcool das Sidras 1, 2 e 3.	55
Figura 13 - Idades dos consumidores presentes na prova 1.	57
Figura 14 - Género dos consumidores presentes na prova 1.	57
Figura 15 - Apreciação geral dos consumidores presentes na prova 1.	58
Figura 16 - Pontuações do sabor doce para os consumidores presentes na prova 1.	59
Figura 17 - Pontuações do sabor ácido para os consumidores presentes na prova 1.	59
Figura 18 - Pontuações do aroma a maçã para os consumidores presentes na prova 1.	60

Figura 19 - Nota da avaliação final dos consumidores presentes na prova 1.	60
Figura 20 - Opção de compra dos consumidores presentes na prova 1.	61
Figura 21 - Idades dos consumidores presentes na prova 2.	61
Figura 22 - Género dos consumidores presentes na prova 2.	61
Figura 23 - Pontuações do “aroma a maçã” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.	62
Figura 24 - Pontuações do “sabor doce” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.	63
Figura 25 - Pontuações do “sabor ácido” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.	63
Figura 26 - Pontuações do “sabor a maçã” dos consumidores às sidras 1 e 2.	64
Figura 27 - Preferências dos consumidores entre as sidras 1 e 2.	64
Figura 28 - Género dos consumidores presentes na prova 3.	65
Figura 29 - Idades dos consumidores presentes na prova 3.	65
Figura 30 - Pontuações do “aroma de maçã” dos participantes presentes na prova 3.	65
Figura 31 - Pontuações do “sabor doce” dos consumidores da sidra 3.	66
Figura 32 - Pontuações do “sabor ácido” dos consumidores da sidra 3.	66
Figura 33 - Pontuações do “sabor a maçã” dos consumidores da sidra 3.	66
Figura 34 - Notas das avaliações finais dos consumidores da sidra 3.	67
Figura 35 - Opção de compra dos consumidores à sidra 3.	67
Figura 36 – Inquérito realizado no Oliva Beer Mind.	79
Figura 37 – Inquérito realizado no grupo QOPNA na Universidade de Aveiro.	80
Figura 38 – Inquérito realizado no 12º Encontro Nacional – Glupor-12.	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição "ideal" do sumo de maçã para produção de sidra (adaptado de [10]).	15
Tabela 2 - Composição físico-química do retentato (adaptado de [17]).	19
Tabela 3 - Grupos de assimilação de aminoácidos pela levedura.	28
Tabela 4 - Lotes e especificações técnicas do concentrado de sumo de maçã	41
Tabela 5 - Especificações técnicas do retentato.	42
Tabela 6 - Quantidades de malte, concentrado e retentato utilizados nas três produções.	44
Tabela 7 - Concentrações das diluições preparadas a partir da solução mãe.	48
Tabela 8 - Scale-up industrial das quantidades de malte, retentato e concentrado.	51
Tabela 9 – Sólidos solúveis totais (°Brix) e concentração de açúcares redutores.	55
Tabela 10 - Medição da % de etanol pelo método do hidrómetro e por HS-SPME/GC-FID.	56

ABREVIATURAS

Δ – variação

μ – taxa de crescimento microbiano

°Brix -Unidade de teor de sólidos solúveis totais

FAN – *Free Amino Nitrogen*

YAN – *Yeast Assimilable Nitrogen*

GC-FID – cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama

GC-qMS – cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrofotometria de massa com analisador quádruplo

rpm – rotações por minuto

SPME - Microextração em fase sólida

UF - Ultrafiltração

T – temperatura

t – tempo

V – volume

1. INTRODUÇÃO

1.1. A empresa: Microcervejeira Vadia

O presente trabalho foi realizado durante um estágio curricular, em ambiente empresarial, na empresa Essência D'Alma Lda., produtora da cerveja artesanal Vadia. Apresentando-se ao mercado no início de 2012, a marca Cerveja Vadia, pioneira na produção de cerveja artesanal em Portugal, está sediada em Ossela – Oliveira de Azeméis.

Atualmente comercializa 7 tipos distintos de cerveja:

1. Cerveja Vadia Trigo (*Wheat Beer*)
2. Cerveja Vadia Preta (*Dark Lager*)
3. Cerveja Vadia Loira (*German Pilsner*)
4. Cerveja Vadia Rubi (*Strong Red Lager*)
5. Cerveja Vadia Extra (*Strong Amber Ale*)
6. Cerveja Vadia Orgânica (*American Pale Ale*)
7. Cerveja Vadia Ginja (*Fruted Lager*)

A marca Vadia tem vindo a ser distinguida desde a sua entrada no mercado, nos mais prestigiados concursos mundiais de cerveja, realizados em países com fortes tradições cervejeiras, tais como a Bélgica, no *Brussels Beer Challenge* (BBC), a França, no *Concours de Lyon* e a Inglaterra, no *World Beer Awards*.

As diversas conquistas fazem da cerveja Vadia a marca de cerveja artesanal portuguesa com maior reconhecimento mundial, com um total de 12 medalhas.

Com um crescimento médio anual de cerca de 50%, abrangendo todo o território nacional e alguns mercados de exportação, a marca tem apostado em novas áreas de negócio e novos mercados. A marca Cerveja Vadia é comercializada em todo o país na grande distribuição e no canal HORECA. Com um aumento significativo da área total e a aquisição de novos equipamentos de brassagem, a capacidade total de produção de mosto chega a cerca de 1 milhão de litros por ano. A previsão para 2017, levará a marca a uma capacidade de engarrafamento de 3 milhões de garrafas /ano.

1.2. Produção e Mercado da Sidra em Portugal

A sidra é uma bebida alcoólica fermentada feita a partir do sumo de maçã. O conteúdo alcoólico varia de 5% a 7%. Atualmente, os países com produção mais significativa de sidra são a França, Espanha, Bélgica, Reino Unido e a Alemanha. A Espanha é o único país em que esta bebida beneficia de uma denominação de origem reconhecida pela União Europeia, zona das Astúrias, onde tem grande tradição [1].

Em Portugal, a tradição de beber e produzir sidra tinha vindo a desaparecer ao longo dos anos. Tradicionalmente, esta bebida era produzida no Norte, mas hoje em dia, há apenas algumas pequenas produções caseiras, principalmente na região do Minho, onde ainda bebem sidra em algumas festividades locais. Na Região Autónoma da Madeira, a sidra ainda é bastante popular e tradicional na freguesia de Santo António da Serra onde algumas festividades são feitas com sidra de maçã e pêra [2].

Olhando para os valores mundiais, há um claro padrão de crescimento, tanto em termos de volume e como em valor de consumo de sidra. Segundo *The European Cider & Fruit Wine Association*, Portugal tem um consumo de sidra de 11,7 milhões de litros por ano, com um crescimento anual de 41,67% [3]. Em 2006, a Unicer fez uma tentativa de recuperar esta tendência lançando a *Decider*. No entanto, a bebida não possuía os atributos necessários para atingir o seu objetivo e conquistar uma posição relevante no mercado: era um produto muito tradicional, com um sabor muito ácido e semelhante ao vinho. Desta forma, o produto foi retirado do mercado poucos meses após o seu lançamento.

Em 2011, pela mão do Grupo Carlsberg, a Unicer lança em Portugal a sidra Somersby. Uma sidra mais citadina, mais direcionada para grandes centros urbanos onde o consumidor tem uma mente mais aberta, não tendo medo de quebrar hábitos e procurar conhecer novos produtos. Desde então que a sidra Somersby se tem demonstrado líder do mercado.

No início do ano de 2017, a Sociedade Central de Cervejas lançou uma nova sidra, a Bandida do Pomar. Apresentou-se ao mercado como uma alternativa à Somersby, destinada também ela aos jovens adultos. No entanto, o seu mercado alvo destina-se ao canal HORECA, não estando presente na grande distribuição.

1.3. Matérias-primas

1.3.1. Concentrado de sumo de maçã

1.3.1.1. Processo de obtenção

A concentração de sumos de fruto apresenta inúmeras vantagens para a sua comercialização. Além deste método reduzir custos de transporte, armazenamento e embalagem, através da redução do volume, o concentrado é mais estável, apresentando maior resistência à degradação microbiológica e química, como resultado da redução da atividade da água. Este processo de concentração é geralmente realizado por processos de evaporação a vácuo em várias etapas, nos quais a água é removida a altas temperaturas [4].

O concentrado de sumo de fruto tem sido um produto com crescente utilização na indústria alimentar. Além do uso que lhe é destinado, como a incorporação em sumos e néctares de fruta, também tem vindo a ser utilizado recentemente como substrato para fermentações que dão origem a vinagres e sidras, o que lhe atribui uma crescente valorização [5]. Porém, a obtenção do concentrado de sumo de maçã pressupõe várias etapas de processamento. Na **figura 1** está representado um fluxograma onde mostra o processamento da maçã e os subprodutos que daí derivam, o bagaço da maçã (*Apple pomace*) e o retentato (*Apple pomace sludge*).

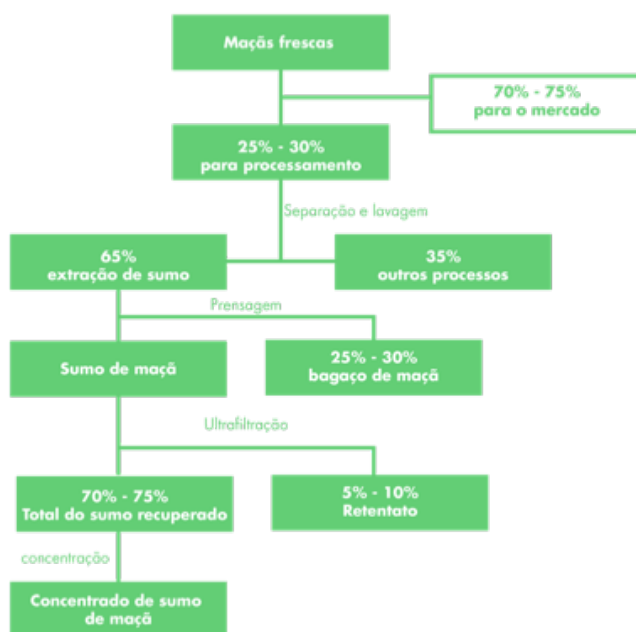


Figura 1 - Fluxograma do processamento da maçã e origem do bagaço de maçã e retentato (adaptado de [40]).

O processo é iniciado com a **chegada da matéria-prima** à unidade fabril, onde é armazenada e lavada. A **lavagem** com água é concluída com um agente antimicrobiano, o peróxido de hidrogénio [5]. Após a lavagem, segue-se a **moagem**, onde a fruta é triturada por ação mecânica e são adicionadas enzimas comerciais de maceração, principalmente constituídas por pectina metilesterase [5]. Depois de obtida a polpa da fruta na moagem, esta é espremida e lavada de forma a retirar a maior quantidade possível de sumo. Esta etapa define-se como **prensagem**. De seguida, o sumo de fruta é submetido ao primeiro tratamento térmico, a **desaromatização**, a uma temperatura de 90°C de modo a adquirir 20°Brix e a separar grande parte dos compostos orgânicos voláteis [5].

O sumo desaromatizado é transferido para tanques de **despectinização**, onde sofre um tratamento enzimático através da adição de enzimas amilolíticas e pectinolíticas. É também aqui que é adicionado o carvão ativado, quando necessário [6].

A clarificação é concluída por **ultrafiltração** de fluxo tangencial. Neste processo o sumo passa por membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno) com um *cutoff* de 100 kDa numa configuração contínua *feed-and-bleed* a aproximadamente 23,5 m³/h [7]. Aos sólidos retidos pelas membranas de ultrafiltração dá-se o nome de **retentato**. Concluída a ultrafiltração, o sumo filtrado é sujeito a um segundo tratamento térmico. Nesta etapa, a **concentração**, são aplicadas diferentes temperaturas à medida que o teor de sólidos solúveis finais aumenta. O primeiro patamar de temperatura ronda os 100°C e eleva os sólidos solúveis a valores próximos de 45°Brix. Após este primeiro choque térmico a redução do teor de água é feita de forma mais lenta e gradual (até 70°Brix para temperaturas que não excedem os 45°C [5]).

1.3.1.2. Composição Química

A composição química do sumo de maçã baseia-se nos constituintes solubilizados da matéria-prima original, sendo afetada pela variedade, pela região de crescimento, pelo clima e maturação, práticas culturais, armazenamento pós-colheita, processamento e armazenamento da maçã [8]. Ao longo das últimas duas décadas têm sido realizados vários estudos sobre a composição química do sumo de maçã comercial, principalmente com o objetivo de estabelecer padrões para a deteção de sumos adulterados [9]. A maioria dos sumos de maçã comerciais são feitos a partir de uma mistura de três ou mais variedades de maçã, isto porque o equilíbrio de açúcar, ácido e taninos necessários para um produto de qualidade é difícil de alcançar com

apenas uma variedade de maçã [10]. A empresa Indumape, fornecedora do concentrado de sumo de maçã utilizado ao longo do projeto, processa diferentes variedades de maçã, produzidas em Portugal, como por exemplo Maçã Gala, Maçã Golden, Maçã Starking e Maçã Reineta.

Na **tabela 1** apresentam-se os valores aconselhados para a composição do sumo de maçã, para uma boa fermentação, na produção de sidra [10].

Tabela 1 - Composição "ideal" do sumo de maçã para produção de sidra (adaptado de [10]).

Composição ideal	
Frutose (g/100mL)	7 – 11
Glucose (g/100mL)	1,5 - 3,0
Sacarose (g/100mL)	2 - 4,5
Sorbitol (g/100mL)	0,2 - 1,0
Pectina (g/100mL)	0,1 – 1
Aminoácidos (mg/L)	500 - 2000
Potássio (mg/L)	1200
Ácido Málico (g/100mL)	0,3 - 0,5
Ácido 3-cafeoil-O-quinico (mg/L)	300 - 700
Floridizina (mg/L)	100 - 200
Epicatequina e procianidinas (mg/L)	1000 - 1500

Hidratos de Carbono

Os hidratos de carbono representam o grupo dos constituintes do sumo de maçã mais abundante. Constituem uma fonte de energia e metabolitos, sendo utilizados na fermentação alcoólica promovida pelas leveduras, podendo ser encontrados sob a forma de açúcares livres ou de polímeros. Os açúcares livres em maiores quantidades no sumo da maçã são a D-frutose, sacarose e D-glucose. A D-frutose é o principal açúcar nas maçãs (60-70%) e está presente em maior quantidade nestas quando comparado com outras frutas [8]–[11].

Segundo um estudo realizado por Elkins *et al.* [8] sobre a composição química do concentrado de sumo de maçã, a concentração de D-frutose apresenta uma média de 6,07 g/100mL, a sacarose uma média de 1,66 g/100mL e a D-glucose uma média de 2,42 g/100mL.

O sorbitol, apesar de em menores quantidades, 0,390 g/100mL, é também uma presença constante nos sumos de maçã. A concentração total destes açúcares livres no concentrado de sumo de maçã representa cerca de 92% dos sólidos solúveis das amostras estudadas. Esta percentagem vem confirmar a abundância de açúcares livres no concentrado de sumo de maçã, afirmando-se como um excelente substrato para a produção de sidra. As amostras analisadas sofreram uma diluição até 11,5 °Brix, sendo este um valor próximo dos valores °Brix utilizados nas três produções de sidra durante o estágio.

Ácidos Orgânicos

O principal ácido orgânico presente no sumo de maçã é o ácido L-málico. Estão também habitualmente presentes em quantidades menores os ácidos quinínico, xiquímico, cítrico e fumárico. O valor médio de ácido L-málico presente no concentrado de sumo de maçã é 0,46 g/100mL [8].

Aminoácidos

A concentração total de azoto no sumo de maçã é muito inferior à encontrada noutros frutos, havendo pouca proteína solúvel ou material peptídico e mais de 90% está na forma de ácido aspártico ou asparagina. A maioria dos sumos de maçã tem um teor de azoto relativamente baixo, variando normalmente entre 50-150 mg/L [12]. A concentração média de ácido aspártico no concentrado de sumo de maçã é de 139 mg/L, enquanto a concentração média de asparagina é 411 mg/L [8]. Em relação à concentração total de aminoácidos, o valor médio é 582,7 mg/L, o que de acordo com a **tabela 1**, é um valor muito próximo do mínimo desejado, 500-2000 mg/L de aminoácidos, para a produção de sidra. No entanto, maiores concentrações de aminoácidos beneficiam a eficiência da fermentação por parte das leveduras, pelo que é desejável criar um meio rico em aminoácidos livres prontos a serem utilizados [13].

Compostos Fenólicos

A concentração de compostos fenólicos, que é fortemente dependente da variedade de maçãs e do seu período de maturação, está intimamente associada às qualidades nutricionais e sensoriais das frutas [11]. Os compostos fenólicos têm um efeito distinto tanto no sabor, devido

à sua adstringência, como na aparência. Esta característica deve-se à concentração relativamente elevada de um tipo de polifenóis, conhecidos como “taninos” [10].

Os principais compostos fenólicos presentes no sumo de maçã são o ácido 3-cafeoil-*O*-quínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, procianidinas (B1, B2, trímero C1), rutina e floridizina [10].

A concentração média do ácido 3-cafeil-*O*-quínico é 44,8 mg/L, 1,5 mg/L de ácido cafeico, 1,06 mg/L de ácido *p*-cumárico, 2,1 mg/L de ácido ferúlico, 11,5 mg/L de (+)-catequina, 9,0 mg/L de (-)-epicatequina, 8,4 mg/L de rutina e 26,1 mg/L de floridizina [8].

Minerais

Minerais como Ca, K, Na e Mg e oligoelementos como Cu, Zn e Mn são cruciais em vários processos biológicos [10]. O teor de minerais nas plantas é afetado pela variedade de maçã, pelas condições do solo, pelo clima durante o cultivo, pelo uso de fertilizantes e pelo estado de maturação da colheita [14].

Os principais minerais do sumo de maçã são o potássio, magnésio, cálcio e fósforo. A concentração média destes minerais é 99,4 mg/100g, 4,13 mg/100g, 4,96 mg/100g e 8,8 mg/100g, respetivamente [8].

1.3.2. Retentato

1.3.2.1. Processo de obtenção

A Ultrafiltração (UF) é a técnica de separação mais utilizada pela indústria de sumos de fruto para complementar o tratamento enzimático, com vantagens que incluem uma elevada eficiência e tempos de processamento reduzidos [7]. A **figura 2** representa o esquema de uma unidade de UF idêntica à que é utilizada na Indumape.

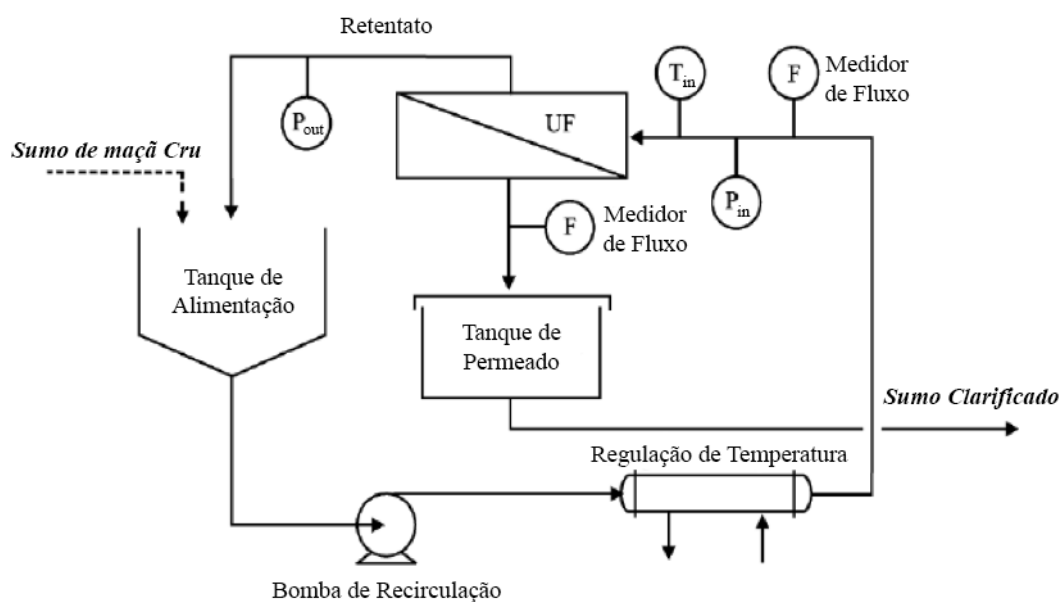


Figura 2 - Esquema de uma unidade de Ultrafiltração (adaptado de [7]).

O equipamento bombeia o sumo cru através de um módulo de filtração composto por *bundles* tubulares, constituídos por tubos. As membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) que revestem estes tubos têm um *cut-off* molecular de 100 kDa [15]. O sumo cru circula tangencialmente ao plano da superfície das membranas (*cross-flow*). O caudal deve ser suficientemente alto para garantir um regime turbulento no interior dos tubos de filtração. O sumo filtrado é recolhido sob designação de permeado ou filtrado. O **retentato** refere-se à mistura que permanece no módulo e que é continuamente recirculada até à paragem e lavagem do equipamento [15].

1.3.2.2. Composição química

Apesar da indústria de processamento de maçãs gerar uma grande quantidade de bagaço da maçã e retentato, apenas tem sido dada maior relevância a nível industrial ao primeiro, sendo este utilizado em inúmeras aplicações e por isso existe mais informação sobre as suas características químicas [16]. No entanto, nos últimos anos houve um aumento de produção na indústria de processamento de maçãs e, conseqüentemente, um concomitante aumento de subprodutos agroindustriais [17]. No seguimento deste crescimento, a indústria tem

considerado o retentado como uma forma de substrato rico em diversos nutrientes, apresentando vantagens como matéria-prima para produtos biotecnológicos:

- Presença de polissacarídeos;
- Presença de mono-, di- e oligossacarídeos, que podem ser metabolizados por microrganismos;
- Rico em vitaminas e outros minerais, diminuindo o custo nos suplementos nutritivos para meios de fermentação [17].

Na **tabela 2** é descrita a composição físico-química do retentado:

Tabela 2 - Composição físico-química do retentado (adaptado de [17])

Componentes de biomassa (g/L)	
Sólidos totais	115–135 ± 5,0
Nitrogénio	2,2–2,9
Carbono	44,3–51,9
Hidratos de carbono	56,2–66 ± 1,7
Proteína	28,8–33,8 ± 2,0
Lípidos	5,1–5,9
Micronutrientes (mg/kg)	
Al	259–304,6 ± 17
Ca	912–1070 ± 58
Cd	0,02–0,023 ± 0
Cr	0,57–0,67 ± 0.03
Cu	13,4–15.73 ± 1,3
Fe	333–391 ± 56
K	6825–8012 ± 296
Na	405–417 ± 45
Pb	0,3–0,35 ± 0,03
S	2200–2585 ± 157
Zn	18,1–21,25 ± 2,5

1.3.3. Malte

A cevada é o cereal utilizado como matéria-prima para a elaboração da cerveja, sendo rica em amido e proteínas. Antes de ser utilizada no processo cervejeiro, a cevada é colhida nos

campos e submetida a um processo de maltagem, com o propósito de aumentar o conteúdo enzimático nos grãos. Neste processo ocorrem mudanças físico-químicas e estruturais no grão, onde são formadas e ativadas as principais enzimas do malte (amilases, proteases, glucanases, entre outras).

No processo cervejeiro, o malte de cevada é moído e posteriormente submetido a um processo de brassagem, onde se misturam os grãos moídos com água. Esta mistura é sujeita a vários patamares de temperatura com o objetivo de promover a hidrólise enzimática dos constituintes do malte, como o amido, que é convertido em açúcares fermentáveis (maltose e maltotriose) e não-fermentáveis (dextrinas) e como as proteínas.

No seguimento do processo cervejeiro, e uma vez que o malte se apresenta como uma fonte de proteases, propôs-se o seu uso como uma fonte de enzimas proteolíticas que possibilitasse a sua utilização na hidrólise enzimática das proteínas presentes no retentato.

1.3.3.1. Composição química

O malte é constituído por inúmeros nutrientes, nomeadamente açúcares (70-85%), proteínas (10,5- 11,5%), lípidos (1,5-2%), matéria inorgânica (2-4%) e outros compostos (1-2%). Os hidratos de carbono são os nutrientes com maior impacto na performance da levedura pois são a sua fonte de carbono e energia [18].

1.3.3.2. Enzimas do malte

A germinação da cevada é um processo fisiológico em que os órgãos do embrião se desenvolvem através dos nutrientes armazenados. Este processo ocorre em condições específicas de humidade, calor e oxigénio. Para uma germinação homogénea são necessários teores de humidade entre 44-48% e temperaturas entre 14-18°C. A energia necessária para a germinação é obtida pela respiração, sendo que o oxigénio se torna imprescindível no crescimento do grão. Como consequência das condições de germinação ocorrem alterações externas e internas. Através de enzimas, os nutrientes são decompostos em formas solúveis, para serem consumidos num processo de obtenção de energia [18].

A presença de água na vegetação leva à secreção de fito-hormonas (ácido giberélico, por exemplo), que induzem à formação de enzimas na camada de aleurona, como a α -amilase

e a endopeptidase. Os principais grupos de enzimas hidrolíticas formados são as hemicelulases, enzimas proteolíticas, amilases e fosfatases [18].

Durante e após a germinação das sementes de cevada, muitos dos biopolímeros da semente são divididos em subunidades para o uso da planta em crescimento. As proteínas armazenadas são parcialmente hidrolisadas por proteases endógenas em péptidos mais solúveis e aminoácidos livres. Esta hidrólise de proteínas é fundamental para as indústrias de produção de cerveja e malte, uma vez que as proteínas não conseguem ser utilizadas diretamente pela levedura e precisam de ser degradadas em aminoácidos e péptidos mais pequenos [19].

A decomposição proteolítica é efetuada por uma série de enzimas, nomeadamente endopeptidases e exopeptidases. As endopeptidases são peptidases proteolíticas que quebram ligações peptídicas de aminoácidos não terminais, ao contrário das exopeptidases que quebram as ligações peptídicas a partir de aminoácidos terminais [20]. Mais de 40 endopeptidases já foram identificadas no malte, sendo amplamente classificadas em proteases de cisteína, proteases de serina, metaloproteases e proteases aspárticas [19]. As exopeptidases podem ser classificadas em carboxipeptidases [21] e aminopeptidases [22]. Dependendo do terminal onde a hidrólise ocorre, as exopeptidases são classificadas em carboxipeptidases, se hidrolisam ligações peptídicas na extremidade C, e em aminopeptidases, se atuam na extremidade N [21], [23].

A degradação enzimática das proteínas deve ser considerada de forma diferenciada. A atividade enzimática é afetada tanto pela temperatura como pelo pH do meio onde as enzimas estão inseridas. Cada classe de proteases tem o seu pH ótimo, e variações do pH durante a brassagem podem alterar as composições dos mostos. Ao longo da faixa de pH 5,1 - 6,6, a atividade proteolítica do malte pode variar mais de sete vezes [24]. Para cada valor de pH, e a uma temperatura de 45°C, as atividades individuais das endopeptidases permanecem constantes ao longo do tempo, mas a atividade geral diminui à medida que o pH aumenta de 5,1 para 6,6. No entanto, assim que a temperatura é aumentada para 72°C, as proteases são rapidamente inativadas [24]. As quatro classes de endopeptidases do malte também apresentam atividade enzimática a pH 6,0. No entanto, a um pH 3,8, as proteases de cisteína e as proteases aspárticas estão particularmente ativas, enquanto a níveis mais elevados de pH, nomeadamente a pH 8, estas ficam inativas e a atividade das proteases de serina e as metaloproteases aumenta [25]. Também para as exopeptidases se verificam estas condições. Enquanto que para as

carboxipeptidases o pH ótimo varia entre 4,8-5,7, para as aminopeptidases o pH varia entre 5,8-6,5. A dependência da atividade enzimática com a temperatura também está patente nas exopeptidases, apresentando estas uma maior atividade a temperaturas de 50°C [21], [23].

As proteases exógenas têm sido bastante utilizadas em algumas indústrias. Alguns investigadores têm estudado a purificação de endopeptidases e exopeptidases do malte da cevada, uma vez que estas enzimas apresentam propriedades muito semelhantes (pH, atividade específica e alguns dos mesmos inibidores) a várias dipeptidases dos mamíferos e outros microrganismos [22], [23], [26], [27].

1.4. Fatores determinantes na fermentação para o crescimento e metabolismo das leveduras

A sidra é uma bebida obtida a partir da fermentação alcoólica do sumo de maçã. Esta é o resultado de complexas interações bioquímicas e biológicas que ocorrem no mosto da maçã por atividade metabólica de vários microrganismos, tais como leveduras, bactérias lácticas e acéticas. No entanto, são as leveduras que apresentam o papel fundamental no processo de fermentação alcoólica.

Como qualquer processo biológico ou bioquímico, este está dependente de diversos fatores que afetam a atividade das leveduras e, por conseguinte, a qualidade do produto final. A composição do mosto e suplementos nutricionais, a temperatura de fermentação, os níveis de dióxido de enxofre, a inoculação de leveduras selecionadas e a sua interação com microrganismos indígenas são alguns dos principais fatores.

O conhecimento do metabolismo da levedura é, por isso, de fundamental importância, uma vez que isso terá um efeito decisivo na qualidade do produto. De todos os processos bioquímicos destacam-se a fermentação do açúcar e metabolismo de hidratos de carbono, de proteínas, de lípidos e de minerais.

1.4.1. Composição do mosto e metabolismo dos seus constituintes

O crescimento e sobrevivência das leveduras durante o processo de fermentação são afetados desde início pela composição do mosto, nomeadamente a concentração total de açúcares iniciais, de proteínas (compostos azotados) e vitaminas.

1.4.1.1. Metabolismo dos açúcares

A sidra é uma bebida fermentada obtida a partir do sumo de maçã ou concentrado. O sumo de maçã contém muitos açúcares, incluindo frutose, glucose e sacarose, bem como outros hidratos de carbono, em diferentes concentrações. O açúcar em maior quantidade no sumo de maçã é a frutose, até 70% do açúcar fermentável total entre 100-150 g/L [28].

A *S. cerevisiae* influencia fortemente a composição e as características organolépticas da sidra, tornando assim a levedura um dos principais fatores determinantes do perfil sensorial da sidra. Além disso, o tipo de levedura e a maneira como ela interage com o sumo de maçã determina o progresso da fermentação, podendo ocorrer fermentações alcoólicas lentas e incompletas. Tais fermentações problemáticas podem estar ligadas a questões como limitações nutritivas ou presença de inibidores fermentativos no meio, mas também à capacidade da levedura absorver açúcares *per se*, mais especificamente frutose, em comparação com glucose, sendo estes os dois açúcares mais importantes no sumo da maçã [29], [30].

A fermentação alcoólica é um processo complexo do metabolismo do açúcar e envolve um grande número de reações químicas e enzimáticas. Os dois principais produtos da fermentação alcoólica são o etanol e o dióxido de carbono. Para cada molécula de hexose, nomeadamente glucose e frutose, são produzidas duas moléculas de etanol e duas moléculas de dióxido de carbono. O peso molecular destes açúcares é de 180 g/mol, enquanto que o peso molecular do etanol é de 46 g/mol e do CO₂ é 44 g/mol. Assim, a produção de etanol corresponde a 51,1% do peso total dos açúcares fermentados. Isto significa que o açúcar é separado em quase as mesmas partes por peso de álcool e CO₂. A proporção de dióxido de carbono em volume é, no entanto, maior que a do álcool, uma vez que os gases têm uma densidade muito mais baixa [18].

Os mecanismos bioquímicos pelos quais as leveduras catabolizam os açúcares em etanol são processos complexos e incluem inúmeros passos, catalisados por muitas enzimas. Essencialmente, é possível dividir este processo nas seguintes partes essenciais: a primeira é o transporte do açúcar para o interior da célula através da membrana plasmática; a segunda é a decomposição dos açúcares em piruvato através da glicólise, que por sua vez pode ter dois destinos - respiração ou fermentação. A respiração leva a uma utilização de energia mais eficiente do açúcar, no entanto, em condições anaeróbias, a levedura está em condições para fermentar o piruvato. Outro detalhe importante da fermentação alcoólica é a maior preferência

da *S. cerevisiae* pela glucose em vez da frutose. Durante o progresso da fermentação, a discrepância entre a utilização de glucose e frutose aumenta com as estirpes utilizadas, uma vez que estas estão dependentes do aumento da concentração de etanol e da limitação de nutrientes [31]. Estão implicados dois passos na utilização de hexoses: os sistemas de transporte de açúcar da membrana plasmática e a fosforilação de hexoses durante o primeiro passo de glicólise [32].

Transporte de hexoses na membrana plasmática

O transporte de hexoses pela *S. cerevisiae*, como ilustrado na **figura 3**, tem sido mostrado por muitos autores como um ponto crítico para a diferente preferência mostrada por este organismo para a glucose e para a frutose.

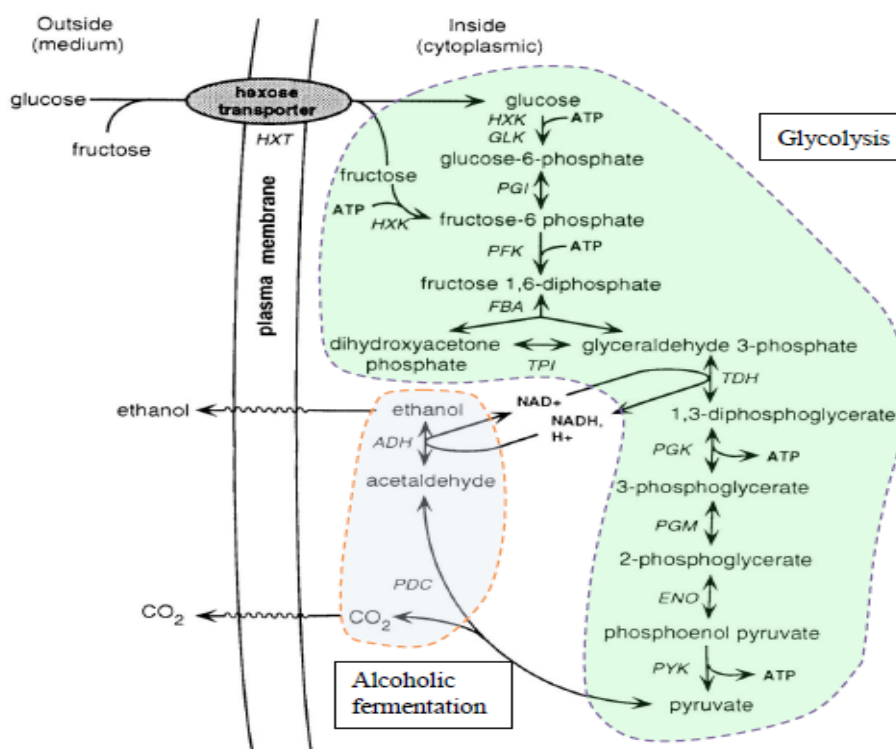


Figura 3 - Transporte de glucose e frutose na membrana plasmática.

Nesta levedura, a captação de açúcar é mediada por difusão facilitada, onde 34 proteínas constituem a família da permease. Destas proteínas, vinte formam a subfamília de transportadores de hexose e sensores de glucose (Hxt1-17, Gal2, Snf3 e Rgt2). No entanto, em condições de fermentação, os transportadores Hxt1 a Hxt7 são os mais importantes para o

consumo de glucose e frutose [33], [34]. Embora estes tenham a capacidade de transportar glucose e frutose com afinidade baixa ou elevada, todos têm tipicamente uma maior afinidade para a glucose do que para a frutose. Com elevada concentração de hexose no meio, o sistema de baixa afinidade é o principal responsável pela captação de açúcar na célula, enquanto a alta afinidade está sob controlo da repressão de catabolitos [35]. Com a progressiva diminuição de hexoses a partir do meio, a célula muda do sistema de baixa afinidade para o sistema de alta afinidade [36]. Alguns dos transportadores da membrana de baixa e alta afinidade são simultaneamente expressos durante certas fases da fermentação [34]. Os transportadores HXTs são expressos em diferentes níveis durante diferentes fases de fermentação, isto é, em diferentes concentrações de substrato. Os transportadores de alta afinidade são induzidos quando a concentração de glucose é baixa (0,18-0,72 g/L) e são reprimidos quando a concentração de glucose é maior. Inversamente, os transportadores de baixa afinidade são induzidos por uma concentração elevada de glucose (9-18 g/L) [36]. É importante notar que a discrepância entre glucose e frutose não é constante durante todo o processo da fermentação. O tempo de fermentação e a estirpe utilizada são os principais fatores para esta discrepância [31]. Uma possível explicação resulta da diferente tolerância ao etanol mostrada por diferentes estirpes. Outra possibilidade está relacionada com a disponibilidade e utilização do nitrogénio. Diferentes estirpes utilizam azoto a velocidades diferentes e com eficiências diferentes [37]. Além disso, a extenuação do azoto em combinação com o rápido *turnover* dos transportadores de açúcar na fase estacionária é responsável pela inativação dos sistemas de transporte do açúcar, com a conseqüente redução da capacidade fermentativa. Em casos de suplementação azotada, o consumo de frutose foi aumentado em relação à glucose. Outra possibilidade relacionada com esta discrepância pode ser a diferente afinidade das proteínas localizadas na membrana plasmática para a glucose e para frutose [38].

Glicólise

A degradação da glucose e da frutose ocorre no citosol. A conversão da glucose e da frutose em piruvato é conhecida como glicólise [18]. Uma vez no interior da célula, a glucose e a frutose são fosforiladas em frutose-6-fosfato. Para a frutose, este é um passo direto, no entanto a glucose tem de ser fosforilada em glucose-6-fosfato e só depois convertida em frutose-6-fosfato pela enzima fosfo-hexose isomerase. A partir deste ponto, não há mais diferenciação entre glucose e frutose. A glucose e a frutose são ambas fosforiladas pela enzima hexocinase, embora com taxas diferentes (glucose mais rápido do que a frutose) [18].

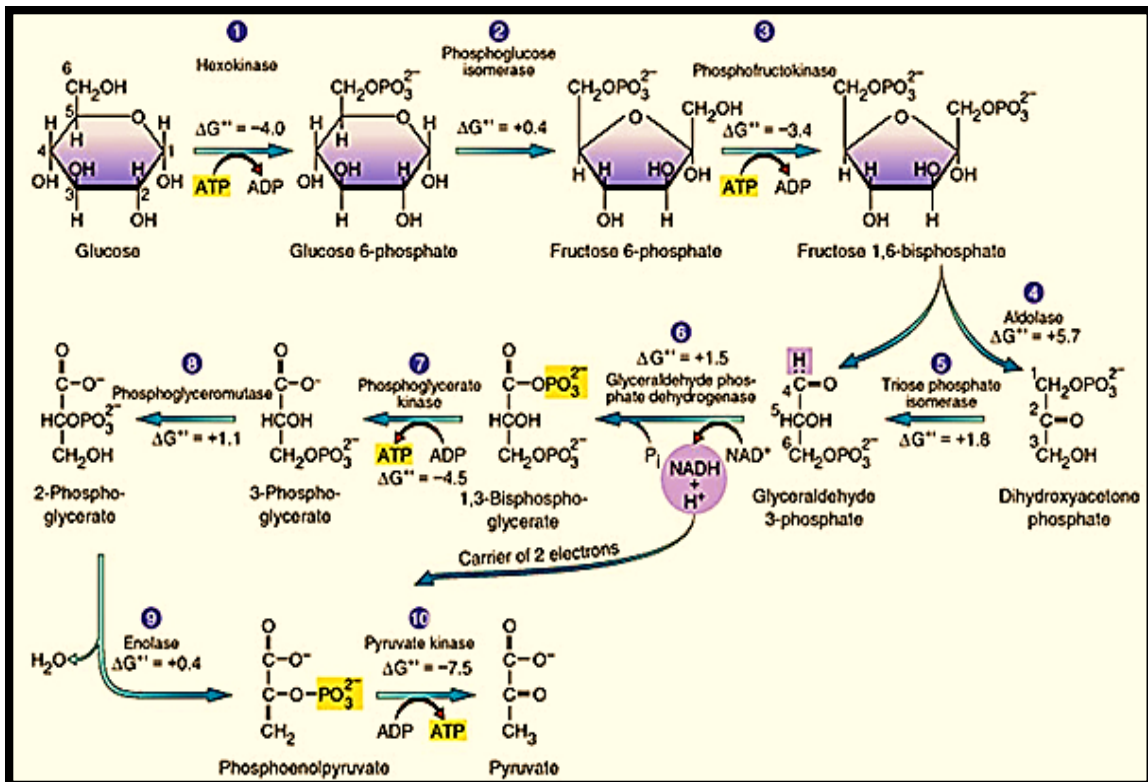


Figura 4 - Via da glicólise.

O piruvato é o produto final da glicólise. Na ausência de oxigénio, a levedura está em condições para fermentar o piruvato. No entanto, na presença de oxigénio a fermentação é inibida ou totalmente interrompida. Se, por outro lado, estiver presente açúcar em concentrações acima de 0,1 g/L, o complexo enzimático de respiração é inibido por si só e, ao mesmo tempo, ocorre fermentação parcial [18].

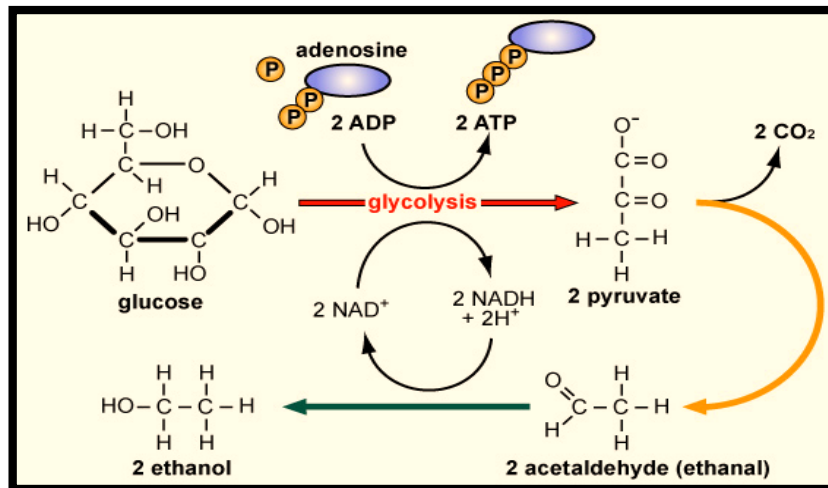


Figura 5 - Conversão piruvato em etanol (fermentação alcoólica).

1.4.1.2. Hidratos de carbono

A levedura absorve os monossacarídeos dissolvidos no sumo da maçã (D-glucose e D-frutose) e dissacarídeos (sacarose). O hidrato de carbono de reserva mais importante é o glicogénio, um polímero da glucose, que é formado e armazenado no citoplasma. O glicogénio presente nas células de levedura é usado pelas células como fonte primária de energia antes do início da fermentação. Como resultado, o conteúdo de glicogénio diminui consideravelmente nas primeiras 12 horas, para depois voltar a aumentar no decorrer da fermentação.

Os açúcares são os componentes em maiores concentrações no sumo de maçã. A partir da fermentação dos açúcares do mosto, há formação de etanol e CO₂. Como já referido anteriormente, a D-frutose (70%), D-glucose (28%) e a sacarose (2%) são as principais hexoses encontradas no sumo de maçã. A concentração de açúcares é um fator a ter em conta, uma vez que elevadas concentrações podem provocar a inibição do crescimento das leveduras, devido à pressão osmótica criada no meio e ao aumento da concentração intracelular de etanol. Por outro lado, baixas concentrações de açúcares apenas influenciam o teor final de etanol [10].

1.4.1.3. Ácidos Orgânicos

Os principais ácidos orgânicos presentes no mosto da maçã são o ácido L-málico e o ácido cítrico, como já referido anteriormente. Não é conhecido até ao momento que estes ácidos

tenham qualquer efeito no crescimento das leveduras, mas sabe-se que possuem um papel importante no pH dos mostos [39].

1.4.1.4. Compostos azotados

Os compostos azotados são nutrientes presentes na composição dos mostos e de também enorme importância para uma fermentação eficiente. Os níveis iniciais de azoto assimilável (YAN- *Yeast Assimilable Nitrogen*), presentes nos mostos, afetam o crescimento, a taxa de fermentação, a cinética de fermentação e a formação de produtos finais do metabolismo das leveduras [18].

Para os níveis de azoto contribuem principalmente os aminoácidos, também descritos como FAN (do inglês *Free Amino Nitrogen*). Estes são a fonte preferencial de azoto para as leveduras e podem ser classificados pelo seu grau de assimilação, como descrito na **tabela 3** [40].

Tabela 3 - Grupos de assimilação de aminoácidos pela levedura.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
Assimilados primeiro e mais rapidamente	Assimilados mais lentamente que o grupo A	Assimilados mais lentamente que o grupo A e B	Apenas lentamente utilizados
Ácido Glutâmico Ácido Aspártico Asparagina Glutamina Serina Treonina Lisina Arginina	Valina Metionina Leucina Isoleucina Histidina	Glicina Fenilalanina Triptofano Tirosina Alanina Amónia	Prolina

A concentração total de azoto da maçã é muito inferior à encontrada noutros frutos, como a uva, e as leveduras *S. cerevisiae* não possuem um sistema para digestão extracelular de proteínas e de péptidos. Por este motivo, não conseguem assimilar estas fontes de azoto.

Na fermentação alcoólica, o conteúdo de azoto disponível é utilizado 80% pela levedura durante a sua fase *lag*, com o objetivo de estimular a produção de proteínas que têm um papel fundamental no transporte de açúcares [41]. O azoto é o principal nutriente limitante no crescimento das leveduras, quando este se encontra em níveis baixos, as fermentações são mais lentas e há um desequilíbrio na composição volátil do produto final. Por outro lado, níveis elevados de azoto no mosto podem levar à presença de azoto residual não assimilável no final da fermentação, o que leva à instabilidade microbiana.

De forma a se obter uma eficiente ação fermentativa, é necessário ter presente dois pontos: 1. Quais os valores iniciais de azoto no mosto, para se perceber se é necessário fazer algum tipo de adição e 2. Quais as necessidades específicas da estirpe de levedura que se irá utilizar [42], [43]. Estudos recentes estabeleceram que para a realização de uma fermentação num espaço de tempo industrialmente viável são necessários 267 mg/L de azoto assimilável [44]. No entanto, estas quantidades estarão sempre dependentes da concentração inicial de açúcares no mosto, do tipo de levedura escolhida e das condições de fermentação aplicadas [37].

De forma a combater as baixas concentrações de azoto no sumo da maçã, têm sido aplicados suplementos com azoto inorgânico, sob a forma de sais de amónio, como por exemplo difosfato ou sulfato de amónio e tiamina [10].

1.4.1.5. Minerais

Os sais minerais são necessários ao metabolismo e ao equilíbrio iónico das leveduras. A levedura requer, acima de tudo, fósforo e enxofre, bem como um número de iões metálicos em pequenas quantidades [18]. O fósforo é necessário para a formação de ATP, para a formação da bicamada fosfolipídica em torno da célula de levedura e contra alterações de pH. A deficiência de fosfatos provoca problemas de fermentação e uma redução do crescimento celular. O enxofre é absorvido pela célula de levedura como sulfato inorgânico e também através de aminoácidos que contêm enxofre, como a metionina ou a cistina. O potássio é necessário em particular para o metabolismo dos hidratos de carbono e suporta todas as reações enzimáticas que se processaram com ATP. O efeito regulador do pH do potássio na troca de iões de hidrogénio formados face a iões potássio (bomba de iões) também é importante. O sódio ativa enzimas, ao mesmo tempo que desempenha um papel preponderante no transporte de

substâncias através da membrana celular. O magnésio é importante para as reações com o fósforo, sobretudo na fermentação. Nesta função não pode ser substituído por outro íon. O cálcio retarda a deterioração da levedura e suporta a formação de quebra. Se há uma deficiência de cálcio, o manganês ou o magnésio podem assumir a mesma função. O ferro e o manganês são importantes oligoelementos no metabolismo respiratório. O zinco afeta a síntese de proteínas sendo um oligoelemento cujo controle é importante para que não existam problemas de fermentação. Por norma, é recomendável cerca de 0,10 a 0,15 mg de zinco/L [18].

Como o sumo de maçã possui baixos teores de sais minerais, o potássio, o magnésio, o cálcio e o fósforo, apresentam-se como os principais componentes inorgânicos do sumo de maçã. Geralmente, o sumo de maçã possui estes elementos inorgânicos em concentrações suficientes, contudo, deficiências num composto pode afetar a progressão normal da fermentação. O fosfato é com alguma frequência adicionado à sidra, uma vez que é um nutriente em deficiência no sumo de maçã [10].

1.4.2. Temperatura

A temperatura de fermentação afeta diretamente a taxa de crescimento das leveduras e consequentemente a duração da fermentação alcoólica [45]. Este fator leva também a alterações nas reações bioquímicas e metabólicas das leveduras, afetando as propriedades organoléticas e químicas do produto. Isto deve-se à formação de metabolitos secundários como glicerol, ácido acético, ácido succínico e acetaldeído [46].

As temperaturas de fermentação podem ser agrupadas em três perfis diferentes de acordo com a sua cinética de fermentação [46]. Na **figura 6** podemos observar a variação do crescimento populacional das leveduras durante a fermentação alcoólica a diferentes temperaturas. As fermentações a 15 e 20°C começam mais lentamente, mas apresentam uma maior fase de latência e uma menor taxa de fermentação máxima, especialmente a 15°C. Isto causa um atraso na obtenção da população máxima, mas, uma vez alcançada, estes valores elevados são mantidos durante todo o processo. Possuem uma fase estacionária longa e não ocorre uma fase de declínio. As fermentações a estas temperaturas originam produtos com maior intensidade de aroma, uma vez que um maior tempo de fermentação permite uma degradação mais eficaz dos açúcares presentes no mosto. Uma fermentação lenta e controlada é considerada como necessária à obtenção de uma sidra de qualidade. As fermentações a 25 e

30°C atingem populações máximas semelhantes, mas as suas taxas iniciais de fermentação foram mais rápidas do que a baixas temperaturas. Após o oitavo dia de fermentação, a população diminui, pois ocorre uma fase de declínio. Por fim, as fermentações a 35°C não apresentam fase de latência, mas apresentaram uma rápida fase exponencial, atingindo a mesma população máxima que os perfis anteriores. No entanto, a fermentação prossegue com uma fase estacionária muito curta e a fase de declínio começa no sexto dia de fermentação, atingindo valores muito baixos no final do processo. As fermentações a altas temperaturas precisam de mais tempo para consumir todos os açúcares disponíveis, pois embora estas fermentações tenham começado mais rapidamente, a maior morte celular pode causar uma diminuição final no uso de açúcares disponíveis.

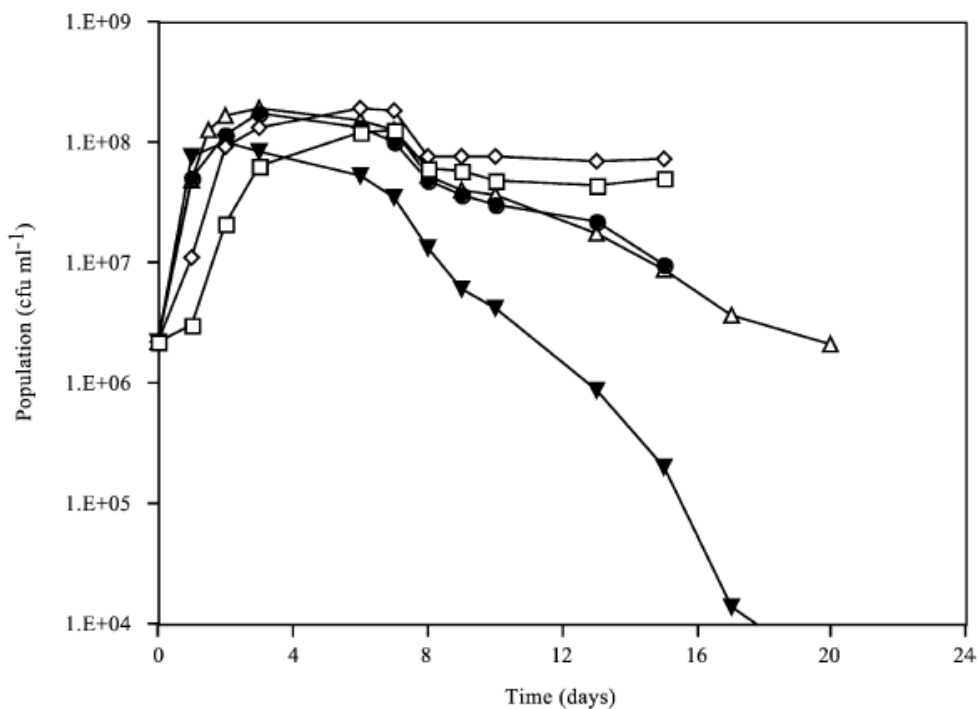


Figura 6 - Variação do crescimento populacional das leveduras durante a fermentação alcoólica em diferentes temperaturas: □15°C, ◇20°C, ●25°C, △30°C, ▼35°C.

1.4.3. pH

O pH do mosto é outro fator importante no crescimento da levedura. O sumo de maçã tem um pH mais baixo que o mosto da cerveja, entre 3,0-3,8 [10], pelo que é necessário ter em atenção quais os parâmetros de tolerância da levedura utilizada. Um pH muito abaixo de 2,8

diminui a taxa de crescimento da *S. cerevisiae*, devido ao aumento da toxicidade do etanol [47]. Num estudo recente, *Arroy-López et al.* [45], verificaram que o aumento do pH do mosto de 2,24 para 4,76, provocou um aumento na taxa de crescimento de *S. cerevisiae* T73.

1.4.4. Inoculação e seleção de leveduras

Na sidra tradicional, nenhuma fonte externa de levedura é adicionada. Os produtores de sidra tradicional fazem uso das leveduras existentes à superfície da maçã, aproveitando a sua diversidade na ocorrência natural de fermentações espontâneas. Nestas fermentações, as leveduras desenvolvem-se de um modo sequencial, a diferentes velocidades, começando após algumas horas se a temperatura for superior a 10°C, dominando no final as espécies mais resistentes às condições adversas da fermentação [10].

Dada a microflora interna das maçãs, esta contribui para uma maior diversidade de sidras, assim como das características do produto final. Inúmeros estudos têm vindo a ser feitos ao longo dos anos, de forma a identificar as principais espécies presentes na maçã. Entre elas estão a *Candida pulcherrima* (agora conhecida como *Metschnikowia pulcherrima*), espécies de *Pichia*, *Torulopsis*, *Hansenula* e *Kloeckera apiculata*. Fermentadores fortes como *Saccharomyces cerevisiae (uvarum)* não se mostrou como um dos principais constituintes da microflora natural das maçãs, e a sua presença no sumo da maçã, deveu-se sobretudo à contaminação dos panos de prensa e do equipamento industrial onde este inóculo tem tendência a persistir intermitentemente ao longo do tempo [48].

Assim, numa fermentação tradicional de sidra, onde não se adiciona levedura ou onde não ocorre o uso de sulfitos, os primeiros dias são dominados pelas leveduras não-*Saccharomyces*, que se multiplicam rapidamente, produzindo uma grande quantidade de gás e álcool. Estas leveduras geram também uma gama distinta de sabores e compostos, como o acetato de etilo, butirato e ésteres relacionados. À medida que os teores de álcool aumentam, estes fermentadores iniciais começam a morrer e a sucessão microbiana é assumida pelas *Saccharomyces uvarum* que completa a conversão de todo o açúcar em álcool, gerando um aroma com algumas características do vinho. Uma vez esgotado todo o açúcar disponível, o nível final de álcool é pouco provável que exceda os 8%, o que pode deixar o produto suscetível à ação de leveduras aeróbias, como a *Candida* e *Pichia*, que podem converter o álcool em CO₂ e água e levando à possível infeção bacteriana. Se for adicionado SO₂ ao sumo inicial, as

leveduras não-*Saccharomyces* e a maioria das bactérias são suprimidas ou mortas. Isto permite à levedura *Saccharomyces* spp. multiplicar-se após uma fase *lag* de vários dias, prosseguindo a fermentação com uma microflora mais homogênea do que num sumo onde não foram adicionados sulfitos [10].

No entanto, há que realçar as inúmeras desvantagens de um processo deste tipo, como as fermentações espontâneas, que são muito difíceis de controlar. O esgotamento de açúcares nem sempre é atingido num tempo razoável, com os riscos que daí podem advir, nomeadamente alterações microbiológicas indesejáveis. Para além disso, as leveduras diferem bastante na capacidade de produzirem metabolitos interessantes e/ou indesejáveis. Num processo pouco controlado, como é o caso das fermentações espontâneas, o risco de haver produção de maus odores pela presença de microrganismos indesejáveis é bastante maior [48].

Hoje em dia, a aplicação de leveduras *S. cerevisiae* selecionadas é uma prática cada vez maior nos grandes produtores de sidra, pois permite obter um produto com a qualidade desejada, assegurando um início de fermentação mais rápido e uma maior facilidade de controlo e homogeneidade das fermentações de uma forma mais regular. As estirpes tipicamente utilizadas são "Uvaferm" CM e BC (uma *S. cerevisiae* de vinhas alemãs e Champagne *S. bayanus*, respetivamente), "Lalvin" ECII18 (outra Champagne *S. bayanus* com fator assassino) e "Siha 3" (*S. Cerevisiae* de uma vinha alemã). A utilização de um inóculo misto de *S. uvarum* e *S. bayanus* é uma prática generalizada, uma vez que a primeira levedura proporciona um início rápido, mas a segunda irá atuar lidar melhor com a fermentação dos açúcares restantes, uma vez que é mais tolerante a maiores concentrações de etanol. Estas leveduras secas não requerem uma pré-propagação, sendo simplesmente hidratadas em água morna antes de serem inoculadas no sumo. As culturas mistas selecionadas têm vindo a ganhar cada vez maior importância, sendo frequentemente utilizadas com vista a tirar vantagens do processo fermentativo. A título de exemplo, a probabilidade de ocorrerem amuos de fermentação pela utilização de uma levedura não-*Saccharomyces* frutofilica com uma levedura *S. cerevisiae* glucofilica é menor, uma vez que, há um consumo complementar de glucose e frutose [49].

Contudo, é preciso ter em atenção as interações metabólicas e fisiológicas entre estirpes de *S. cerevisiae* e estirpes de não-*Saccharomyces*, quando na seleção de culturas *starter* mistas, uma vez que, ao interagirem, estas leveduras podem produzir compostos imprevisíveis ou

níveis indesejáveis de produtos de fermentação, que podem afetar a composição química e aroma da sidra [10].

1.5. Aplicações na valorização do retentato

A indústria de processo de maçãs sofreu um enorme crescimento nos últimos anos, tendo em 2008/2009 a produção de maçãs a nível mundial ultrapassado os 69 milhões de toneladas. Este crescimento trouxe também o aumento de resíduos agroindustriais como o bagaço da maçã e o retentato, sendo gerados milhões de toneladas destes subprodutos (25-30% de resíduos sólidos de bagaço e 5-10% de retentato) [50].

A eliminação direta destes resíduos agroindustriais para o meio ambiente representa um tema relevante para a poluição ambiental e também uma importante perda de biomassa que poderia ser utilizada para a fabrico de produtos de elevado valor comercial. A produção sustentável de alimentos e a valorização de subprodutos da indústria agroalimentar apresenta-se nos dias de hoje como uma questão importante para estas indústrias [17]. O bagaço da maçã e o retentato são subprodutos ricos em hidratos de carbono e outros nutrientes vitais, possuindo elevados níveis de percentagem de água (70-75% no bagaço da maçã e 90-95% no retentato), tornando a carga orgânica biodegradável altamente suscetível ao ataque microbiano. Por esta razão, não podem ser diretamente despejados para o meio ambiente [17].

Atualmente, estes subprodutos são tratados de forma tradicional, tais como despejo em aterros sanitários, incineração, compostagem, alimentação animal de baixa qualidade e espalhamento de terras. O despejo destes subprodutos pode ter vários efeitos adversos:

- Produção de gases de efeito estufa;
- Emissão de cheiros desagradáveis devido ao ataque microbiano, resultando na contaminação de lençóis subterrâneos;
- Efeitos negativos sobre a saúde humana, uma vez que os aterros e a dispersão das terras podem criar fontes de propagação de doenças humanas;
- Pouca rentabilidade das indústrias, devido aos custos de tratamento destes resíduos e aos custos de transporte para descarga em aterros [17].

A biotecnologia ambiental tem surgido como uma boa opção para enfrentar os desafios que estes resíduos agroindustriais têm apresentado às indústrias. A utilização de resíduos

agroindustriais para a produção de bioprodutos valiosos através da fermentação microbiana tem-se mostrado economicamente importante e pode minimizar vários riscos ambientais [16], [17], [50]–[52].

O bagaço da maçã tem sido utilizado na produção de ácidos orgânicos [51], [53], [54], compostos de aroma [55], bioetanol [56]–[58], enzimas [59], [60], cogumelos comestíveis [61], fibras comestíveis [58], [62], recuperação de pectinas [63], antioxidantes naturais [64], [65], alimentos ricos em proteínas [66], [67] e dietas para insetos [68]. O retentato, como referido anteriormente, é um subproduto que só nos últimos anos começou a despertar o interesse das indústrias, pelo que tem sido pouco explorado, para além da produção de ácido cítrico [17], [50]–[52], [69], da produção de enzimas lenhínicas e libertação de compostos polifenólicos [16] e de dietas alimentares para insetos [17], [68].

1.5.1. Produção de Ácido Cítrico (AC)

O retentato tem sido utilizado na produção de ácidos orgânicos, como o ácido cítrico (AC), apresentando-se como um substrato ideal na propagação de diferentes microrganismos para a sua produção.

O ácido cítrico é um ácido carboxílico multifuncional com alto potencial no setor alimentar, farmacêutico e agrícola [50]. É um intermediário metabólico natural, não tóxico, biodegradável, biocompatível e por isso considerado uma substância química com numerosas aplicações. No entanto, a redução dos preços, custos de energia e de matérias-primas transformou este mercado, outrora lucrativo, num não rentável. A busca por matérias-primas económicas, tem sido vital para reduzir o custo de produção do AC.

É neste contexto, que o retentato se apresenta como um substrato ideal de baixo custo para a bioprodução viável e sustentável de ácido cítrico. O seu pH (cerca de 3-3,5) torna-o adequado para a bioprodução de AC por estirpes *Aspergillus niger* (como *Aspergillus niger* NRRL 567 e NRRL 2001), conhecidas por metabolizarem uma elevada quantidade de AC em meios ácidos. Estudos já realizados mostraram que o retentato pode ser utilizado como um substrato para produção de AC sem qualquer pré-tratamento, ou necessidade de um suplemento nutritivo. Devido ao seu teor de hidratos de carbono e outros nutrientes vitais, o retentato mostrou-se um substrato adequado para utilização de *Aspergillus niger* em fermentações submersas [17], [50], [51], [52], [69].

1.5.2. Produção de enzimas lenhínicas e libertação de compostos polifenólicos

O fungo ligninolítico da podridão-branca, *P. chrysosporium*, consegue degradar a lenhina, celulose e hemiceluloses que podem ser assimilados para nutrição fúngica. A degradação é realizada por enzimas hidrolíticas extracelulares (celulases e hemicelulases) e oxidativas (lenhínicas) [16]. As enzimas lenhínicas têm mostrado grande potencial em aplicações industriais, como o branqueamento químico de pasta e de papel [70], descoloração de corantes [71], tratamento de águas residuais [71], solos contaminados [71] e síntese orgânica [72]. No entanto, a grande limitação para a aplicação industrial de enzimas fúngicas é o seu custo elevado associado às matérias-primas. Assim, é importante encontrar substratos baratos como uma alternativa às matérias-primas existentes para reduzir o custo de produção de enzimas lenhínicas.

Estudou-se a produção de enzimas lenhínicas e o perfil de viabilidade de *P. chrysosporium* durante a fermentação em estado líquido do retentato e do meio sintético. A fase *lag* deste fungo foi maior no meio sintético (66h) em comparação com o retentato (30h). A fase exponencial foi mais longa no retentato (mais de 50h) do que no meio sintético. Isto pode ser explicado pela disponibilidade de nutrientes (especialmente, açúcar) no retentato. De acordo com este estudo, as atividades máximas totais das enzimas lenhínicas foram obtidas durante a fase estacionária e fase de declínio do crescimento microbiano, uma vez que estas enzimas são metabolitos secundários libertados por fungos de podridão-branca na madeira [16]. O teor de polifenóis nos extratos de acetona e etanol do retentato por fermentação líquida foi mais elevado no extrato de acetona do que no etanol. O conteúdo de polifenóis no retentato aumentou lentamente, aproximadamente 1,5 vezes até 67h de fermentação. Após 67h de fermentação, o teor de polifenóis diminuiu. Este aumento durante a fase exponencial pode justificar-se pela libertação de fenóis livres causados pela produção de enzimas metabólicas de hidratos de carbono, como a β -glucosidase [73] e a diminuição durante a fase estacionária pela polimerização e lenhificação dos polifenólicos libertados [74].

O retentato apresentou-se como um substrato alternativo na fermentação submersa por *P. chrysosporium* para produzir enzimas com extração simultânea de compostos polifenólicos [16].

1.5.3. Dietas alimentares para insetos

A Mariposa-das-maçãs, (*Cydia pomonella*), é uma praga que afeta uma grande variedade de frutos, como a maçã, a pêra, a ameixa, a noqueira, e o pêssego. Os danos cominados aos frutos podem ser consideráveis (até 80% de maçãs infestadas se não forem tratadas). Tradicionalmente, o controlo dos frutos tem sido realizado através do uso de pesticidas químicos com alguns impactos adversos, como a perda de polinizadores, a presença de resíduos inseticidas e consequências ambientais. Devido a estes impactos, os agricultores têm procurado novas tecnologias mais seguras para manter o controlo das populações de Mariposa-das-maçãs. Atualmente, são praticadas diferentes tecnologias como o uso de reguladores sintéticos seletivos do crescimento de insetos, agentes de controlo biológico, como a utilização de *Bacillus thuringiensis*, entre outras práticas [17].

No entanto, o uso destas tecnologias tem-se mostrado pouco promissor no controlo desta praga devido ao desenvolvimento de resistência a estas práticas. Os biopesticidas à base de Baculovírus são preparados infetando larvas de Mariposa-de-maçã cultivadas em dietas específicas. O custo destas dietas é muito alto, limitando o crescimento de biopesticidas à escala comercial.

É neste contexto que entra a utilização do retentato como meio nutritivo. Esta dieta é constituída principalmente por nutrientes sintéticos ou semi-sintéticos, das plantas ou animais, que são vitais para a nutrição do inseto [68]. Embora os insetos sejam capazes de sintetizar alguns dos nutrientes desejados para o seu crescimento, outros são exclusivamente fornecidos pela dieta. A dieta existente contém nutrientes essenciais, tais como água, inibidores de crescimento microbiano, proteínas, hidratos de carbono, lipídios, vitaminas, sais, minerais e esteróis. Alguns destes nutrientes sintéticos podem ser substituídos por nutrientes presentes no retentato ajudando a reduzir os custos de produção. Recentemente, demonstrou-se o potencial do retentato para a preparação de dietas para insetos. Foi realizado o estudo reológico da dieta utilizando resíduos agroindustriais, como o retentato e águas residuais da produção de cerveja, para se obter uma dieta mais adequada, com nutrientes para o crescimento de larvas de Mariposa-de-maçã. Os resultados demonstraram a capacidade nutritiva do retentato como importante e até indispensável para a substituição ou suplementação de nutrientes sintéticos na dieta padrão para a reprodução de larvas [68].

2. OBJETIVOS DO TRABALHO DE ESTÁGIO

A sidra é uma bebida obtida a partir da fermentação da maçã, com teor alcoólico entre os 5 e 7% de volume. Atualmente, os países com produção mais significativa de sidra na Europa são a França, Espanha, Bélgica e Reino Unido. Portugal não é um país com tradição no consumo de sidra, não faz parte da sua cultura, sendo consumida principalmente por turistas. Por outro lado, Portugal é um produtor de concentrado de sumo de maçã, que pode ser utilizado na produção de sidra. Assim, a sidra apresenta-se como um potencial inexplorado em vários mercados, com um reduzido número de concorrentes, pelo que o lançamento de uma nova sidra no mercado português se poderá mostrar uma boa aposta no mercado das bebidas alcoólicas que utilizem produtos nacionais.

O presente trabalho de estágio teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma sidra a partir da fermentação do concentrado de sumo de maçã e do retentato, um subproduto da indústria agroalimentar, pretendendo-se também promover a sua valorização.

Porém, o concentrado de sumo de maçã tem carência em aminoácidos e minerais essenciais ao metabolismo das leveduras na fermentação do açúcar. Assim, um dos objetivos da utilização do retentato foi criar um meio nutritivo, rico em aminoácidos e minerais, adequado ao crescimento da levedura no mosto de maçã.

Aliado a este objetivo esteve também o estabelecimento das bases biotecnológicas que permitiram desenvolver metodologias e processos para a produção de sidra e a garantia da sua qualidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostragem

3.1.1. Concentrado de sumo de maçã

O concentrado de sumo de maçã utilizado para a produção de sidra foi fornecido pela Indumape, Industrialização de Fruta S.A.. Na **tabela 4** encontram-se os lotes utilizados para cada produção e as respetivas especificações técnicas. Apenas um lote de concentrado de sumo de maçã foi utilizado na produção nº1, uma vez que foram produzidos apenas 1000 L de sidra. Na produção nº2 e nº3 foi necessário o uso de dois lotes por produção, pois foram produzidos 2000 L de sidra em cada uma.

Tabela 4 - Lotes e especificações técnicas do concentrado de sumo de maçã

	Data de Prod.	Peso Líquido	°Brix corrigido	Acidez em Málico	Temp. Conservação	Val.	Sidra
Lote E16AJC034	10-02-17	277 kg	70,3	1,64%	<10°C	18 meses	Produção nº 1
Lote E16AJC047	20-04-17	275 kg	70,2	1,75%	<10°C	18 meses	Produção nº 2
Lote E16AJC055	05-05-17	270 kg	70,2	1,61%	<10°C	18 meses	Produção nº2
Lote E16AJC067	11-07-17	275 kg	70,2	1,59%	<10°C	18 meses	Produção nº3
Lote E16AJC71	19-07-17	270 kg	70,2	1,63%	<10°C	18 meses	Produção nº3

3.1.2. Retentato

O retentato utilizado para a produção de sidra foi igualmente fornecido pela Indumape, Industrialização de Fruta S.A. Na **tabela 5** encontram-se os lotes utilizados para cada produção e as respetivas especificações.

Tabela 5 - Especificações técnicas do retentato

	Data de Prod.	Peso Líquido	Densidade	Brix	Acidez	pH	Sidra
Bidon 1	10-02-17	235 kg	~1,18	16,50	4,30%	3,62	Produção nº 1
Bidon 2	31-05-17	235 kg	~1,18	18,40	4,29%	3,63	Produção nº 2
Bidon 3	11-07-17	235 kg	~1,18	18,35	4,30%	3,60	Produção nº 3

3.1.3. Malte

O malte utilizado na formulação do meio nutritivo foi estilo *Pilsen* e foi fornecido pela Maltibérica-Sociedade Produtora de Malte S.A.

3.2. Formulação do meio nutritivo

3.2.1. Otimização da composição do meio nutritivo

A composição química do concentrado de sumo de maçã apresenta algumas carências a nível nutricional. Apesar de ser um substrato rico em açúcares, nomeadamente frutose e glucose, em ácidos orgânicos e compostos fenólicos, as suas concentrações de aminoácidos e minerais nem sempre se apresentam como ideais para uma boa fermentação.

Os teores de proteína no retentato rondam à volta dos 28,8-33,8 g/L, enquanto que o valor total de aminoácidos presentes no concentrado de sumo da maçã é 0,583 g/mL. Os valores considerados ideais são 0,5-2 g/mL. Apesar do valor apresentado estar dentro do mínimo aconselhado, maiores concentrações de aminoácidos beneficiam uma fermentação eficiente por parte das leveduras. Deste modo, promoveu-se uma hidrólise das proteínas presentes no retentato de modo a obter um mosto rico em aminoácidos essenciais ao crescimento da

levedura. Esta hidrólise foi realizada com as enzimas proteolíticas presentes no malte de cevada, sob condições ótimas de atividade para as enzimas.

3.2.1.1. Rácio

De modo a tentar encontrar-se a melhor proporção entre a quantidade de malte a utilizar e a quantidade de retentato, fizeram-se duas experiências com diferentes rácios. Na primeira experiência foi utilizado um rácio de 1:1 (0,5 kg de malte e 0,5 kg de retentato), e na segunda experiência um rácio de 1:10 (0,5 kg de malte e 5 kg de retentato). O uso de malte na hidrólise de proteínas é uma necessidade inerente à atividade das enzimas proteolíticas nele presentes. Encontrar um rácio que permita o uso mínimo de malte, mas que não comprometa a eficiência da hidrólise era importante, pois o seu uso encarece o produto final.

3.2.1.2. Tempo

As duas primeiras experiências decorreram ao longo de 180 minutos. O objetivo foi avaliar o tempo máximo cuja atividade das proteases é maior. Em contexto empresarial, o tempo de duração de um processo, onde há gastos de energia, é um fator relevante. Por isso, foi importante perceber, qual seria o tempo necessário para as enzimas efetuarem a hidrólise enzimática, e de que maneira se poderia ajustar essa duração aos interesses da empresa.

3.2.1.3. Temperatura

A hidrólise ocorreu a uma temperatura entre os 45 e 50°C, temperatura ótima para atividade das proteases presentes no malte de cevada.

3.2.2. Análise de aminoácidos livres por qGC-MS

De modo a poder-se quantificar os aminoácidos livres provenientes da hidrólise das proteínas, foi pesado cerca de 10 mg de cada amostra recolhida e posteriormente solubilizadas em 2 mL de tampão de fosfato a 50 mmol/L pH 7,0.

A 600 µL de solução contendo os aminoácidos, foram adicionados 400 µL de etanol absoluto e 100 µL do padrão interno, L-norleucina (0,1 mg/mL). Em seguida, foram adicionados 100 µL de piridina e 50 µL de cloroformato de etilo. A mistura foi depois submetida a um banho

de ultra-sons, durante 60 segundos a 20°C. Após este período, adicionaram-se 300 µL de clorofórmio seguido da adição de 100 µL de NaOH 7 mol/L e 50 µL de cloroformato de etilo.

As fases foram misturadas num *vortex* durante 30 segundos e a separação de fases foi promovida por centrifugação durante 3 min a 3000 rpm. A fase aquosa foi removida e foram adicionados 100 mg de sulfato de sódio anidro à fase orgânica para remoção da água remanescente. A fase orgânica foi depois analisada por qGC-MS com recurso a um cromatógrafo Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra, equipado com uma coluna capilar DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura). A amostra foi injetada no injetor com um split de 5 min a 250 °C. O programa de temperaturas utilizado foi: temperatura inicial de 70 °C a 10 °C/min até 260 °C e 20 °C/min até 300 °C permanecendo durante 10 min. O GC está conectado com um detetor de massa quadruplo. Os aminoácidos foram quantificados tendo em conta os fatores de resposta de cada aminoácido.

3.3. *Scale-up* do meio nutritivo

Após a realização das experiências preliminares, fez-se um *scale-up* industrial do rácio que melhores resultados obteve na hidrólise de proteínas – rácio 1:10. De modo a preparar um meio rico em nutrientes essenciais ao crescimento das leveduras e à produção de sidra, foram utilizadas as quantidades apresentadas na **tabela 6**. A hidrólise das proteínas ocorreu a uma temperatura entre os 45 e 50°C, temperatura ótima para atividade das proteases, durante 30min. Em cada uma das produções foram retiradas amostras aos 0min, 15min e 30min, as quais foram posteriormente congeladas e liofilizadas.

Tabela 6 - Quantidades de malte, concentrado e retentato utilizados nas três produções.

Produção nº1			Produção nº2			Produção nº3		
Malte	Concentrado	Retentato	Malte	Concentrado	Retentato	Malte	Concentrado	Retentato
20kg	200L	200L	20kg	350L	200L	20kg	350L	200L
Volume final: 1000L			Volume final: 2000L			Volume final: 2000L		

3.4. Processo fermentativo

3.4.1. Estirpe de levedura

Para a fermentação da mistura base, retentato mais concentrado de sumo de maçã, utilizaram-se leveduras *lager (saflager w-34/70)* da Fermentis, com uma temperatura de fermentação ideal entre 12-15°C. Esta estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* é de origem alemã e é utilizada mundialmente na indústria cervejeira. É conhecida por produzir cervejas com bom equilíbrio e aromas florais e frutados.

3.4.2. Inoculação e condições de fermentação

A inoculação das leveduras ocorreu a uma temperatura próxima dos 12°C. Ambas as estirpes inoculadas nas produções tinham realizado um ciclo fermentativo antes de serem utilizadas. A fermentação foi mantida a esta temperatura durante 1 semana. No final da fermentação, a temperatura foi reduzida até 4°C, permitindo a sedimentação da levedura e posterior decantação.

3.4.3. Monitorização da fermentação

Na monitorização das fermentações foram tidos em conta diversos parâmetros, nomeadamente o teor de sólidos solúveis (°Brix) e a percentagem de etanol. A fermentação foi acompanhada diariamente, sendo o mosto em fermentação analisado, após uma pequena purga, para avaliar o processo fermentativo das leveduras.

3.5. Caracterização do produto final

3.5.1. Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram calculados com base no método de *Sengupta et al.* [75], utilizando o reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Primeiramente preparou-se uma solução-mãe de frutose. Pesaram-se 200 mg de frutose, as quais se transferiram para um balão volumétrico de 20 mL, e fez-se o volume com água destilada. A partir da solução-mãe, de concentração 20 mg/mL, preparou-se outra solução de frutose de concentração 2 mg/mL. A partir desta solução final, prepararam-se diversas soluções com concentrações variando entre 0,02 mg/mL e 0,2 mg/mL.

Posteriormente, transferiu-se uma amostra de 1 mL, para tubos de ensaio, e adicionou-se 1 mL de reagente DNS. Os tubos foram incubados a 100°C em banho-maria durante 5 min. A absorvância foi registada a 540 nm.

3.5.2. Determinação da concentração de Etanol

A quantificação da concentração de etanol presente na sidra foi determinada através de dois métodos. Um método utilizado durante as produções da sidra, na empresa, onde se efetuava a medição da densidade do mosto ao longo da fermentação, através de um hidrómetro. E um segundo método realizado na Universidade de Aveiro, onde se determinou de forma mais exata a concentração de etanol através de cromatografia em fase gasosa - deteção de ionização de chama (GC-FID), usando o método de HS-SPME.

Método do Hidrómetro (Empresa)

Este método utilizado durante as produções de sidra, consistia na medição da densidade ao longo da fermentação, através de um hidrómetro, aplicando-se posteriormente a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Álcool por volume} = (\text{Densidade Inicial} - \text{Densidade Final}) \times 131,25$$

Em que,

Densidade Inicial corresponde à densidade do mosto antes da fermentação, e a *Densidade Final* corresponde à densidade do mosto no final da fermentação, ou durante a fermentação, permitindo o acompanhamento da sua progressão. A leitura da gravidade muda ao longo da fermentação uma vez que os açúcares fermentáveis no mosto vão sendo consumidos pelas leveduras e convertidos em etanol (que tem uma densidade mais baixa do que a água) e dióxido de carbono.

O fator de multiplicação *131,25* deriva de dois fatores:

- a) **1,04678** que representa o rácio entre a quantidade de moléculas de etanol produzidas por cada molécula de CO₂ gerada;

$$\frac{46,07 \text{ g/mol de } C_2H_6O}{44,01 \text{ g/mol de } CO_2} = 1,04678$$

b) **0,78934** que representa a densidade específica de uma solução 100% de etanol;

Assim a fórmula anteriormente simplificada deriva da seguinte equação:

$$\% \text{ Álcool por volume} = \frac{1,04678}{0,78934} \times (\text{Densidade Inicial} - \text{Densidade Final}) \times 100$$

Metodologia de HS-SPME/GC-FID (Universidade de Aveiro)

Após a obtenção do produto final foi efetuada uma cromatografia em fase gasosa - deteção de ionização de chama (GC-FID), usando a metodologia de HS-SPME, para determinar de forma mais rigorosa a concentração de etanol.

Foram recolhidas amostras das duas primeiras produções de sidra. Estas amostras sofreram uma diluição de 1:1000 antes do procedimento de micro-extração do etanol. A micro-extração do etanol decorreu em frascos de vidro transparente de 7 mL, com um volume total de amostra de 3 mL, misturado com 0,6 g de NaCl. O NaCl foi colocado em primeiro lugar, com o auxílio de uma balança, seguido da amostra.

Os frascos foram selados com septos de PTFE/silicone e imersos num banho de água mantido a $40 \pm 2^\circ \text{ C}$. A fibra de SPME (DVB/Carboxen/PDMS) foi então exposta ao espaço de cabeça da amostra durante 20 minutos. A temperatura do banho usado para aquecer a amostra e espaço de cabeça foi controlada termostaticamente. A agitação foi mantida a 600 rpm ao longo de toda a extração. Foi mantida uma distância de aproximadamente 0,5 cm entre a fibra e a interface amostra/espaço de vapor ao longo de todas as micro-extrações realizadas. Decorrido o período de extração, a fibra foi recolhida e o suporte é retirado do frasco para se proceder à cromatografia. Foram feitos ensaios em duplicado a todas as amostras de sidra analisadas.

As análises foram efetuadas por GC-FID equipado com uma coluna 400-5HT (Quadrex, New Haven, CT, EUA) com $25 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,05 \mu\text{m}$ de espessura de filme. O programa de temperatura do forno utilizado foi: temperatura inicial de 60° C , mantendo esta temperatura 3 minutos, aumento da temperatura a uma taxa de 10° C/min até 130° C , e um aumento linear final de 40° C/min até 220° C , mantida durante 1 min. As temperaturas do injetor e do detetor foram,

respetivamente, 245 e 250°C. A taxa de fluxo do gás de arraste (H₂) foi ajustada em 1,2 mL/min. A concentração de etanol foi quantificada a partir de uma curva da calibração, a qual se elaborou recorrendo a uma gama de 5 padrões diferentes de etanol. Os padrões de etanol foram preparados a partir de uma solução mãe de etanol absoluto a 0,2%. As concentrações utilizadas para a elaboração da curva de calibração estão listadas na **tabela 7**:

Tabela 7 - Concentrações das diluições preparadas a partir da solução mãe.

Solução mãe		Curva de calibração		
[EtOH]initial (v/v)	0,2%	Vi (mL)	Vf (mL)	[EtOH (v/v)]
		0,025	3	0,002%
		0,050	3	0,003%
		0,075	3	0,005%
		0,100	3	0,007%
		0,150	3	0,010%

3.5.3. Análise Sensorial

De modo a tentar perceber qual a apreciação global da sidra por parte do consumidor português, foram realizadas três análises sensoriais, através do preenchimento de um inquérito. O primeiro inquérito (**anexo 1**) foi realizado no festival cervejeiro, *Oliva Beer Mind*, em São João da Madeira. O segundo inquérito (**anexo 2**) foi feito na Universidade de Aveiro, aos elementos do grupo de investigação QOPNA, onde se comparava a sidra da primeira produção com a sidra da segunda produção. O terceiro inquérito (**anexo 3**) ocorreu também na Universidade de Aveiro, no 12º Encontro Nacional – *Glupor-12*, onde se podia degustar uma terceira produção de sidra.

Nos inquéritos era pedido ao consumidor que atribuisse uma nota de 1 a 5, a parâmetros como o sabor (ácido ou doce) e o aroma a maçã, uma nota de 1 a 10 na avaliação global da sidra e por fim se consumiria o produto, estando este disponível no mercado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Formulação do meio nutritivo

A hidrólise das proteínas do retentato promovida pelas enzimas proteolíticas presentes no malte de cevada, permitiram obter um mosto rico em aminoácidos importantes para o crescimento das leveduras. Uma vez que os teores de proteína no retentato se encontram na gama dos 28,8-33,8 g/L, e o valor total de aminoácidos presentes no concentrado de sumo da maçã é de 0,583 g/mL, tentou-se formular um rácio com as quantidades adequadas de malte de cevada e retentato para colmatar a carência de aminoácidos no concentrado de sumo de maçã.

Foram realizadas duas experiências com rácios diferentes. A primeira com um rácio de 1:1 (0,5 kg de malte e 0,5 kg de retentato), e a segunda com um rácio de 1:10 (0,5 kg de malte e 5 kg de retentato). As experiências decorreram ao longo de 180 min, a uma temperatura entre 45 e 50°C, e retiraram-se amostras aos 30 e 180 min.

Pela **figura 7** pode-se constatar que o rácio 1:10 é o que nos permite obter uma concentração total de aminoácidos livres mais próxima da concentração considerada ideal para uma fermentação eficiente. Na primeira experiência a concentração total de aminoácidos atingiu um pico máximo de 0,221 mg/mL, e na segunda experiência a concentração total de aminoácidos atingiu os 0,393 mg/mL. Atendendo a que os valores considerados ideais estão entre 0,500-2,000 mg/mL, e considerando ainda o contributo que o concentrado de sumo de maçã dá ao meio (0,583 mg/mL), obteve-se uma concentração total final de aminoácidos livres de 0,986 mg/mL, criando assim um meio rico em aminoácidos benéfico para uma fermentação eficiente.

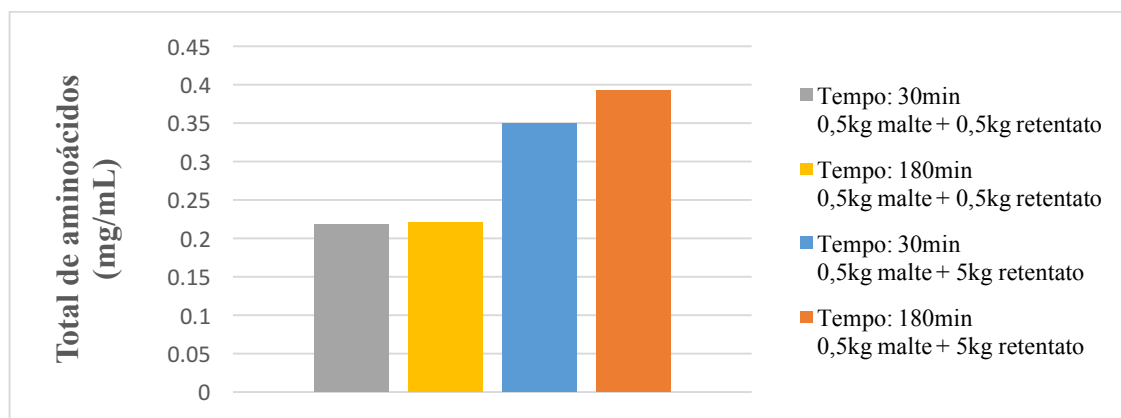


Figura 7 - Concentração total de aminoácidos presentes no retentato.

Pela **figura 8** pode-se constatar que através da hidrólise das proteínas do retentato se obteve um elevado número de aminoácidos livres. A tirosina foi o aminoácido maioritário, com uma concentração de 0,163 mg/mL, nestas duas experiências. Contudo, como pertence ao grupo de assimilação de aminoácidos C, não é dos mais rapidamente consumidos. Também se obtiveram muitos aminoácidos pertencentes ao grupo A e B. O processo de hidrólise permitiu a obtenção de ácido aspártico, glutamina e lisina (grupo A) em quantidades consideráveis, assim como valina, leucina e isoleucina (grupo B). O azoto é o principal nutriente limitante no crescimento das leveduras. Durante a fermentação, o conteúdo de azoto disponível é utilizado 80% pela levedura durante a sua fase *lag*, com o objetivo de estimular a produção de proteínas que têm um papel fundamental no transporte de açúcares. Apesar de não ter sido possível adquirir um perfil individual de cada aminoácido, o facto de se ter obtido maioritariamente aminoácidos do grupo de A e B, foi um bom indício para promover uma fermentação mais eficiente das leveduras.

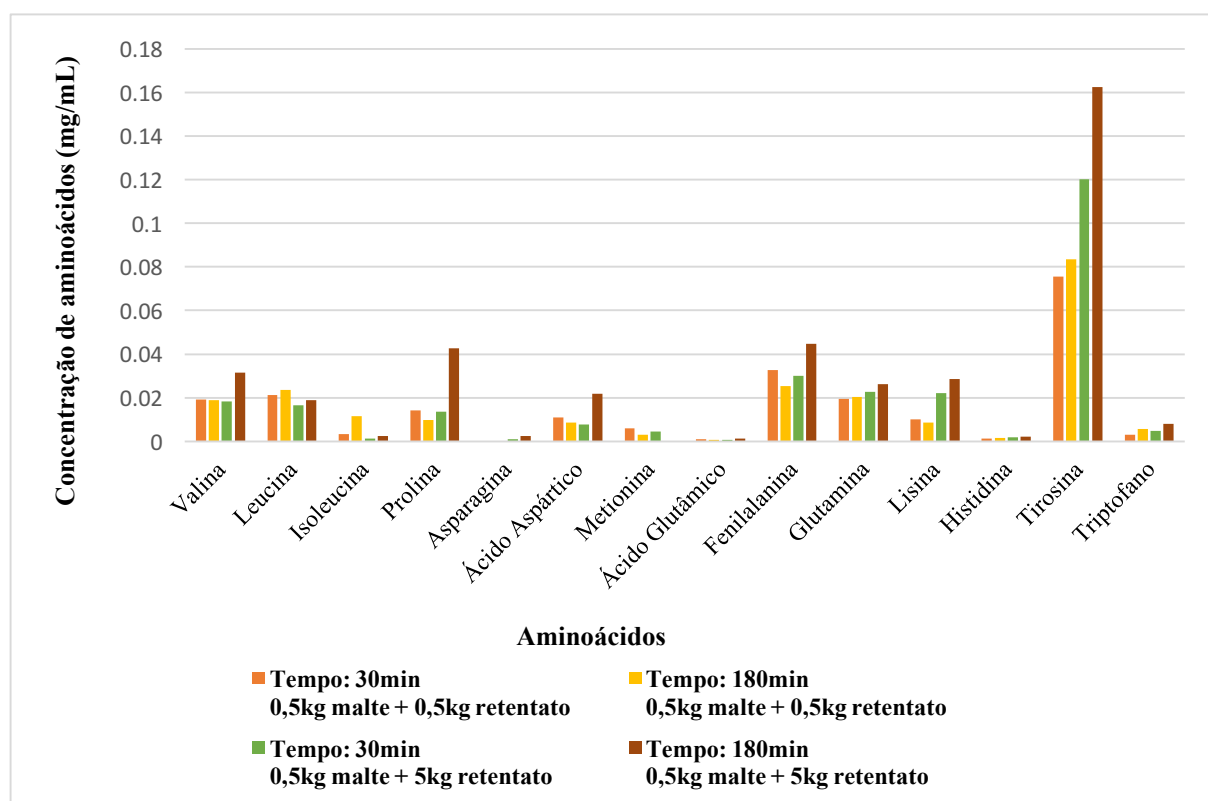


Figura 8 - Concentração de aminoácidos presentes no retentato.

4.2. Produção industrial de sidra

Uma vez escolhido o rácio mais adequado (1:10) para obter um meio nutritivo rico em aminoácidos, foi feito o *scale-up* industrial. Assim, aplicando o rácio das experiências iniciais para produção da sidra a uma escala industrial, foram utilizados 20kg de malte e 235kg de retentato.

Tabela 8 - *Scale-up* industrial das quantidades de malte, retentato e concentrado.

Produção n°1			Produção n°2			Produção n°3		
Malte	Concentrado	Retentato	Malte	Concentrado	Retentato	Malte	Concentrado	Retentato
20kg	200L	200L	20kg	350L	200L	20kg	350L	200L
Volume final: 1000L			Volume final: 2000L			Volume final: 2000L		

4.2.1. Caracterização do meio nutritivo

Feito o *scale-up* industrial, foi necessário avaliar se o rácio escolhido apresentaria os resultados esperados quando aplicado em maior escala.

Das duas produções realizadas, a primeira produção (S1) foi a que obteve resultados mais elevados e dentro daquilo que era expectável. Pela **figura 9** constata-se que na primeira produção (S1) se obteve uma concentração total de aminoácidos de 1,627 mg/mL e na segunda produção (S2) obteve-se 1,559 mg/mL de concentração total de aminoácidos no meio nutritivo. Cada um destes meios sofreu uma diluição diferente. Enquanto na primeira produção o meio nutritivo foi diluído 5 vezes, uma vez que se produziram 1000 L de sidra, na segunda produção o meio nutritivo foi diluído 10 vezes, para uma produção de 2000 L. Tendo em conta estas diluições e considerando a contribuição por parte do concentrado de sumo de maçã com aminoácidos livres para o meio nutritivo (0,583 mg/mL), obteve-se uma concentração total de aminoácidos na primeira produção de 0,908 mg/mL e na segunda produção de 0,739 mg/mL. Estes resultados encontram-se dentro dos valores considerados ideais para uma fermentação eficiente (0,500-2,000 mg/mL), pelo que se pode concluir que a hidrólise das proteínas do retentato contribuiu para um meio rico em aminoácidos.

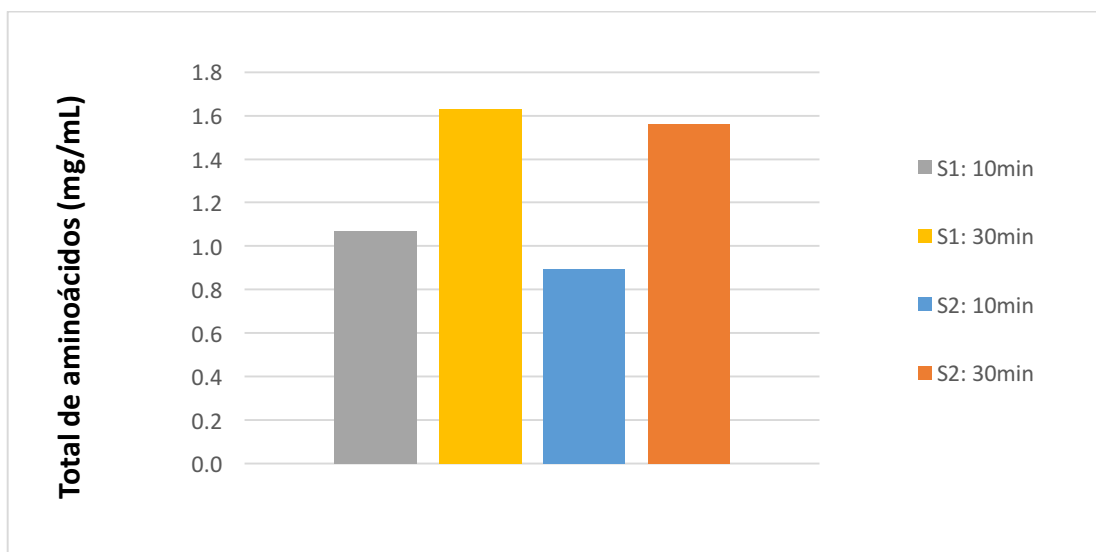


Figura 9 - Concentração total de aminoácidos presentes no retentato para a primeira e segunda produções de sidra a diferentes tempos de hidrólise.

Tendo em conta o perfil individual dos aminoácidos, a **figura 10** mostra que as quantidades obtidas para cada aminoácido foram elevadas. O ácido aspártico e a lisina, pertencentes ao grupo de assimilação de aminoácidos A, juntamente com a valina, leucina e isoleucina do grupo B, representam mais de 60% dos aminoácidos que são preferencialmente e mais rapidamente consumidos pela levedura. Este fator leva a que o consumo de aminoácidos seja mais rápido, uma vez que estão desde início disponíveis no meio, prontos a serem consumidos pela levedura. A disponibilidade destes aminoácidos inicialmente na fase *lag* leva a um maior crescimento das leveduras e resultando numa maior atividade metabólica, que se traduz em fermentações mais completas e em menor tempo [13], [76].

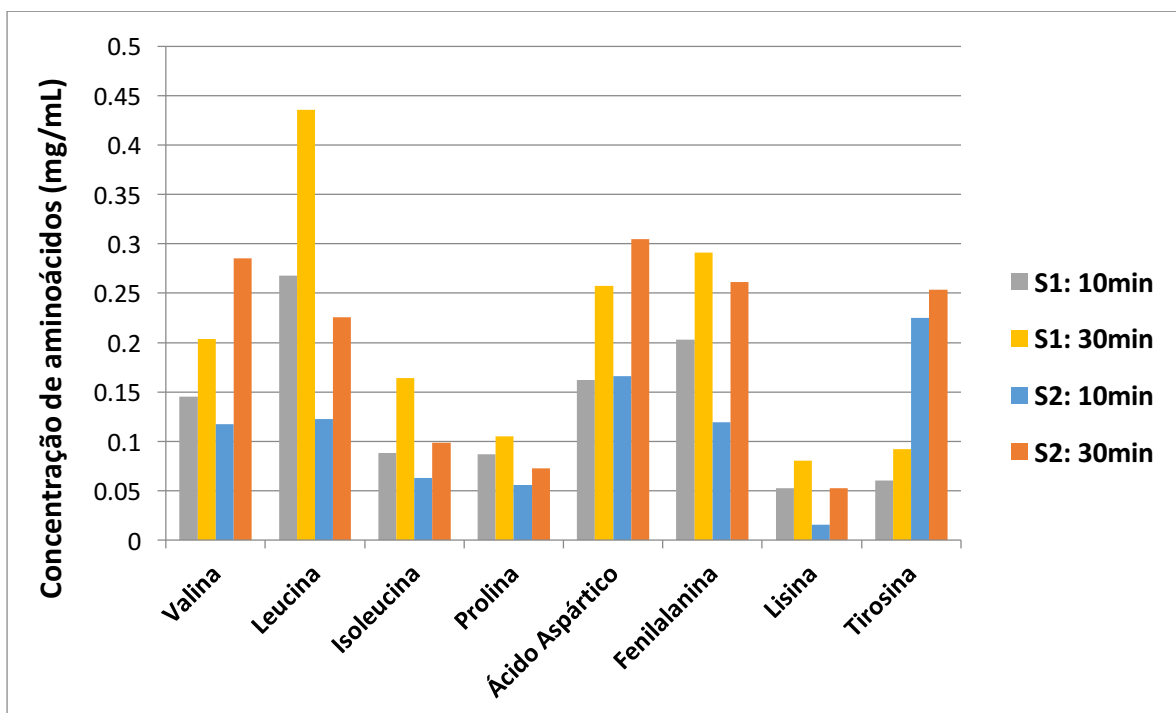


Figura 10 - Concentração de aminoácidos presentes no retentato para a primeira e segunda produções de sidra a diferentes tempos de hidrólise.

4.2.2. Processo fermentativo

4.2.2.1. Teor de sólidos solúveis totais (°Brix)

A escala Brix é utilizada na indústria dos alimentos para medir a quantidade aproximada de açúcares em sumos de fruta, vinhos e cerveja, bem como noutras soluções. A quantidade de compostos solúveis corresponde ao total de todos os compostos dissolvidos em água, como açúcares, sais e proteínas. Os valores de leitura medidos são a soma de todos estes compostos.

Atendendo à grande quantidade de açúcares presentes no mosto, que vão ser utilizados no processo de fermentação, esperava-se que os valores do °Brix diminuíssem com o progresso da fermentação. Como se pode constatar pela **figura 11**, há uma diminuição do °Brix ao longo do tempo, o que se pode concluir que a fermentação ocorreu de forma eficaz e constante. Em comparação com os tempos *standard* de fermentação da sidra (no mínimo 2 semanas) podemos considerar que a presença de um meio rico em aminoácidos beneficia o tempo de fermentação,

uma vez que em ambas as produções o °Brix tem tendência a estabilizar a partir do 8-10º dia, havendo assim uma redução do tempo de fermentação da sidra [10].

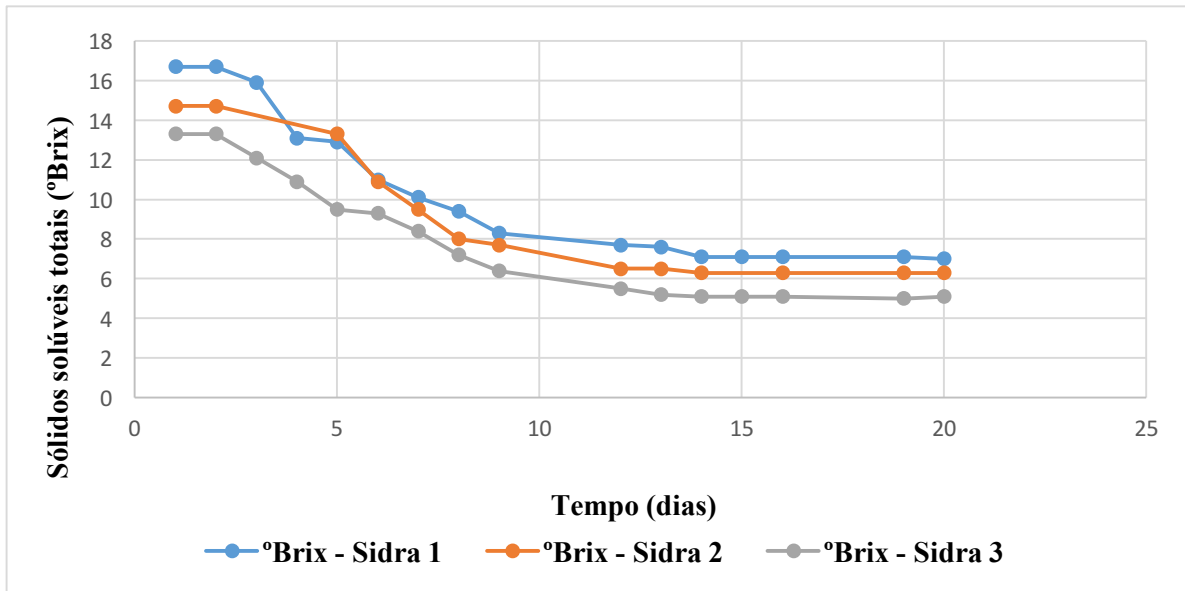


Figura 11 - Sólidos solúveis totais (°Brix) das Sidras 1, 2 e 3.

4.2.2.2. Percentagem de álcool

O teor alcoólico representa a percentagem de álcool num líquido. Este depende da eficácia da fermentação, ou seja, da capacidade das leveduras metabolizarem os açúcares do meio em etanol. Assim, na presença de uma fermentação eficaz, os níveis de teor alcoólico deverão subir à medida que o tempo progride.

A **figura 12**, referente às três produções de sidra, permite constatar que durante os primeiros 10 dias há um aumento do teor alcoólico. Este fator, aliado à diminuição do °Brix ao longo do tempo, significa que os açúcares foram metabolizados eficazmente pelas leveduras, levando à produção de dióxido de carbono e álcool. A partir do 8º/10º dia, como as quantidades de açúcar são cada vez mais reduzidas, a percentagem de álcool tende a estabilizar.

A presença de um meio nutritivo rico em aminoácidos ajudou a reduzir o tempo de fermentação, em comparação com a duração média da fermentação da sidra (2 semanas) [10].

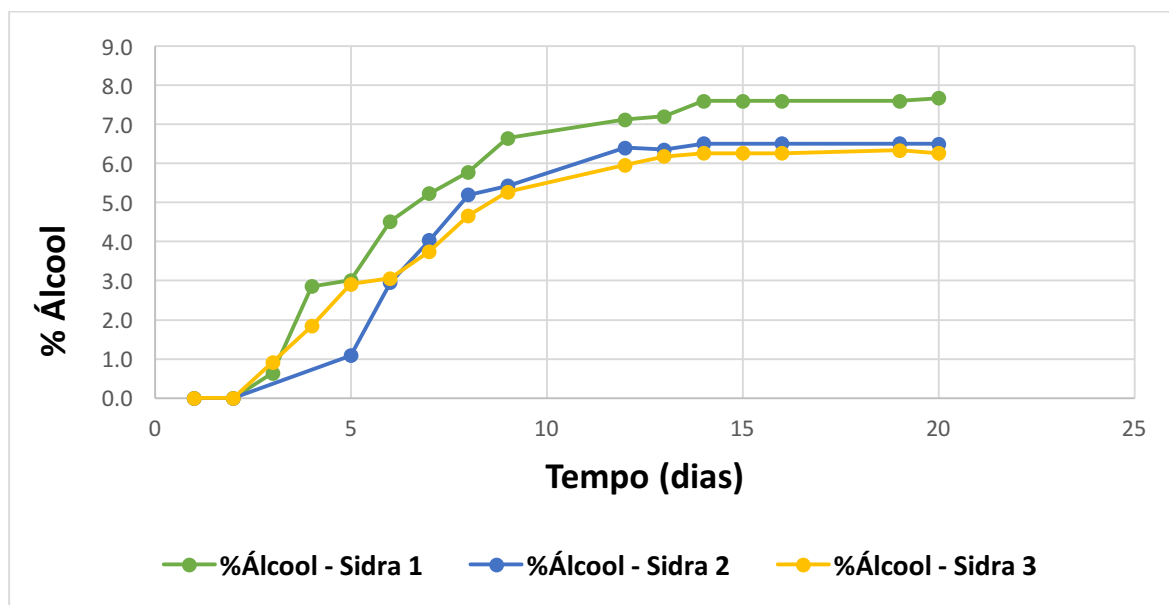


Figura 12 - Percentagem de álcool das Sidras 1, 2 e 3.

4.3. Análise produto final

4.3.1. Açúcares redutores

Uma vez que a escala Brix utilizada mede a quantidade de açúcares, e também de outros compostos solúveis, como sais e proteínas, era importante quantificar apenas os açúcares redutores. Deste modo, foi possível ter um valor exato da quantidade de açúcares dissolvidos, e se de facto a quantidade presente em cada sidra correspondia ao que os consumidores sentiam no seu paladar. Pela análise da **tabela 9** pode-se constatar que a quantidade de açúcares presente em cada uma das sidras é bastante aproximada ao valor de °Brix medido no laboratório da empresa através do refratómetro.

Tabela 9 – Sólidos solúveis totais (°Brix) e concentração de açúcares redutores.

	°Brix (g/100mL)	Açúcares Redutores (g/100mL)
Sidra 1	10,1	9,576
Sidra 2	8,7	8,694

4.3.2. Percentagem de etanol

A percentagem de etanol foi calculada ao longo das fermentações, através de um hidrómetro. Calculou-se a densidade inicial do mosto antes da fermentação, e eram feitas medições da densidade final ao longo do tempo de fermentação. No final era aplicada a fórmula descrita no **ponto 3.5.2**. Uma vez que este método se baseia em aproximações, era importante numa fase final do produto determinar-se a concentração de etanol efetivo. Como referido anteriormente, no **ponto 3.5.2**, as análises foram efetuadas por HS-SPME/GC-FID.

Como se pode observar na **tabela 10**, os valores da percentagem de etanol determinada por GC-FID, são bastante próximos dos valores obtidos pela fórmula aplicada para calcular a percentagem de álcool por volume.

Tabela 10 – Medição da % de etanol pelo método do hidrómetro e por HS-SPME/GC-FID

	% Etanol (Hidrómetro)	% Etanol (HS-SPME/GC-FID)
Sidra 1	5,24	5,37
Sidra 2	4,73	5,16

4.3.3. Análise Sensorial

1ª Produção de Sidra

A 1ª análise sensorial ocorreu nos dias 1 e 2 de abril, no festival cervejeiro, *Oliva Beer Mind*, em São João da Madeira. Às pessoas que consumiram a sidra foi-lhes pedido que realizassem um pequeno inquérito, para posteriormente se fazer uma análise da sua apreciação global à Sidra Vadia.

Foram inquiridas 65 pessoas, maiores de 18 anos, sendo 58% do sexo masculino e 42% do sexo feminino. As idades foram distribuídas em diferentes faixas etárias. Atendendo à temática do festival, uma vez que a cerveja artesanal apresenta preços mais elevados que uma cerveja industrial, era de esperar que as faixas etárias presentes fossem na sua maioria acima dos 25 anos, onde a probabilidade de terem mais recursos financeiros é maior.

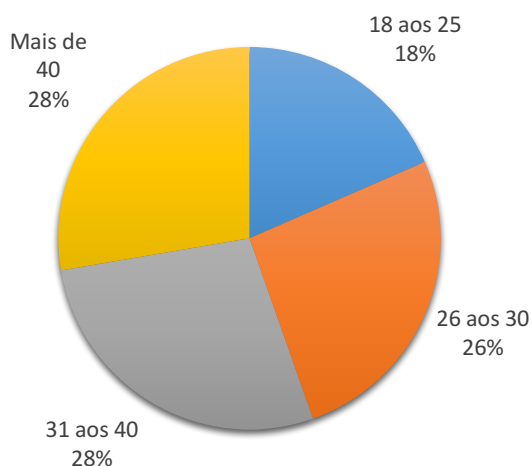


Figura 13 - Idades dos consumidores presentes na prova 1.

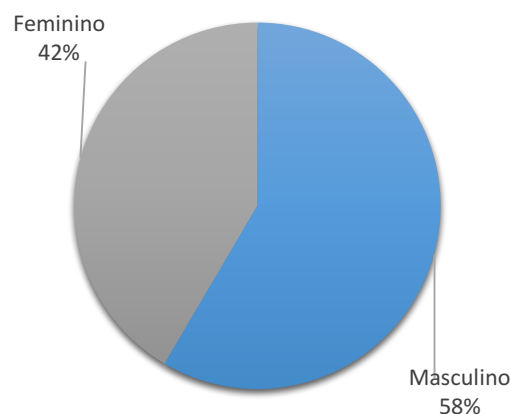


Figura 14 - Género dos consumidores presentes na prova 1.

O inquérito ao consumidor pretendia analisar 4 parâmetros. Primeiro uma apreciação global da sidra com base no primeiro contacto do consumidor, e de seguida uma avaliação mais específica, nomeadamente em relação à sua acidez, doçura e aroma a maçã. Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a 5 valores. Sendo que 1 valor representa “pouco”, por exemplo “pouco doce” ou “pouco ácido”, e 5 valores representam “muito”, por exemplo “muito doce” ou “muito ácido”.

De um modo geral, o consumidor apresentou reações bastante positivas na sua apreciação geral da sidra. 80% dos inquiridos apreciou a sidra no seu primeiro contacto (4 e 5 valores), sendo que apenas 3% dos consumidores não a apreciaram muito (2 valores). Os valores da apreciação geral vão um pouco contra as primeiras reações que se esperava obter, uma vez que o consumidor português está habituado a sidras mais doces, como a Somersby ou a Strongbow. Esperava-se que o consumidor apresentasse alguma rejeição a uma bebida com um registo diferente daquelas que estão disponíveis no mercado. No entanto, estes 80% mostram que talvez falem alternativas no mercado nacional de sidra.

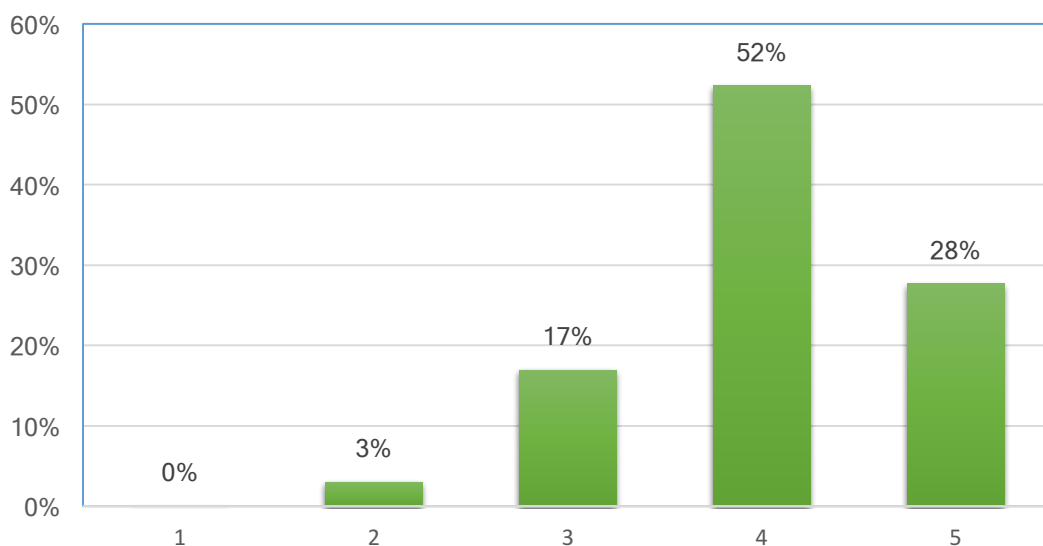


Figura 15 - Apreciação geral dos consumidores presentes na prova 1.

Na análise dos parâmetros mais específicos, como o sabor e o aroma, também se obtiveram dados bastante interessantes. Desde início que o objetivo na produção da sidra foi criar um produto que apresentasse um equilíbrio entre o doce e o ácido, juntamente com um aroma natural a maçã. Se em relação ao sabor o objetivo foi, de certo modo, conseguido para a primeira produção de sidra, em relação ao aroma confirmou-se que seriam ainda necessários alguns ajustes.

Sabor doce - 60% dos consumidores achou que a sidra apresentava uma doçura equilibrada. O consumidor português está habituado a sidras mais doces e quando lhe foi apresentado um produto com menos açúcar e um sabor mais equilibrado, tiveram uma reação

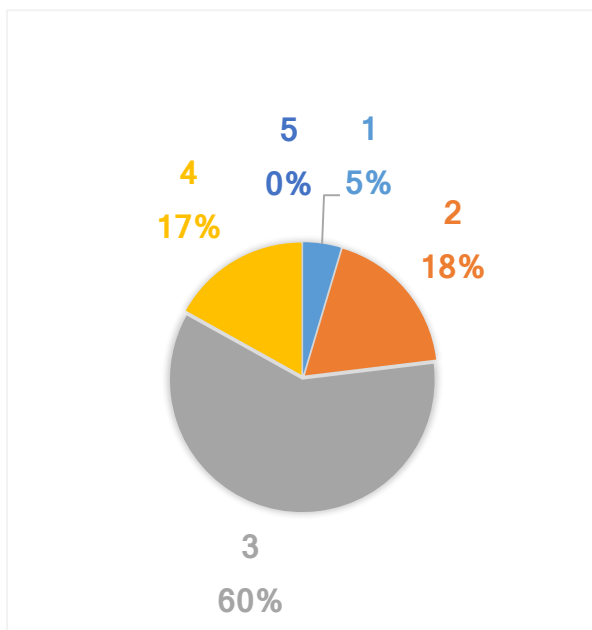


Figura 16 - Pontuações do sabor doce para os consumidores presentes na prova 1.

muito positiva. Há, no entanto, 23% dos consumidores que achou a sidra pouco doce, e outros 17%, que considerou a sidra com uma doçura acima do que equilíbrio desejado. Sendo que é impossível criar um produto que satisfaça todos os consumidores, e tenha a mesma receptividade em todos os nichos do mercado, pode-se considerar um resultado bastante satisfatório que 60% dos consumidores considerem que esta primeira produção apresenta uma doçura equilibrada.

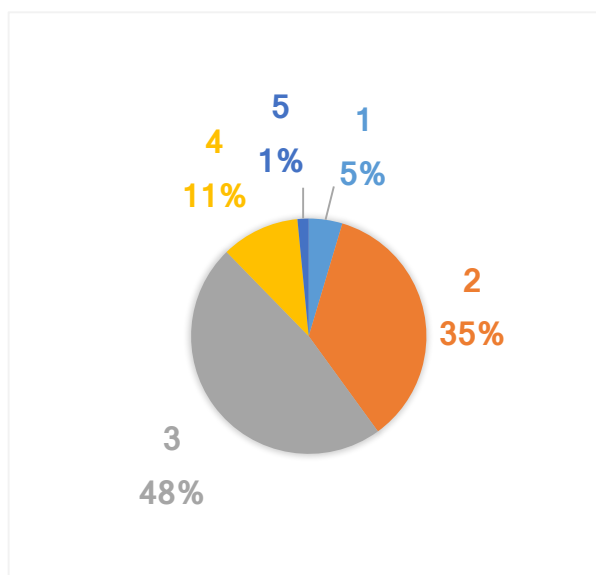


Figura 17 - Pontuações do sabor ácido para os consumidores presentes na prova 1.

Sabor ácido - 48% dos consumidores achou que a sidra apresentava uma acidez equilibrada, e 40% considerou que a sidra apresentava pouca acidez. Um resultado interessante, dado que o consumo de sidras em Portugal se resume a bebidas mais doces e menos ácidas. Mais uma vez, a falta de alternativas apresentadas ao consumidor português, e a pouca cultura no consumo de sidra poderá ser um fator relevante.

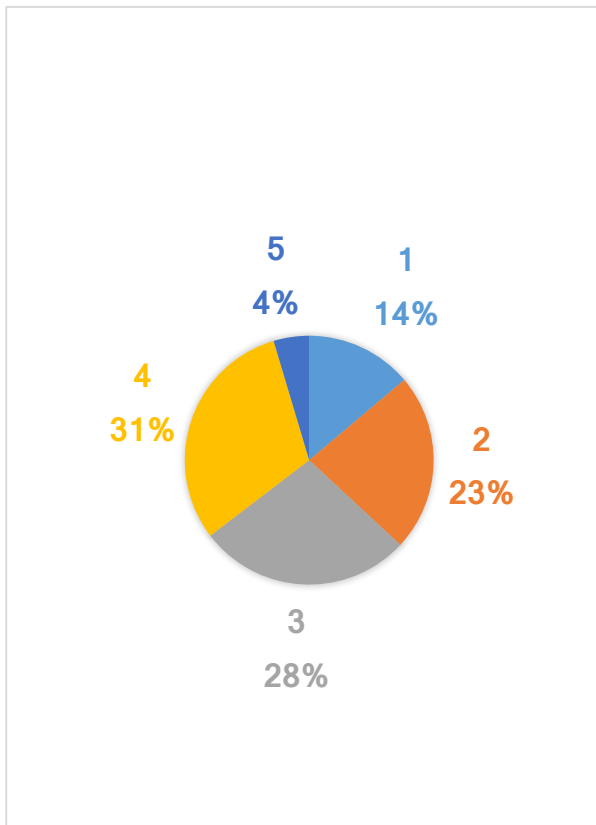


Figura 18 - Pontuações do aroma a maçã para os consumidores presentes na prova 1.

Aroma a maçã - Apenas 28% dos consumidores achou que a sidra apresentava um aroma equilibrado a maçã. 35% considerou que a sidra tinha muito aroma a maçã e 37% considerou que a sidra apresentava pouco aroma. É ainda de salientar que, para esta primeira produção, alguns consumidores detetaram um ligeiro cheiro a enxofre (“ovos podres”), mas que se dissipava com o tempo. Analisando os resultados concluiu-se que o aroma a maçã na primeira produção de sidra foi o parâmetro que apresentou piores resultados, e que este teria de ser bastante melhorado e trabalhado na seguinte produção, de modo a ir ao encontro das preferências do consumidor.

Após a análise da sidra, foi pedido ao consumidor que desse uma nota final ao produto, numa escala de 1 a 10 valores, com base na sua reflexão sobre os parâmetros anteriormente abordados. Mais de 52% dos consumidores deram uma nota igual ou superior a 8, pelo que é um resultado bastante positivo, apesar de alguns fatores terem bastante influência na

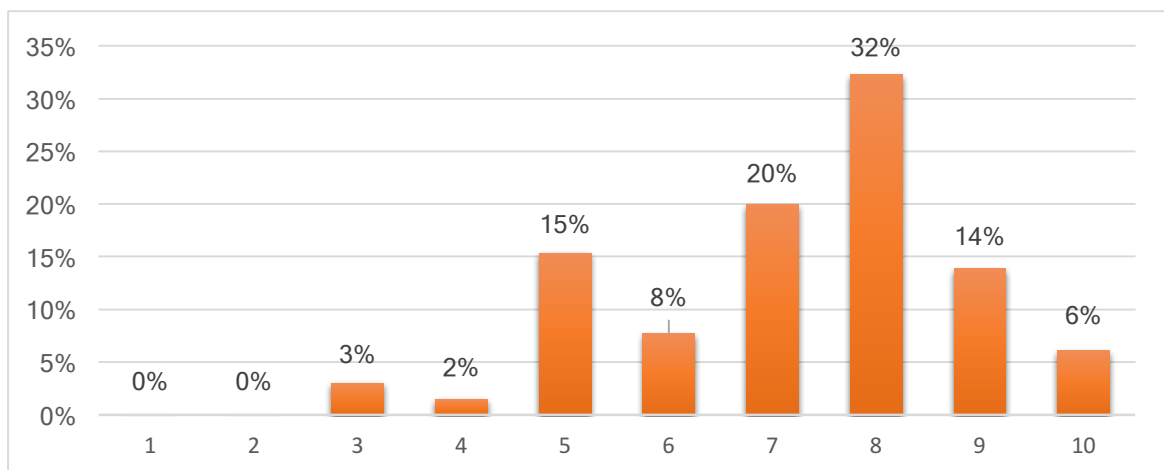


Figura 19 - Nota da avaliação final dos consumidores presentes na prova 1.

recetividade do produto no mercado, como o aroma ou a acidez, e que precisam de alguns ajustes antes do produto ser lançado no mercado. 20% dos consumidores ainda atribuiu uma nota de 7 valores e 8% de 6 valores, pelo que se pode considerar uma boa primeira reação do público português a um produto diferente do que estão habituados.

Opção de compra - 91% dos consumidores respondeu que compraria o produto no mercado, sendo que apenas 9% respondeu que não compraria. Destes 9%, é de salientar que alguns consumidores referiram que não eram consumidores de sidra.

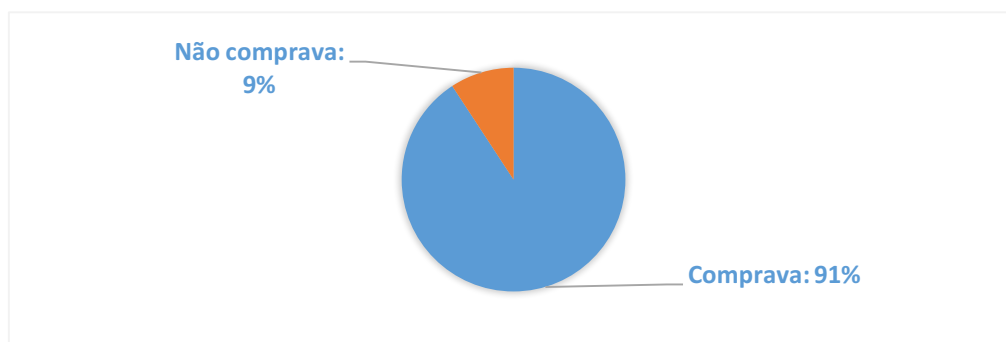


Figura 20 - Opção de compra dos consumidores presentes na prova 1.

2ª Produção de Sidra

No dia 21 de julho, foi realizado uma segunda análise sensorial ao consumidor de Sidra Vadia. O estudo decorreu na Universidade de Aveiro, no grupo de investigação QOPNA, e foi pedido ao painel que analisasse as duas produções de sidra realizadas ao longo do estágio. Foram inquiridas 15 pessoas, todas com mais de 18 anos.

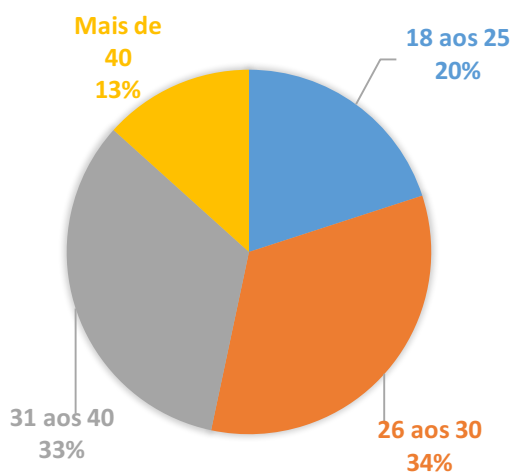


Figura 21 - Idades dos consumidores presentes na prova 2.

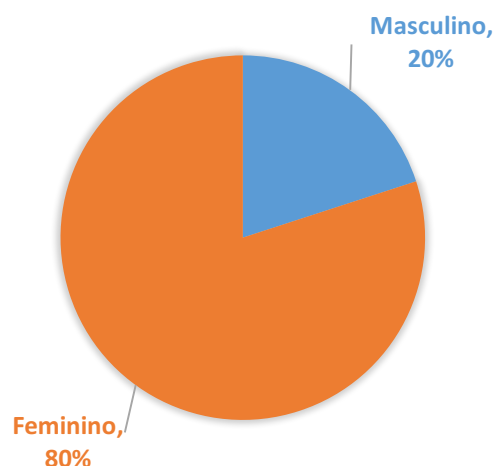


Figura 22 - Género dos consumidores presentes na prova 2.

Foi pedido ao painel que analisasse os produtos em 4 parâmetros: uma avaliação do seu aroma a maçã, do seu sabor a maçã e do seu sabor doce e do seu sabor ácido. Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a 5 valores, sendo que 1 valor representa pouco (“pouco aroma a maçã”, “pouco doce”, etc) e 5 valores representam muito (“muito aroma a maçã”, “muito ácido”, etc). Por fim, foi perguntado ao painel sobre qual recaía a sua preferência e se consumiria o produto estando este disponível para venda.

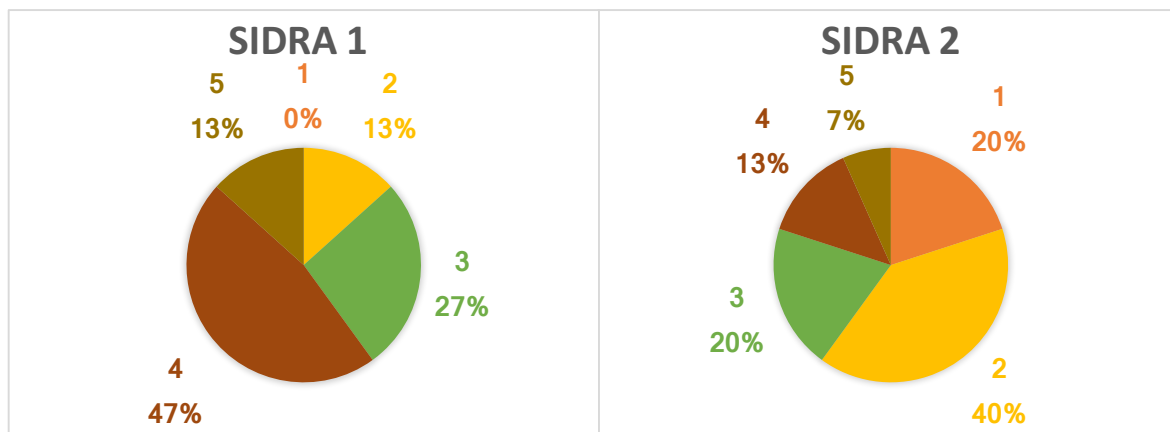


Figura 23 - Pontuações do “aroma a maçã” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.

Aroma a maçã - Para 47% do painel, a sidra 1 apresenta bastante aroma a maçã, e 27% considerou que a sidra 1 apresentava um aroma equilibrado. Em relação à sidra 2, os resultados foram menos positivos, uma vez que 40% considerou que a sidra apresentava pouco aroma a maçã e 20% considerou inexistente a presença de aroma. O aroma da sidra foi, de facto, o parâmetro que apresentou maior dificuldade ao longo do estágio. A obtenção de uma sidra com um aroma natural a maçã provou ser um verdadeiro desafio. No entanto, contrariamente aos resultados da 1ª análise sensorial, a sidra da primeira produção apresenta desta vez mais aroma a maçã, tanto em relação à primeira análise, como em comparação com a segunda produção de sidra. Um fator que poderá ter influência no aparecimento do aroma a maçã é o tempo de maturação do produto. Em ambos os casos, a análise que apresenta os piores resultados é aquela que tem menos tempo de maturação. Esta conclusão poderá ajudar em futuras produções, de modo a obter-se um produto com um aroma a maçã mais intenso e agradável para os consumidores.

Quanto aos parâmetros relacionados com o sabor da sidra também aqui se observou algumas discrepâncias nas preferências dos consumidores.

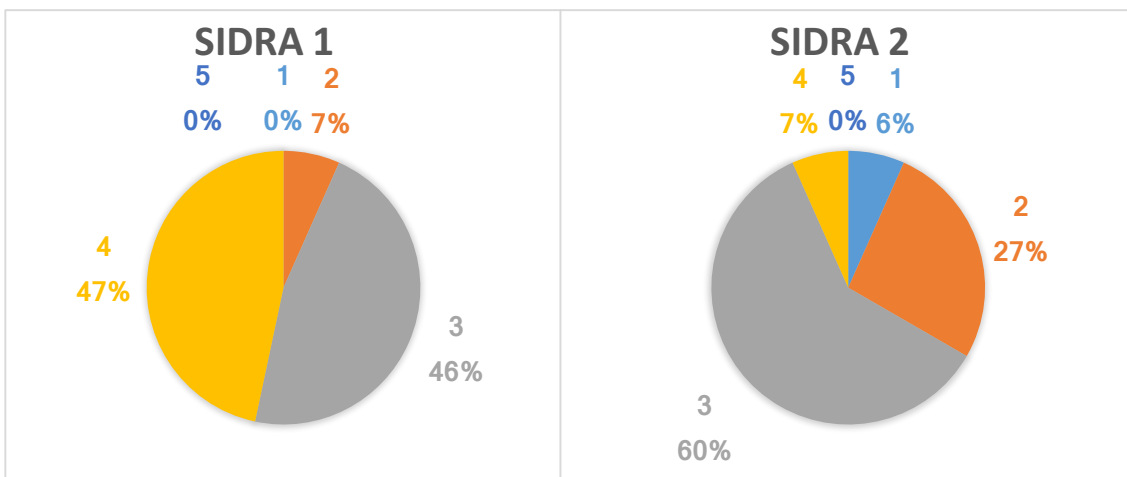


Figura 24 - Pontuações do “sabor doce” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.

Sabor doce – A sidra 2 foi a que obteve os resultados mais consensuais, em que 60% considerou que a sidra apresentava uma doçura equilibrada. Já para a sidra 1, 47% achou que era muito doce, mas 46% considerou que esta tem uma doçura equilibrada.

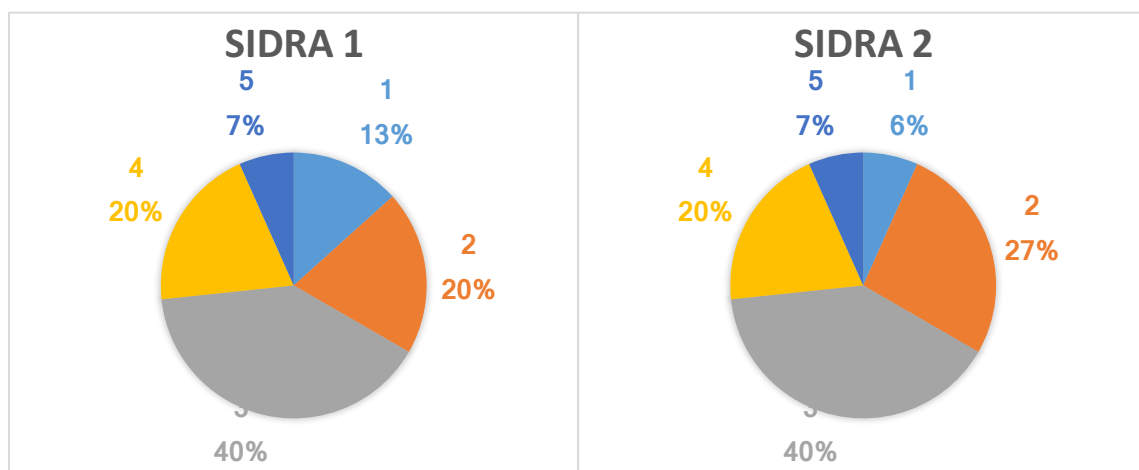


Figura 25 - Pontuações do “sabor ácido” dos consumidores às sidras 1 e 2 presentes na prova 2.

Sabor ácido - Foi o parâmetro mais consensual entre as duas sidras. Tanto na sidra 1 como na sidra 2, 40% dos consumidores achou que a sidra apresentava uma acidez equilibrada. 27%, tanto na sidra 1 como na sidra 2, consideraram que esta era muito ácida e 33% achou que tanto a sidra 1 como a sidra 2 era pouco ácida. Um resultado interessante, dado que o consumo de sidras em Portugal se resume a bebidas mais doces e menos ácidas. Mais uma vez, a falta de alternativas apresentadas ao consumidor português, e a pouca cultura no consumo de sidra poderá ser um fator relevante.

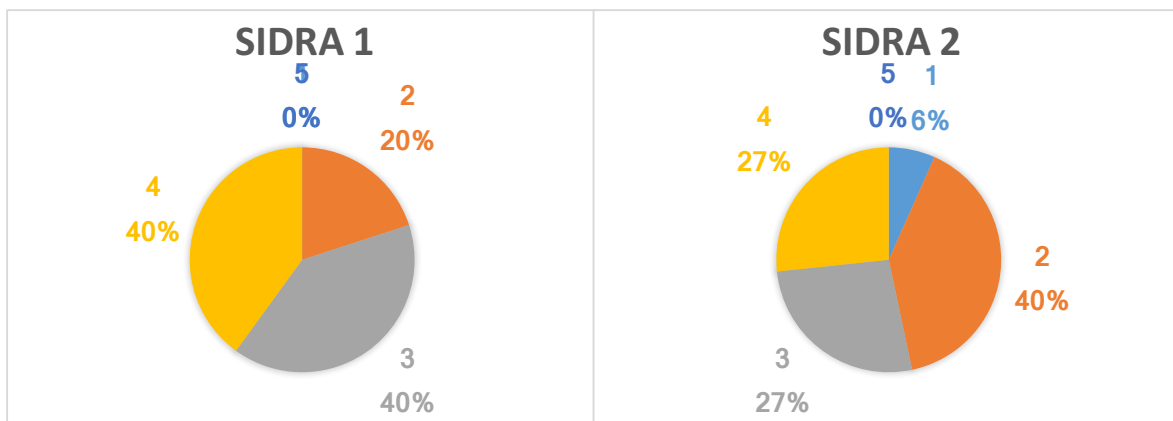


Figura 26 - Pontuações do “sabor a maçã” dos consumidores às sidras 1 e 2.

Sabor a maçã - 40% do painel achou que a sidra 1 tinha um sabor a maçã equilibrado ou que apresentava muito sabor a maçã. Já em relação à sidra 2, 40% do painel considerou que esta apresentava pouco sabor a maçã. No entanto, 27% achou que tinha um sabor equilibrado ou muito sabor a maçã.

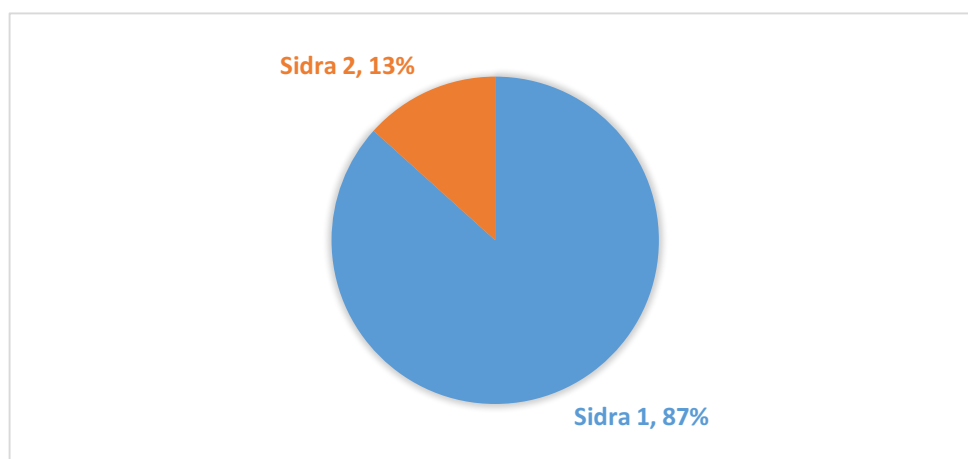


Figura 27 - Preferências dos consumidores entre as sidras 1 e 2.

Em relação à apreciação global, 87% do painel preferiu a sidra 1 em vez da sidra 2. A razão desta preferência parece ser o facto da sidra 1 apresentar um aroma a maçã mais intenso, o que influencia a escolha do consumidor e o facto de ser um pouco mais doce que a sidra 2.

Quanto à opção de compra, 100% dos consumidores respondeu que compraria o produto no mercado.

3ª Produção de Sidra

A 3ª análise sensorial ocorreu no dia 11 de setembro no 12º Encontro Nacional – *Glupor-12*, que se realizou na Universidade de Aveiro. Foi pedido aos participantes do encontro que após a prova da sidra preenchessem um pequeno inquérito de forma a avaliar a sua apreciação da Sidra Vadia.

Dos participantes presentes no encontro, foram 17 os que preencheram o inquérito, todos com mais de 18 anos e as idades foram distribuídas em diferentes faixas etárias. Relativamente ao sexo dos consumidores, a maioria dos inquiridos era do sexo feminino.

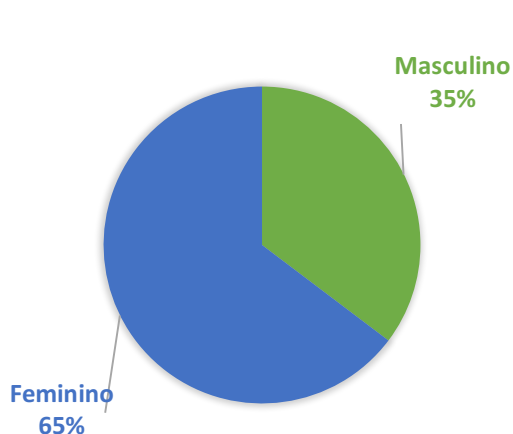


Figura 28 - Género dos consumidores presentes na prova 3.

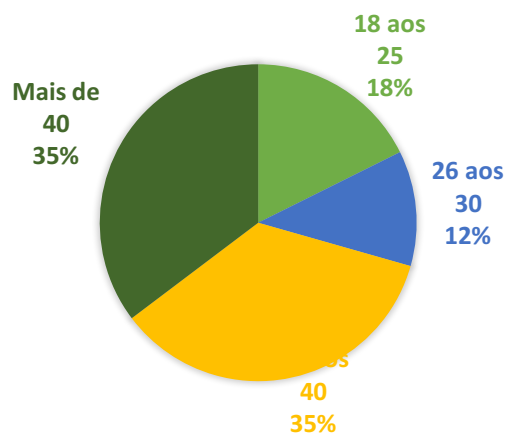


Figura 29 - Idades dos consumidores presentes na prova 3.

Foi pedido ao participante que analisasse o produto em 4 parâmetros, a sua acidez, doçura, sabor a maçã e aroma a maçã. Todos os parâmetros foram avaliados numa escala de 1 a 5 valores, sendo que 1 valor representa “pouco” e 5 valores representam “muito”. Por fim, era pedido uma avaliação final do produto, com a atribuição de uma nota entre 1 a 10 valores e se comprariam o produto estando este presente no mercado.

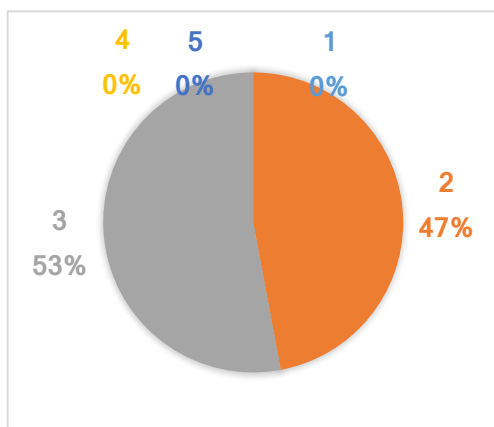


Figura 30 - Pontuações do “aroma de maçã” dos participantes presentes na prova 3.

Aroma a maçã - O parâmetro aromático continua a ser aquele com resultados menos positivos. Desde a primeira produção que a obtenção de um aroma mais intenso a maçã se tem mostrado o maior obstáculo no produto final. 47% dos consumidores

consideraram que a sidra apresenta pouco aroma a maçã, pelo que é um parâmetro a melhorar nas futuras produções.

Sabor doce - 53% dos consumidores achou que a sidra apresentava um sabor equilibrado, enquanto que 29% acharam um produto doce. Estes resultados são bastante positivos, uma vez que se pretende um produto com uma doçura equilibrada, e não tão doce como as sidras presentes no mercado.

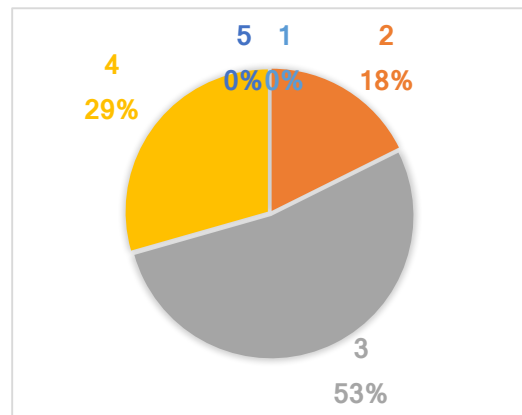


Figura 31 - Pontuações do “sabor doce” dos consumidores da sidra 3.

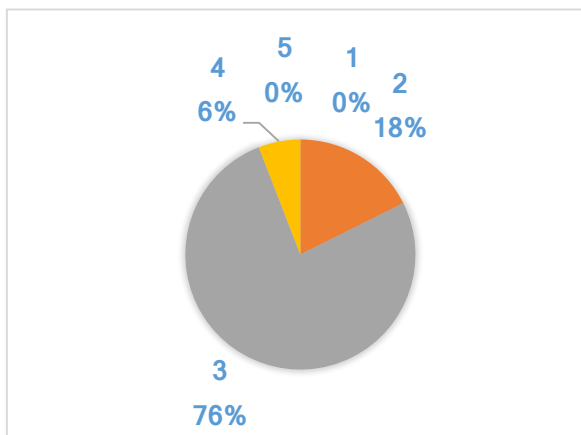


Figura 32 - Pontuações do “sabor ácido” dos consumidores da sidra 3.

Sabor ácido - foi um parâmetro também bastante consensual, 76% dos consumidores achou que a sidra apresentava uma acidez equilibrada. Um resultado bastante positivo, uma vez que se pretende um produto capaz de balançar um sabor doce e ácido de igual modo.

Sabor a maçã - 41% dos consumidores achou que a sidra 3 tinha um sabor a maçã equilibrado e outros 41% consideraram que a sidra possui um bom sabor a maçã.

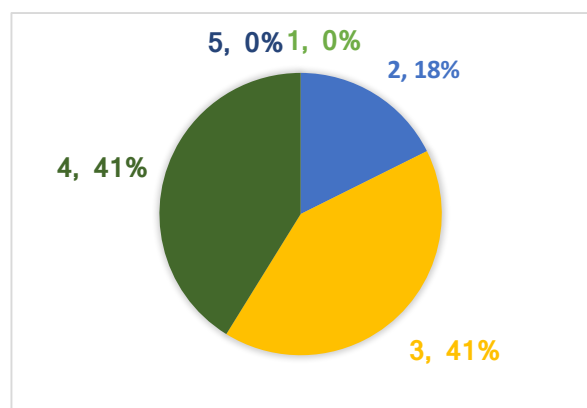


Figura 33 - Pontuações do “sabor a maçã” dos consumidores da sidra 3.

Por último, foi pedido ao consumidor que desse uma nota final ao produto, numa escala de 1 a 10 valores, e foi-lhe questionado se compraria o produto ou não.

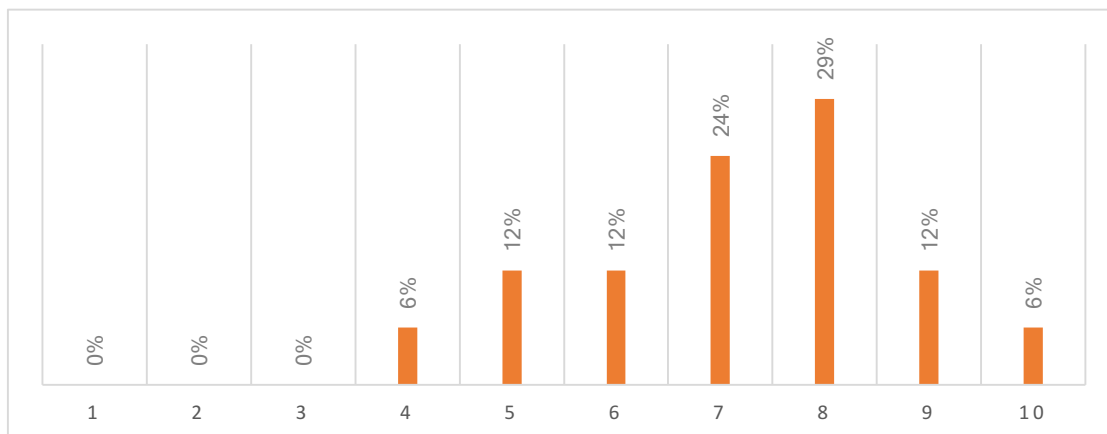


Figura 34 - Notas das avaliações finais dos consumidores da sidra 3.

De um modo geral, as notas dadas ao produto foram bastante positivas. Mais de 71% dos participantes deram uma nota igual ou superior a 7, pelo que é um resultado bastante positivo. A produção de uma sidra com uma doçura e acidez equilibrada em comparação com as sidras presentes no mercado foi conseguido, no entanto, o parâmetro do aroma continua a ser o principal problema do produto, uma vez que se pretende uma sidra com um aroma a maçã mais intenso.



Figura 35 - Opção de compra dos consumidores à sidra 3.

Quanto à opção de compra, 91% dos consumidores respondeu que compraria o produto, sendo que apenas 9% respondeu que não compraria. É certo que será impossível agradar a todos os consumidores, no entanto ter uma percentagem de mais de 90% que comprará o produto é um resultado bastante positivo para um novo produto num mercado dominado por outras grandes marcas.

5. CONCLUSÃO

O objetivo desta dissertação consistiu no desenvolvimento de uma sidra a partir da fermentação do concentrado de sumo de maçã e do retentato, um subproduto da indústria agroalimentar, promovendo assim a sua valorização. O concentrado de sumo de maçã tem carência em aminoácidos e minerais essenciais ao metabolismo das leveduras na fermentação do açúcar, pelo que foi benéfico criar um meio nutritivo, rico nestes nutrientes, e adequado ao crescimento da levedura no mosto de maçã.

Para a formulação do meio nutritivo promoveu-se uma hidrólise de proteínas através das enzimas proteolíticas presentes no malte de cevada. Realizaram-se duas experiências com rácios diferentes para determinar quais as quantidades ideais de forma a colmatar a carência de aminoácidos no concentrado de sumo de maçã. A primeira experiência atingiu uma concentração total de aminoácidos de 0,221 mg/mL, e a segunda experiência 0,393 mg/mL. Atendendo a que os valores considerados ideais são entre 0,500-2,000 mg/mL conclui-se que a segunda experiência, com um rácio de 1:10 (0,5 kg de malte e 5 kg de retentato) nos permite obter uma concentração de aminoácidos livres mais próxima da concentração considerada ideal.

Após escolhido o rácio ideal do meio nutritivo, foi feito um *scale-up*, que possibilitasse a produção de sidra a uma escala industrial e efetuou-se uma análise de aminoácidos livres por qGC-MS de modo a poder-se quantificar os aminoácidos livres provenientes da hidrólise das proteínas e comprovar se esta foi eficiente. Concluiu-se que quando aplicado à escala industrial, com um rácio de 1:10, o meio nutritivo permite-nos obter uma concentração de aminoácidos dentro dos teores considerados ideais, colmatando assim a carência de aminoácidos presente no concentrado de sumo de maçã. Na primeira produção, a concentração total de aminoácidos atingiu uma concentração máxima de 1,627 mg/mL, na segunda produção a concentração total de aminoácidos atingiu 1,559 mg/mL, estando ambas dentro dos valores considerados ideais - 0,500-2,000 mg/mL e promotores de uma fermentação rápida e completa.

Foi feita uma monitorização do processo fermentativo de modo a acompanhar dois parâmetros diferentes, o teor de sólidos solúveis totais (°Brix) e o teor alcoólico, estando ambos diretamente relacionados. Como observado, era esperado que os valores do °Brix diminuíssem ao longo do tempo, uma vez que os açúcares são consumidos pela levedura. Este metabolismo dos açúcares pela levedura, leva ao aumento do teor alcoólico, uma vez que há a produção de

etanol para o meio, o que ficou também demonstrado. Comprovou-se também que na presença de um meio rico em aminoácidos há um incremento da atividade das leveduras, que leva à redução do tempo de fermentação necessário para a produção de sidra. O uso de um meio nutritivo rico em aminoácidos permitiu obter uma sidra num espaço de tempo de 8 a 10 dias, uma duração inferior ao tempo de fermentação que normalmente demora a produção de sidra (no mínimo 2 semanas).

Por fim, de modo a aferir a recetividade do consumidor à sidra foram realizadas 3 análises sensoriais. Todas foram efetuadas em diferentes locais, a diferentes públicos. Na primeira análise foi estudada a Sidra 1, na segunda foi comparada a Sidra 1 à Sidra 2, e na terceira análise foi avaliada a Sidra 3. Em ambas se obtiveram resultados bastante positivos. A nível de sabor doce e ácido, foram claramente atingidos os objetivos – um equilíbrio entre o doce e o ácido, que fosse contra a tendência das sidras mais doces do mercado. No entanto, o aroma a maçã foi o objetivo que se mostrou mais complicado de se atingir. Houve, contudo, um padrão nos casos onde o aroma de maçã se mostrou mais intenso. Um maior tempo de maturação beneficia um aumento do aroma a maçã, facto que ficou comprovado durante a produção da terceira sidra, pelo que é aconselhável no futuro garantir uma maturação adequada antes do engarrafamento e venda do produto.

Mediante os resultados obtidos, é possível concluir que o desenvolvimento da sidra a partir do concentrado de sumo de maçã, juntamente com o retentato, foi bem-sucedido, comprovado pela presença do produto no mercado.

Como trabalhos futuros relacionados com esta dissertação, sugere-se uma análise mais detalhada ao processo fermentativo, de que modo o meio nutritivo melhora a eficiência da fermentação em comparação com uma fermentação em que apenas esteja presente o concentrado de sumo de maçã. A valorização de um outro subproduto agroalimentar, como o bagaço da maçã, rico em compostos de aroma, poderá solucionar a falta de aroma de maçã na produção atual de Sidra Vadia.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] F. G. ROCHA and A. F. TULLA PUJOL, “Cultivo de macieiras e produção de sidra com denominação de origem protegida no Principado das Astúrias, Espanha,” *Rev. ACTA Geográfica*, pp. 187–205, 2013.
- [2] H. Marques, “Região demarcada dos vinhos verdes,” *Rev. da Fac. Let. Geogr.*, vol. III, p. pp 135, 1987.
- [3] AICV, “European Cider Trends 2017,” *Canadean*, 2017.
- [4] P. Onsekizoglu, K. S. Bahceci, and M. J. Acar, “Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment,” *J. Memb. Sci.*, 352, 1–2, 160–165, 2010.
- [5] V. Falguera and A. Ibarz, *Juice processing: quality, safety, and value-added opportunities*.
- [6] Y. Ma, N. Gao, W. Chu, and C. Li, “Removal of phenol by powdered activated carbon adsorption,” *Front. Environ. Sci. Eng.*, 7, 2, 158–165, 2013.
- [7] M. Yazdanshenas, S. A. R. Tabatabaee-Nezhad, M. Soltanieh, R. Roostaazad, and A. B. Khoshfetrat, “Contribution of fouling and gel polarization during ultrafiltration of raw apple juice at industrial scale,” *Desalination*, 258, 1–3, 194–200, 2010.
- [8] E. R. Elkins, A. Matthys, R. Lyon, and C. J. Huang, “Elkins, E. R., Matthys, A., Lyon, R., & Huang, C. J. (1996). Characterization of Commercially Produced Apple Juice Concentrate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 1, 43–56, 1996.
- [9] T. A. Eisele and S. R. Drake, “The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties,” *J. Food Compos. Anal.*, 18, 2–3, 213–221, 2005.
- [10] S. Edition, *Second Edition Fermented Beverage Production*.
- [11] A. Alberti *et al.*, “Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties,” *LWT - Food Sci. Technol.*, 65, 436–443, 2016.

- [12] L. F. Burroughs, "The aminoacids of apple juices and ciders," *J. Sci. Food Agric.*, 8, 3, 122–131, 1957.
- [13] S. Malherbe, V. Fromion, N. Hilgert, and J. M. Sablayrolles, "Modeling the Effects of Assimilable Nitrogen and Temperature on Fermentation Kinetics in Enological Conditions," *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 3, 261–272, 2004.
- [14] A. Nogueira, S. H. Teixeira, I. M. Demiate, and G. Wosiacki, "Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs," *Ciência e Tecnol. Aliment.*, 27, 2, 259–264, 2007.
- [15] M. Yazdanshenas, A. R. Tabatabaeenezhad, R. Roostaazad, and A. B. Khoshfetrat, "Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration," *Sep. Purif. Technol.*, 47, 1–2, 52–57, 2005.
- [16] F. Gassara, C. M. Ajila, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, and J. R. Valero, "Liquid state fermentation of apple pomace sludge for the production of ligninolytic enzymes and liberation of polyphenolic compounds," *Process Biochem.*, 47, 6, 999–1004, 2012.
- [17] G. S. Dhillon, S. Kaur, and S. K. Brar, "Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 27, 789–805, 2013.
- [18] W. Kunze, T. Wainwright, and H. O. Mieth, *Technology brewing and malting*. VLB, 1999.
- [19] B. L. Jones, "Endoproteases of barley and malt," *J. Cereal Sci.*, 42, 2, 139–156, 2005.
- [20] C. W. Bamforth, "Current perspectives on the role of enzymes in brewing," *J. Cereal Sci.*, 50, 3, 353–357, 2009.
- [21] J. Mikola and L. Kolehmainen, "Localization and activity of various peptidases in germinating barley," *Planta*, 104, 2, 167–177, 1972.
- [22] T. Sopanen and J. Mikola, "Purification and partial characterization of barley leucine aminopeptidase.," *Plant Physiol.*, 55, 5, 809–814, 1975.
- [23] B. Oszywa, M. Makowski, and M. Pawełczak, "Purification and partial characterization

- of aminopeptidase from barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds,” *Plant Physiol. Biochem.*, 65, 75–80, 2013.
- [24] B. L. Jones and A. D. Budde, “Effect of Reducing and Oxidizing Agents and pH on Malt Endoproteolytic Activities and Brewing Mashers,” *J. Agric. Food Chem.*, 51, 25, 7504–7512, 2003.
- [25] B. L. Jones and A. D. Budde, “How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels,” *J. Cereal Sci.*, 41, 1, 95–106, 2005.
- [26] T. Sopanen, “Purification and partial characterization of a dipeptidase from barley,” *Plant Physiol.*, 57, 6, 867–71, 1976.
- [27] I. Strelec, B. Vukelić, and L. Vitale, “Aminopeptidases of germinated and non-germinated barley,” *Food Technol. Biotechnol.*, 47, 3, 296–303, 2009.
- [28] D. Wang, Y. Xu, J. Hu, and G. Zhao, “Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Inst. Brew.*, 110, 4, 340–346, 2004.
- [29] T. D’Amore, I. Russell, and G. G. Stewart, “Sugar utilization by yeast during fermentation,” *J. Ind. Microbiol.*, 4, 4, 315–323, 1989.
- [30] S. S. Kanwar and Keshani, “Fermentation of apple juice with a selected yeast strain isolated from the fermented foods of himalayan regions and its organoleptic properties,” *Front. Microbiol.*, 7, 6, 1–6, 2016.
- [31] N. J. Berthels, R. R. Cordero Otero, F. F. Bauer, J. M. Thevelein, and I. S. Pretorius, “Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains,” *FEMS Yeast Res.*, 4, 7, 683–689, 2004.
- [32] J. Tronchoni, A. Gamero, F. N. Arroyo-López, E. Barrio, and A. Querol, “Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation,” *Int. J. Food Microbiol.*, 134, 3, 237–243, 2009.
- [33] C. Guillaume, P. Delobel, J. M. Sablayrolles, and B. Blondin, “Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A mutated HXT3 allele

- enhances fructose fermentation,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 8, 2432–2439, 2007.
- [34] M. Perez, K. Luyten, R. Michel, C. Riou, and B. Blondin, “Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: Both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed,” *FEMS Yeast Res.*, 5, 4–5, 351–361, 2005.
- [35] L. F. Bisson, “High-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is under general glucose repression control.,” *J. Bacteriol.*, 170, 10, 4838–4845, 1988.
- [36] J. Ramos, K. Szkutnicka, and V. P. Cirillo, “Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*.,” *J. Bacteriol.*, 170, 11, 5375–5377, 1988.
- [37] V. Jiranek, P. Langridge, and P. A. Henschke, “Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium,” *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 1, 75–83, 1995.
- [38] S. Ozcan, J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wöfl, and M. Johnston, “Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 22, 12428–32, 1996.
- [39] M. Saayman and M. Viljoen-Bloom, “The biochemistry of malic acid metabolism by wine yeasts – a review,” *South African J. Enol. Vitic.*, 27, 2, 113–122, 2006.
- [40] I. C. MacWilliam, “WORT COMPOSITION-A REVIEW,” *J. Inst. Brew.*, 74, 1, 38–54, Jan. 1968.
- [41] A. Alberti, R. G. Vieira, J. F. Drilleau, G. Wosiacki, and A. Nogueira, “Apple wine processing with different nitrogen contents,” *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 54, 3, 551–558, 2011.
- [42] P. Taillandier, F. Ramon Portugal, A. Fuster, and P. Strehaiano, “Effect of ammonium concentration on alcoholic fermentation kinetics by wine yeasts for high sugar content,” *Food Microbiol.*, 24, 1, 95–100, 2007.
- [43] A. Gutiérrez, R. Chiva, M. Sancho, G. Beltran, F. N. Arroyo-López, and J. M. Guillamon, “Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during

- fermentation of a synthetic grape must,” *Food Microbiol.*, 31, 1, 25–32, 2012.
- [44] A. Mendes-Ferreira, A. Mendes-Faia, and C. Leão, “Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry,” *J. Appl. Microbiol.*, 97, 3, 540–545, 2004.
- [45] F. N. Arroyo-López, S. Orlić, A. Querol, and E. Barrio, “Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid,” *Int. J. Food Microbiol.*, 131, 2–3, 120–127, 2009.
- [46] M. J. Torija, N. Rozès, M. Poblet, J. M. Guillamon, and A. Mas, “Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 80, no. 1, pp. 47–53, 2003.
- [47] M. E. Pampulha and M. C. Loureiro-Dias, “Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 5–6, 547–550, 1989.
- [48] B. S. Valles, R. P. Bedriñana, N. F. Tascón, A. Q. Simón, and R. R. Madrera, “Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider,” *Food Microbiol.*, 24, 1, 25–31, 2007.
- [49] M. Ciani and L. Ferraro, “Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines,” *J. Appl. Microbiol.*, 85, 2, 247–254, 1998.
- [50] G. S. Dhillon, S. K. Brar, M. Verma, and R. D. Tyagi, “Apple pomace ultrafiltration sludge - A novel substrate for fungal bioproduction of citric acid: Optimisation studies,” *Food Chem.*, 128, 4, 864–871, 2011.
- [51] G. S. Dhillon, S. K. Brar, M. Verma, and R. D. Tyagi, “Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*,” *Biochem. Eng. J.*, 54, 2, 83–92, 2011.
- [52] G. S. Dhillon, S. K. Brar, and M. Verma, “Biotechnological potential of industrial wastes for economical citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* through submerged

- fermentation,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, 47, 3, 542–548, 2012.
- [53] S. A. Shojaosadati and V. Babaeipour, “Citric acid production from apple pomace in multi-layer packed bed solid-state bioreactor,” *Process Biochem.*, 37, 8, 909–914, 2002.
- [54] G. S. Dhillon, S. K. Brar, M. Verma, and R. D. Tyagi, “Enhanced solid-state citric acid bio-production using apple pomace waste through surface response methodology,” *J. Appl. Microbiol.*, 110, 4, 1045–1055, 2011.
- [55] Rika TSURUMI, Suekazu Makoto SHIRAISHI, Yoshikazu ANDO, YANAGIDA and Kiyoshi TAKEDA, “Production of Flavor Compounds from Apple Pomace,” *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 48, 8, 564-569, 2001.
- [56] L. R. Correia, “Kinetics of Solid-State Ethanol Fermentation Pomace,” 17, 97–116, 1992.
- [57] M. O. NGADI and L. R. CORREIA, “Solid State Ethanol Fermentation of Apple Pomace as Affected by Moisture and Bioreactor Mixing Speed,” *J. Food Sci.*, 57, 3, 667–670, 1992.
- [58] C. Paganini, A. Nogueira, N. C. Silva, and G. Wosiacki, “Aproveitamento de bagaço de maçã para a produção de álcool e obtenção de fibras alimentares,” *Ciência e Agrotecnologia*, 29, 6, 1231–1238, 2005.
- [59] G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur, J. R. Valero, and M. Verma, “Chitinolytic and chitosanolytic activities from crude cellulase extract produced by *A. niger* grown on apple pomace through Koji fermentation,” *J. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 12, 1312–1321, 2011.
- [60] G. S. Dhillon, S. Kaur, S. K. Brar, and M. Verma, “Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation,” *Ind. Crops Prod.*, 38, 1, 6–13, 2012.
- [61] Z. Zheng and K. Shetty, “Enhancement of pea (*Pisum sativum*) seedling vigour and associated phenolic content by extracts of apple pomace fermented with *Trichoderma* spp.,” *Process Biochem.*, 36, 1–2, 79–84, 2000.

- [62] N. Grigelmo-Miguel and O. Martín-Belloso, "Comparison of Dietary Fibre from By-products of Processing Fruits and Greens and from Cereals," *LWT - Food Sci. Technol.*, 32, 8, 503–508, 1999.
- [63] A. Schieber, P. Hilt, H. U. Endreß, C. Rentschler, and R. Carle, "A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 4, 1, 99–107, 2003.
- [64] C. M. Ajila, F. Gassara, S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi, and J. R. Valero, "Polyphenolic Antioxidant Mobilization in Apple Pomace by Different Methods of Solid-State Fermentation and Evaluation of Its Antioxidant Activity," *Food Bioprocess Technol.*, 5, 7, 2697–2707, 2012.
- [65] L. Yeap Foo and Y. Lu, "Isolation and identification of procyanidins in apple pomace," *Food Chemistry*, 64, 4, 511–518, 1999.
- [66] T. C. Bhalla and M. Joshi, "Protein enrichment of apple pomace by co-culture of cellulolytic moulds and yeasts," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 1, 116–117, 1994.
- [67] A. Devrajan, V. K. Joshi, K. Gupta, C. Sheikher, and B. B. Lal, "Evaluation of apple pomace based reconstituted feed in rats after solid state fermentation and ethanol recovery," *Brazilian Arch. Biol. Technol.*, 47, 1, 93–106, 2004.
- [68] J. R. Gnepe, R. D. Tyagi, S. K. Brar, and J. R. Valero, "Rheological profile of diets produced using agro-industrial wastes for rearing codling moth larvae for baculovirus biopesticides," *J. Environ. Sci. Health. B.*, 46, 3, 220–230, 2011.
- [69] G. S. Dhillon, S. K. Brar, S. Kaur, and M. Verma, "Rheological Studies During Submerged Citric Acid Fermentation by *Aspergillus niger* in Stirred Fermentor Using Apple Pomace Ultrafiltration Sludge," *Food Bioprocess Technol.*, 6, 5, 1240–1250, 2013.
- [70] S. Camarero, D. Ibarra, Á. T. Martínez, J. Romero, A. Gutiérrez, and J. C. del Río, "Paper pulp delignification using laccase and natural mediators," *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 5, 1264–1271, 2007.
- [71] Y. Wu, Y. Teng, Z. Li, X. Liao, and Y. Luo, "Potential role of polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil,” *Soil Biol. Biochem.*, 40, 3, 789–796, 2008.
- [72] S. Ncanana and S. Burton, “Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer,” *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 44, 2, 66–71, 2007.
- [73] D. A. Vattem and K. Shetty, “Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system,” *Process Biochem.*, 39, 3, 367–379, 2003.
- [74] R. Vazquez-Duhalt, D. W. Westlake, and P. M. Fedorak, “Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2, 459–466, 1994.
- [75] T. V. Pai, S. Y. Sawant, A. A. Ghatak, P. A. Chaturvedi, A. M. Gupte, and N. S. Desai, “Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential,” *J. Food Sci. Technol.*, 52, 3, 1414–1423, 2015.
- [76] M. Jones and J. S. Pierce, “Absorption of Amino Acids From Wort By Yeasts,” *J. Inst. Brew.*, 70, 4, 307–315, 1964.

7. ANEXOS



Universidade de Aveiro
Departamento de Química

Idade: _____ Género: M F Data: _____

Apreciação Geral:

Não gosta
1 2 3 4 5 Gosta muito

Sabor:

Pouco ácido
1 2 3 4 5 Muito Ácido

Pouco doce
1 2 3 4 5 Muito Doce

Aroma a maçã:

Inexistente
1 2 3 4 5 Intenso

Consumo:

Comprava Não comprava

Nota:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Comentário: _____

Anexo 1 – Inquérito 1ª análise sensorial

Figura 36 – Inquérito realizado no Oliva Beer Mind

Anexo 2 – Inquérito 2ª análise sensorial



FICHA DE DEGUSTAÇÃO



Idade: _____ Género: M F Data: _____

Sidra nº 1

Aroma a maçã:

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor a maçã:

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor (doce):

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor (ácido):

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Nota:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Sidra nº 2

Aroma a maçã:

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor a maçã:

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor (doce):

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Sabor (ácido):

Pouco 1 2 3 4 Muito 5

Nota:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Apreciação geral

Preferência:

Sidra Nº1 Sidra Nº 2

Consumo:

Comprava Não comprava

Comentário: _____

Figura 37 – Inquérito realizado no grupo QOPNA na Universidade de Aveiro

Anexo 3 – Inquérito 3ª análise sensorial



FICHA DE DEGUSTAÇÃO



Idade: _____ Género: M F Data: _____

Aroma a maçã:

Pouco
1 2 3 4 Muito
5

Sabor a maçã:

Pouco
1 2 3 4 Muito
5

Sabor (doce):

Pouco
1 2 3 4 Muito
5

Sabor (ácido):

Pouco
1 2 3 4 Muito
5

Nota:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Consumo:

Comprava

Não comprava

Comentário: _____

Figura 38 – Inquérito realizado no 12º Encontro Nacional – Glupor-12

