

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE LIQUEFAÇÃO ENZIMÁTICA NA EXTRAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ¹

Maria Carolina Santos de OLIVEIRA^{2,*}, Nelci Catarina Chiquetto SILVA³,
Alessandro NOGUEIRA², Gilvan WOSIACKI³

RESUMO

O conceito da tecnologia limpa visa otimizar o processo de extração para obter o máximo de suco da fruta, diminuir perdas e gerenciar a aplicação do resíduo gerado. A utilização de complexos enzimáticos, constituídos por celulasas e pectinases, na extração de suco permite, além de modificar características químicas e físico-químicas dos produtos, minimizar a geração de resíduos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as condições de extração de suco de maçã por liquefação enzimática e comparar as características de qualidade dos produtos obtidos a partir desse método com os do tradicional processo de prensagem. Para o processo de liquefação, as melhores condições para obtenção de suco de maçã foram: enzimas 0,1 mL.Kg⁻¹, temperatura 50 °C e tempo 75 min. O rendimento foi de 83,5% com a geração de 16,5% de bagaço, com uma diferença de 19%, quando comparado ao processamento de suco por prensagem. O suco obtido por liquefação foi mais ácido, apresentou maiores teores de cinzas e de nitrogênio do que o suco obtido por prensagem. No bagaço obtido por liquefação, os valores de acidez e cinzas, de extrato etéreo e de nitrogênio foram maiores do que no obtido por prensagem mas não houve diferença significativa nos teores de fibras alimentares embora os teores de pectina tenham sido mais baixos. Não foram detectadas diferenças significativas nas proporções de açúcares neutros relacionados à parede celular. O processamento por liquefação apresentou melhores resultados no rendimento do suco e na diminuição de bagaço, com uma vantagem de 18,5% sobre o processamento tradicional por prensagem.

Palavras-chave: liquefação, maçã.

SUMMARY

EVALUATION OF APPLE JUICE EXTRACTION BY THE ENZYME LIQUEFACTION METHOD. The clean technology concept aims to optimize juice extraction in order to obtain high yields, low losses and to manage the use of residues. The preparation of enzymes available nowadays containing depolymerizing activities like pectinases and celulasas reach high yields of modified apple juice with less by-products. The main objective of this work was to establish the conditions for apple juice processing by enzymatic liquefaction and to evaluate the apple juice and residual pomace comparing them with that obtained by the traditional pressing extraction. The best conditions found include enzyme concentration of 0.1 mL.Kg⁻¹ and 75 min of reaction at 50 °C. The yield of juice was 83.5% with around 16.5% of residual pomace, which represents 19% more when compared with the results found with traditional pressing processing. When obtained by enzyme liquefaction the juice was more acidic, with higher contents of minerals and of nitrogen than the pressed juice. In the apple pomace left by enzyme liquefaction, the values of acidity and ash of lipids and nitrogen compound were higher than in the pressed pomace but there are significant differences in food fibers although the pectin levels were significantly higher. No differences were found in the proportions of neutral sugars related to cellular walls. Enzyme liquefaction processing shows better results in the juice yield and residual pomace with an advantage of 18.5% over the pressing extraction.

Keywords: liquefaction, apple.

1 - INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção das frutas visa atender o consumidor *in natura* e aquelas que não se apresentam dentro dos padrões estabelecidos alcançam baixo preço no mercado consumidor, sendo, muitas vezes, destinadas à alimentação animal ou simplesmente descartadas.

As maçãs consideradas desclassificadas para uso de mesa são atualmente consideradas como frutas industriais, pois, com o aumento de produção, algumas unidades in-

dustriais classificadoras foram reconvertidas e passaram a processá-las agregando valor econômico, uma vez que na composição do custo industrial 25% está relacionado à matéria-prima [33]. Parte da industrialização de maçãs está relacionada à produção de suco, porém, os resíduos gerados necessitam de um gerenciamento adequado, a fim de minimizar o impacto ambiental [12]. A moderna gestão agroindustrial preconiza uma tecnologia limpa com o gerenciamento adequado dos resíduos produzidos em meio agrícola e nas indústrias derivadas. Uma tecnologia limpa aplicada ao processamento de suco de maçã pode visar à minimização da produção de bagaço, ou seja, otimizar o processo para que o máximo de suco seja extraído, diminuindo as perdas do processo, bem como a utilização desse resíduo que tem se tornado um problema mundial, para obtenção de produtos com maior valor agregado. A introdução de um sistema enzimático de extração de suco de maçã minimiza expressivamente a eliminação de resíduos sólidos de natureza pectínica, principal responsável pela elevada retenção de água nos sistemas de extração convencionais [2].

¹Recebido para publicação em 28/3/2006. Aceito para publicação em 20/10/2006 (001715)

²Departamento de Engenharia de Alimentos, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da UEFG, Coordenação de Tecnologia de Alimentos da UTFPR, Campus Campo Mourão, Rodovia BR 369, Km 0,5, Campo Mourão (PR) E-mail: mcarolina@cm.cefetpr.br

³Departamentos de Engenharia de Alimentos, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia da UEFG, Praça Santos Andrade s/n, centro, CEP 84010-330, Ponta Grossa (PR)

* A quem a correspondência deve ser enviada

No processamento de suco de maçã a tecnologia enzimática pode ser aplicada para despectinização do suco prensado. Em polpas, é usada para melhorar a etapa de prensagem e em tortas provenientes do primeiro ciclo de prensagem para aumentar o rendimento em suco no segundo ciclo. É também utilizada no tratamento do bagaço de maçã depois de extração com água para melhorar a capacidade de prensagem e a liquefação da polpa [30].

O objetivo da tecnologia de liquefação enzimática é degradar os polissacarídeos da parede celular liberando os compostos solúveis, em especial o ácido D-galacturônico e os açúcares neutros [13]. Na liquefação da polpa, a hidrólise da pectina e da celulose é devida à atividade de poligalacturonases, pectinases, pectinesterases e celulases. A partir do efeito destas enzimas sobre a parede celular, açúcares neutros como D-arabinose, D-galactose, L-ramnose e D-xilose, que estão ligados nas substâncias pécticas, são liberados e se tornam solúveis [1].

A estrutura celular consiste em uma parede com uma composição que varia na mesma fruta durante o amadurecimento, composta por um complexo de celulose e hemicelulose em uma proporção de aproximadamente 57%. Há também uma quantidade de pectina com alto grau de esterificação, fator decisivo para a firmeza da fruta. O citoplasma, estratificado na parede celular, contém o núcleo, os plastídios, as enzimas, os fatores de crescimento e os vacúolos, nos quais estão dissolvidos os açúcares, ácidos, sais, polifenóis e pigmentos [19].

De acordo com JORGE & MONTEIRO [15] as fibras alimentares são constituídas pela soma de polissacarídeos e lignina de vegetais que não são digeridos pelas enzimas digestivas do ser humano e, podem ser classificadas quanto à sua solubilidade em água, como solúveis e insolúveis. A fração solúvel é composta por pectinas, betaglicanas, gomas, mucilagens, polissacarídeos e algumas hemiceluloses. Os componentes insolúveis são lignina, protopectinas, celulose e outras hemiceluloses. A normalidade digestiva, bem como, a prevenção e o tratamento de doenças como a constipação, a diverticulite, a hipercolesterolemia, a hiperglicemia, a obesidade, o câncer do intestino grosso e da mama, estão relacionados em parte, à ingestão de fibra alimentar [28]. A recomendação da *American Dietetic Association*, é de um consumo mínimo de fibras entre 20 e 35 gramas por dia, sendo, um quarto dessas, na forma de fibra solúvel. A fibra alimentar exerce influência ao longo de todo trato gastrointestinal, desde a ingestão até a excreção; pela mastigação induzida pela fibra, há um aumento no fluxo gástrico, que unido ao aumento da secreção salivar hidrata a fibra alimentar, produzindo um aumento do volume do bolo alimentar que acelera e mantém a sensação de saciedade [15].

A produção de sucos de frutas e hortaliças envolve a transformação de tecidos sólidos, intactos e organizados em um sistema semifluido de células e fragmentos de paredes celulares suspensas em um líquido celular. O suco está contido no vacúolo de cada célula parenquimatosa do tecido comestível da fruta. Para extrair o suco é preciso desorganizar os tecidos, obtendo-se a polpa composta de

paredes celulares e de líquido, e existem técnicas distintas, que de um ponto de vista histórico, começam com o uso do pilão, passam pelas prensas e chegam até as enzimas pectinolíticas e celulolíticas [32].

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer as condições de aplicação de enzimas de liquefação no que diz respeito à sua concentração, ao tempo e temperatura de reação e analisar o suco obtido e o bagaço residual comparando-os com os obtidos pela tecnologia de extração por prensagem.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Material

Foram empregadas maçãs do cultivar Catarina, safra 2003/2004 e 2004/2005, de São Joaquim (SC), o complexo enzimático de liquefação Ultrazym AFP-L e a enzima pectinolítica Pectinex 100 L, ambos da Novo Zymes do Brasil, cedidas pela LNF de Bento Gonçalves.

2.2 - Obtenção de suco de maçã por prensagem

As maçãs, depois de lavadas e pesadas, foram trituradas em multiprocessador com o menor crivo e, após esta etapa, foram adicionados metabissulfito de potássio (100 mg.Kg⁻¹ de SO₂ livre) e ácido ascórbico (342,5 mg.Kg⁻¹), visando obter o efeito antioxidante e inibidor de fermentação. A polpa de maçã foi prensada em equipamento hidráulico marca (SENGER EUREKA), à pressão de 3 Kgf.cm⁻². Ao suco, foi adicionada a preparação enzimática Pectinex 100 L na concentração de 0,3 mL.L⁻¹ e, após 2 h à temperatura ambiente, foi filtrado em papel à pressão atmosférica e congelado. O bagaço, depois de desidratado em estufa de circulação de ar (TECNAL TE 394/1) a 60 °C por 2 dias, triturado e tamisado a 28 MESH, foi armazenado em sacos plásticos e mantido à temperatura ambiente.

2.3 - Obtenção de suco de maçã por liquefação

As maçãs, após terem sido lavadas e pesadas, foram fragmentadas em multiprocessador com o menor crivo, tendo sido adicionados, após a fragmentação, o metabissulfito de potássio (100 mg.Kg⁻¹ de SO₂ livre) e ácido ascórbico (342,5 mg.Kg⁻¹). O complexo enzimático de liquefação, Ultrazym AFP-L, foi adicionado e o sistema, incubado sob agitação e temperatura controlada em banho-maria (DUBNOFF, modelo TE-053), durante o tempo estabelecido no delineamento experimental. O suco foi submetido à separação em centrífuga doméstica (ARNO) durante 20 min depois, filtrado em papel sob pressão atmosférica e congelado.

2.4 - Análises químicas e físico-químicas

O pH foi determinado em potenciômetro digital, marca HANNA Instruments modelo HI 84249, e a acidez total, por titulometria com NaHO 0,1 N. Os teores de nitrogênio

total foram determinados pelo método de Kjeldahl, e a proteína bruta foi estimada usando o fator 6,25. A umidade foi determinada por perda termogravimétrica a 104 °C até peso constante e as cinzas, a 550 °C. Os sólidos solúveis foram determinados por refratometria em equipamento ABBE modelo WY1A de bancada respeitada à temperatura de 20 °C e expressos em graus Brix. O extrato etéreo foi determinado em extrator de Soxhlet com éter de petróleo [14]. Os teores de açúcares redutores foram determinados pelo método colorimétrico de SOMOGY-NELSON [34]; os redutores totais, após a hidrólise da sacarose com HCl 1N a 60 °C por 5 min, da mesma forma, e os de D-glucose, por técnica enzimática (glucose oxidase), com leitura colorimétrica em 520 nm, tendo sido todos os carboidratos expressos como monossacarídeos, em g.100 mL⁻¹ (padrão glucose). Os teores de compostos fenólicos foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, tendo sido os resultados expressos em mg.L⁻¹ de catequina. A fibra alimentar total foi determinada por perda gravimétrica após hidrólise enzimática [3]. Os teores de pectina no bagaço foram determinados após hidrólise dos polissacarídeos da parede celular com HCl 0,05 N, precipitação com etanol e saponificação com hidróxido de sódio; quantificados por medida gravimétrica do ácido péctico precipitado com cloreto de cálcio; e expressos como pectato de cálcio [16]. O rendimento em base úmida foi determinado pela diferença de peso entre a polpa inicial e o bagaço úmido final. Todas as análises foram feitas em triplicatas e os resultados estão expressos em base seca.

2.5 - Análises cromatográficas

Para determinação dos açúcares do bagaço, a amostra foi derivatizada de acordo com MARCON [21]. Os acetatos de alditóis resultantes foram analisados em cromatógrafo gasoso (VARIAN modelo 2000R) equipado com coluna capilar de sílica fundida com comprimento de 30 m e diâmetro interno de 0,25 mm revestida com DB-23.

2.6 - Análises microbiológicas

O perfil microbiológico do bagaço, obtido pelo processo de liquefação compreende pesquisa de *Bacillus cereus*, Coliformes a 45 °C, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras [31].

2.7 - Análises estatísticas

O planejamento experimental, bem como a análise dos resultados, foi feito mediante o *software* disponibilizado por NETO, SCARMÍNIO & BRUNS [24], incluindo a validação do modelo matemático por análise de variância. O programa Statistica 5.0 foi utilizado para construção dos gráficos em curva de nível e a análise de variância calculada para os dados físico-químicos foi obtida utilizando programa Excel 2003, tendo sido usado o teste de Tukey de diferenciação de médias, a 5% quando necessário.

2.8 - Modelagem do processo de extração do suco por liquefação

Foi realizada a extração a partir da polpa, com dosagens iniciais de 0,5 mL.Kg⁻¹ e 0,9 mL.Kg⁻¹, utilizadas no planejamento experimental. O planejamento utilizado, para definir as melhores condições de obtenção do suco por liquefação utilizando duas variáveis independentes, está caracterizado na *Tabela 1* no que diz respeito à região de domínio experimental. O sistema foi mantido sob agitação constante a 70 rpm durante o experimento e o tempo de reação foi de 42 min, de acordo com experimentos preliminares. Após terem sido estabelecidas as condições de concentração da enzima e de temperatura, estes parâmetros foram mantidos constantes e foi realizado um estudo cinético com os tempos de 30; 40; 50; 60; 90 e 120 min.

TABELA 1 – Região de domínio do modelo experimental.

Fatores	- 1,414	- 1	0	+ 1	+ 1,414
Temperatura (°C)	20	26	40	54	60
Concentração da enzima (mL.Kg ⁻¹)	0,01	0,15	0,50	0,85	0,99

2.9 - Obtenção de suco por liquefação em escala piloto

O processo de obtenção de suco por liquefação foi conduzido em escala piloto utilizando-se os parâmetros de incubação: temperatura (50 °C), tempo (75 min) sob agitação e 0,1 mL de enzima Ultrazym AFP-L por Kg de matéria prima. A etapa de extração foi feita em tanque encamisado (SOTRONIC) com capacidade para 40 Kg de polpa, com circulação de água aquecida e sistema de agitação de 35 rpm feito com pás conectadas em um eixo central. Após centrifugação, o suco foi resfriado em câmara frigorífica até 10 °C, filtrado em papel em condições normais de pressão e congelado. O bagaço obtido foi processado à semelhança do anteriormente descrito.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Modelagem do processo de extração por liquefação

O delineamento experimental composto 2² axial com duplicatas no ensaio central foi utilizado para verificar os efeitos dos fatores temperatura e concentração de enzima sobre o rendimento do suco, os teores de sólidos solúveis totais e de compostos fenólicos, tendo sido mantido constante o tempo e a velocidade de agitação. Na *Tabela 2*, são apresentados os 10 ensaios, com as variáveis de entrada e de saída, sendo que os primeiros quatro representam a etapa fatorial, os de número cinco e seis constituem-se nas repetições, e os demais, a etapa axial da modelagem.

Os efeitos principais e secundários dos fatores temperatura e concentração da enzima sobre o rendimento de suco, teores de sólidos solúveis e de compostos fenólicos estão detalhados na *Tabela 3*.

TABELA 2 – Rendimento de obtenção de suco e seus teores de sólidos solúveis totais e de compostos fenólicos pelo processo de liquefação enzimática.

Ensaio	X1	X2	Temperatura (°C)	Enzima (mL.Kg ⁻¹)	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L ⁻¹)
1	-1	-1	28	0,15	86	19,0	598,59
2	-1	1	28	0,85	86	15,0	385,10
3	1	-1	54	0,15	84	23,0	1244,65
4	1	1	54	0,85	86	22,5	1205,33
5	0	0	40	0,5	84	19,0	1244,65
6	0	0	40	0,5	82	20,5	1503,08
7	0	-√2	40	0,01	82	24,5	1413,19
8	√2	0	60	0,5	84	24,0	1576,12
9	0	√2	40	0,99	86	21,0	1222,18
10	-√2	0	20	0,5	84	17,0	357,01

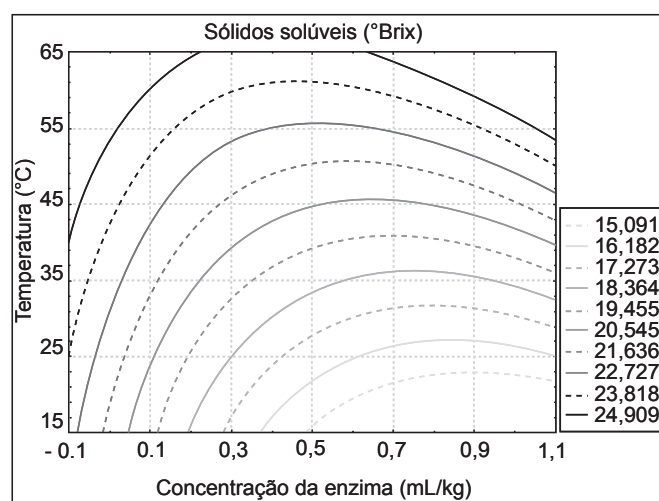
TABELA 3 – Efeitos principais e secundários dos fatores temperatura e concentração de enzimas sobre o rendimento de suco, teores de sólidos solúveis e de compostos fenólicos.

Fatores	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L ⁻¹)
Temperatura (T)	- 0,5	5,35	797,54
Concentração enzima (E)	1,91	- 2,36	- 131,04
Interação T x E	1,0	1,75	87,0

A análise dos efeitos principais demonstrou que a variação da temperatura mostrou-se mais importante nas respostas das variáveis, pois acarretou um aumento 5,35 °Brix nos sólidos solúveis e 797,54 mg.L⁻¹ de fenóis totais, enquanto que a concentração da enzima aumentou em 1,91% o rendimento, porém diminuiu em 2,36 °Brix os sólidos solúveis e em 131,04 mg.L⁻¹ os compostos fenólicos.

A análise de variância dos dados de rendimento de suco apresentou o F tabelado para 95% de confiança de 6,26, sendo superior ao valor calculado de 1,27, portanto o modelo construído para a variável de saída rendimento não foi significativo, sendo sua explicação para somente 61,31% dos dados. A baixa capacidade de explicação por parte do modelo está relacionada com a ligação direta da determinação de rendimento com a eficiência do equipamento empregado no processo de separação do suco do bagaço.

Para os sólidos solúveis o modelo calculado explica 91,14% dos dados, sendo significativo para as condições empregadas. Os coeficientes calculados apresentam uma relação direta da concentração dos sólidos solúveis com a variação da temperatura. Este resultado pode ser explicado pela aproximação das temperaturas ótimas de atividade das enzimas do complexo, estando diretamente relacionado com a intensidade da hidrólise na parede celular, possibilitando a saída das substâncias contidas no vacúolo e liberando compostos da parede celular. A *Figura 1* apresenta a relação dos sólidos solúveis com as variáveis de entrada temperatura e concentração da enzima, indica uma tendência acentuada, quando feita uma extrapolação dos dados da temperatura, para o aumento dos sólidos solúveis, quando a temperatura estiver entre 40 e 65 °C e a concentração da enzima estiver

**FIGURA 1** – Curvas de nível obtidas para os valores de sólidos solúveis. $Y = 19,75 + 2,67 \cdot X1 - 0,06 \cdot X1^2 - 1,18 \cdot X2 + 1,06 \cdot X2^2 + 0,88 \cdot X1 \cdot X2$.

em uma faixa entre os valores de 0,2-0,6 mL.Kg⁻¹. O modelo obtido é apresentado na legenda.

Para os compostos fenólicos, a equação modelada é capaz de explicar com 95% de confiança, 89,14% dos dados. Esta explicação inferior a 95% pode estar relacionada com o efeito antagônico dos fatores temperatura e concentração da enzima. Embora o efeito da temperatura, em módulo, seja aproximadamente 6 vezes maior que o da concentração da enzima, pode ter ocorrido uma interferência na explicação dos dados no modelo. A *Figura 2*, que corresponde às curvas obtidas para os valores de compostos fenólicos, apresenta as concentrações de enzima de 0,1 a 0,8 mL.Kg⁻¹ e as temperaturas na faixa de 42 a 59 °C como as coordenadas da região de valores mais elevados. O modelo obtido está apresentado na legenda.

A partir dos gráficos de curva de nível obtidos para sólidos solúveis e compostos fenólicos foi estipulada a condição ideal para a extração de suco liquefeito em escala piloto. As condições finais de extração foram definidas sendo respeitadas as tendências dos modelos estabelecidos para as variáveis compostos fenólicos e sólidos solúveis, tendo

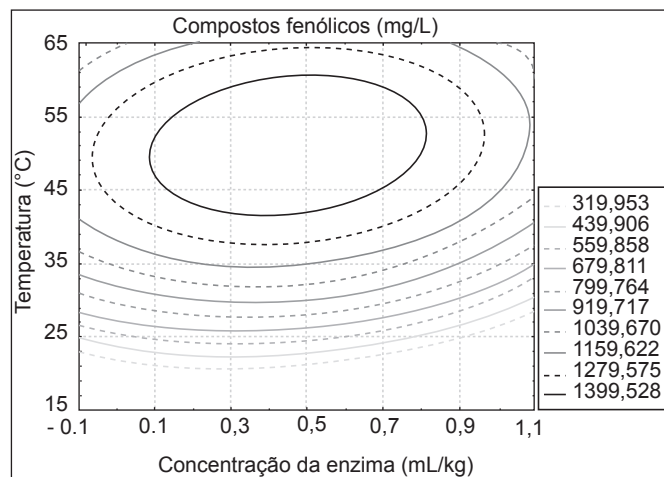


FIGURA 2 – Curvas de nível obtidas para os valores de compostos fenólicos. $Y = 1373,95 + 398,82 \cdot X_1 - 274,68 \cdot X_1^2 - 65,37 \cdot X_2 - 99,07 \cdot X_2^2 + 43,54 \cdot X_1 \cdot X_2$

sido levado em conta a preferência em se obter um produto com altos teores de compostos fenólicos e a utilização de temperaturas amenas para não degradar os compostos de aroma e de sabor do produto. Assim, as condições de 50 °C de temperatura e 0,1 mL.Kg⁻¹ de concentração de enzima indicaram, pelos gráficos, que os maiores teores de sólidos solúveis estão na região de 23,8 °Brix e os de compostos fenólicos, próximos de 1399 mg.L⁻¹.

3.2 - Obtenção de suco por liquefação em escala piloto

Em um planejamento experimental, construído em testes preliminares, foi definido o tempo de 42 min para o processo de liquefação com polpa de maçã, porém trata-se de um tempo muito curto para operacionalizar a extração em nível de escala piloto ou industrial. Foi feito, portanto, um estudo cinético com maior amplitude, sendo mantidas as condições de temperatura e concentração da enzima já definidas. Os resultados de rendimento de suco, sólidos solúveis e fenóis totais deste estudo cinético são apresentados na *Tabela 4*.

O estudo cinético estabeleceu o tempo de 75 min de reação como o mais adequado para a prática operacional da extração em escala piloto, pois com ele foram encontrados os maiores valores das respostas quanto aos teores de sólidos solúveis e de compostos fenólicos.

O rendimento de suco foi de 86 e 83,5% para as escalas de bancada e piloto, respectivamente. Essa variação de rendimento é devida aos problemas intrínsecos à mudança de escala, como a eficiência dos sistemas de agitação e de aquecimento. Houve uma queda de 2,5% no rendimento para o aumento de escala. No processo por prensagem, o rendimento de suco foi de 64,5%, que pode estar relacionado com a eficiência da prensa utilizada e, com certeza, à ausência da enzima de liquefação.

O aumento de 19% no rendimento de suco obtido pelo processo de liquefação pode ser viável economicamente para

TABELA 4 – Rendimento de suco e seus teores de sólidos solúveis e compostos fenólicos obtidos com 0,1 mL.Kg⁻¹ de enzima e à temperatura de 50 °C.

Tempo (minutos)	Rendimento (%)	Sólidos solúveis (°Brix)	Compostos fenólicos (mg.L ⁻¹)
30	84	17,75	1637,85
40	84	21,0	1801,87
55	84	21,0	1960,60
75	86	21,5	2166,95
100	86	16,0	1812,46
135	86	21,5	2077,01

a indústria, mesmo com o custo adicional da aquisição da enzima. Um aumento de 73,02% para 86% com a modificação do processo de prensagem por liquefação, sob condições de 1 g.L⁻¹ de enzima, 50 °C por 30 min, foram obtidos por ACAR [6]. Uma das conseqüências do aumento no rendimento de suco é a diminuição da quantidade de bagaço, que passa a corresponder a 16,5% da matéria-prima, menor do que no processo de prensagem, de 35,5%. Este resíduo consiste em um problema para as processadoras de suco de maçã, pois não se tem um destino definido para este material que apresenta umidade elevada e nutrientes residuais, sendo instável química e microbiologicamente.

3.3 - Caracterização dos produtos obtidos por liquefação ou prensagem

3.3.1 - Suco

Na *Tabela 5*, estão apresentados os resultados das análises químicas e físico-químicas dos sucos obtidos por prensagem e por liquefação.

Nos sucos obtidos por prensagem e por liquefação, a acidez total foi 2,92 e 4,08 g.L⁻¹, respectivamente, expressa como ácido málico. Esta diferença de 28,43% está relacionada à liberação de ácido galacturônico proveniente da hidrólise da cadeia de pectina, já que na preparação comercial de enzimas estava declarada a atividade de poligalacturonase. POLL [26] verificou que ao adicionar uma enzima de liquefação total em polpa de maçã houve um aumento no teor de ácidos em decorrência da liberação de ácido galacturônico pela hidrólise da pectina. Em um estudo com resultados mais expressivos, DRILLEAU, MASSIOT & L QUÉRÉ [10], ao analisarem especificamente as alterações dos teores de ácido galacturônico liberados durante os processos de prensagem e liquefação, obtiveram valores de 0,7 g.L⁻¹ e 9,4 g.L⁻¹ respectivamente, confirmando a causa do aumento da acidez total titulável.

A medida de pH obtida para os sucos em estudo demonstra um aumento de acidez para o suco liquefeito o que é confirmado pela medida de acidez total titulável. Segundo ACAR [16], os componentes do suco apresentam propriedade tampão, muitas vezes não sendo possível verificar mudanças aparentes para os valores de pH das amostras. Os valores de pH relatados por SCHOLS *et al.* [30] foram mais cons-

TABELA 5 – Características dos sucos de maçã.

Indicadores	Prensagem	Liquefação
pH	3,68 ± 0,00	3,0 ± 0,00
Acidez total (g.L ⁻¹)	2,92 ± 0,00	4,08 ± 0,00
Sólidos solúveis (°Brix)	15,75 ± 0,00	16,75 ± 0,00
ART* (g.L ⁻¹)	137,38 ^a ± 0,36	137,56 ^a ± 0,16
Glicose (g.L ⁻¹)	20,28 ^a ± 0,03	23,05 ^b ± 0,04
Cinzas (g.L ⁻¹)	3,64 ^a ± 0,06	8,67 ^b ± 0,21
Nitrogênio total (mg.L ⁻¹)	139,9 ^a ± 0,01	179,9 ^b ± 0,01
Proteína total (mg.L ⁻¹)	874 ^a ± 0,01	1124 ^b ± 0,01
Compostos fenólicos (mg.L ⁻¹)	1309,64 ^a ± 7,23	1826,2 ^b ± 121,6

*ART – Açúcares redutores totais; ^{a,b} – diferença significativa a nível de 95% de confiança

tantes, variando de 3,4 para suco obtido por prensagem e 3,5 para o obtido por liquefação.

Com uma atividade declarada de celulase no complexo enzimático, era esperado um aumento significativo na concentração de sólidos solúveis, D-glucose e açúcares redutores totais no suco obtido por liquefação em comparação com o obtido por prensagem. Embora tenha sido verificado um ligeiro aumento no teor de D-glucose, que variou de 20,28 g.L⁻¹ para 23,05 g.L⁻¹, e nos sólidos solúveis de 15,75 °Brix para 16,75 °Brix, os açúcares totais não apresentaram diferença significativa entre si. Como a maior variação encontrada foi nos teores de D-glucose, é de se esperar que as enzimas celulolíticas estejam sendo mobilizadas neste processo. De acordo com SPAGNUOLO *et al.* [35], as condições ótimas de atividade da celulase são temperatura de 50 °C e pH de 4,8, mas, neste trabalho, embora a temperatura tenha sido a mesma, o pH de 3,0 pode ter causado uma inibição parcial. PILNIK & VORAGEN [25] já haviam relatado que as enzimas podem ser inativadas por polifenóis presentes no suco, e ACAR [1] obteve um ligeiro aumento de 126,20 para 130,80 g.L⁻¹ na concentração de açúcares totais devido ao tratamento de liquefação. Foi detectado por DRILLEAU, MASSIOT & LE QUERÉ [10] um aumento nos teores de D-frutose e D-glucose, sendo que este variou de 23,5 g.L⁻¹ para 34,4 g.L⁻¹, enquanto a sacarose diminuiu de 151,3 g.L⁻¹ para 138,6 g.L⁻¹, devido à presença de invertase na preparação enzimática. O complexo enzimático usado pelos autores continha duas enzimas comerciais, com atividades de poligalacturonase, pectinametilsterase, pectinialase, galactanase, endoglucanase, celobiohidrolase e β-glucosidase. A composição da preparação comercial utilizada neste trabalho não contém indicações da presença de atividades secundárias, porém deve ser levado em conta que não se trata de enzimas purificadas e sim de extratos padronizados obtidos a partir de fermentação submersa dos microrganismos *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, de acordo com o laudo técnico do fabricante. A caracterização das atividades enzimáticas deste complexo pode resultar em informações importantes para o entendimento dos resultados obtidos com suas aplicações. De acordo com SPAGNUOLO *et al.* [35], as preparações enzimáticas comerciais são obtidas a partir de fungos e bactérias, microrganismos capazes de produzir mais que uma enzima, nem sempre atendendo aos objetivos desejados

e MIHALEV *et al.* [23] afirmaram que preparações enzimáticas comerciais pectinolíticas apresentam, pelo menos, atividades secundárias de proteases.

Os teores de nitrogênio total obtidos apresentaram 28,6% de aumento para o suco liquefeito, considerando-se as quantidades de 0,03 mL.L⁻¹ de enzima pectinolítica no processo de prensagem e 0,1 mL.L⁻¹ de enzima de liquefação para o suco liquefeito. DRILLEAU, MASSIOT & LE QUERÉ [35] avaliaram a concentração de nitrogênio total dos sucos obtidos e detectaram um aumento de 28% para o suco resultante da liquefação. Os autores relataram que os valores de 210 mg.L⁻¹ para o processo de prensagem e 260 mg.L⁻¹ de nitrogênio total para o processo de liquefação são elevados pela origem da matéria-prima, existe uma forte influência sob o aspecto da adubação nitrogenada na determinação do teor de nitrogênio total em vegetais.

O conteúdo de cinzas encontrado em suco de maçã produzido a partir de um tratamento com enzimas de liquefação foi maior que para as amostras produzidas sem tratamento enzimático. Foi determinado, por pré-tratamentos, que os minerais da matéria-prima passam para os sucos de fruta em quantidades superiores de acordo com a hidrólise do tecido vegetal após a liquefação da polpa [1]. Os valores obtidos para o teor de cinzas estão de acordo com esta afirmação, pois houve um aumento de 5,03 g.L⁻¹ para o suco liquefeito.

Foi afirmado por SCHOLS *et al.* [30] que o teor dos vários compostos fenólicos analisados havia sido influenciado pelo método de obtenção do suco. Os resultados obtidos neste experimento também demonstraram que ocorreu um aumento de 39,38%, para os teores de compostos fenólicos para o suco obtido por liquefação. Esse resultado é provavelmente devido ao aumento da intensidade da liberação dos compostos fenólicos a partir da degradação enzimática da parede celular. Os teores dos compostos fenólicos obtidos foram elevados, quando comparados aos valores de 425 mg.L⁻¹ para o suco resultante da prensagem da cultivar Catarina relatado por CZELUSNIACK *et al.* [9].

O escurecimento enzimático promovido pelo sistema polifenoloxidase (PPO) da maçã estava parcialmente inibido pela adição de dois agentes antioxidantes, o metabissulfito de potássio e o ácido ascórbico. De acordo com LACHMAN *et al.* [18], o escurecimento de maçãs depende de muitos fatores além do descascamento e ação do oxigênio do ar; tais como a concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes na maçã, concentração e substrato específico das PPOs encontradas na maçã, concentração de inibidores naturais do escurecimento (como o ácido ascórbico), valores de pH, temperatura e concentração de oxigênio na atmosfera de armazenamento e presença de compostos lipídicos no substrato.

Os compostos fenólicos encontrados na casca da maçã têm alto grau de contribuição para as atividades antioxidante total e antiproliferativa, quando comparados com os encontrados na polpa. Podem fornecer grande proteção frente aos danos causados pelos radicais livres no corpo humano

[20]. De acordo com BERREGI *et al.* [4], os compostos fenólicos embora presentes em baixas concentrações, são muito importantes por estarem associados com o amargor e adstringência dos sucos, e contribuir para o *flavor* de produtos processados de maçã e sidras. Os principais compostos fenólicos da maçã são os ésteres dos ácidos caféico e p-coumárico com ácido quínico, monômeros, dímeros e oligômeros de flavonol, glicosídeo quercitina e dihidrochalconas [29].

3.3.2 - Bagaço

Na indústria processadora de maçã, o suco é considerado um dos principais produtos, e do resultado de sua extração surge o bagaço, chamado de descarte sólido, que é uma mistura heterogênea consistindo principalmente de casca, polpa e semente [2]. De acordo com RAUPP *et al.* [28], o bagaço pode ser considerado uma matéria sólida, despectinizada ou não, que permanece depois da extração do suco, e apresenta alta proporção de carboidratos insolúveis, quantidades menores de proteína, minerais e algum suco remanescente, contendo açúcares e outras substâncias solúveis.

A caracterização dos bagaços resultantes dos processos de liquefação e prensagem está apresentada nas Tabelas 6 e 7.

O teor de cinzas, que representa a totalidade de minerais que permanecem depois da incineração da amostra, diminuiu em 15% para o bagaço obtido por liquefação. Ao se considerar que durante o processamento de suco os minerais são parcialmente retidos no bagaço, como há menos bagaço e ainda com estrutura mais afetada pela ação hidrolítica das enzimas, esta diminuição era esperada. O extrato etéreo foi mais elevado no bagaço obtido por liquefação enzimática e de forma significativa. Os teores de nitrogênio resultaram em um aumento de 36% para o bagaço liquefeito quando comparado ao bagaço obtido por prensagem. Para os bagaços obtidos por prensagem e liquefação, os teores obtidos para a fibra alimentar total foram de 31,91 e 31,98% respectivamente, não tendo sido encontrada diferença significativa ao nível de 95% de confiança. Foram determinados por WANG & THOMAS [36] os constituintes da fração insolúvel, já desidratada, remanescente da extração do suco de maçã e encontraram 33,2-35,3% de fibra alimentar.

Os açúcares neutros, componentes fundamentais dos domínios pécico e celulósico/hemicelulósico presentes nos bagaços obtidos por liquefação ou prensagem estão quantificados na Tabela 7.

A celulose, polissacarídeo mais abundante da parede celular, é composta basicamente por resíduos de D-glucose ligados em $\beta(1\rightarrow4)$. Pela presença de uma celulase no complexo enzimático, era esperada uma diminuição no teor de fibra alimentar para o bagaço proveniente do processo de liquefação. A presença de D-glucose em concentrações elevadas nos bagaços de ambos os tratamentos demonstra que não houve uma atividade intensa da enzima glucanase no processo de liquefação, sendo que houve somente uma redução de 1,47% no teor de D-glucose para este bagaço. Entretanto, podem ter sido formadas unidades estruturais maiores que a D-glucose, como oligossacarídeos com diferentes graus de polimerização e celobiose. Segundo GRASSIM & FAQUEMBERGUE [13] a degradação da celulose foi mais eficiente quando o revestimento de xiloglucana foi removido por uma endoglucanase com atividade xiloglucanase.

A pectina expressa como pectato de cálcio, diminuiu em 23,35% para o bagaço liquefeito. Este valor representa a atividade da poligalacturonase sobre a região lisa das substâncias pécicas também denominada de homogalacturonana. Entretanto, não significa que será verificado um aumento nas mesmas proporções para o ácido D-galacturônico, pois a enzima pode quebrar a cadeia de pectina em várias regiões formando colóides como arabinanas, arabinogalactanas e ramnogalacturonanas, além de dímeros e trímeros de ácido D-galacturônico. ENDREß [11] determinou teores de pectina entre 10-15%, em base seca, para bagaço de maçã.

As substâncias pécicas são formadas por frações interligadas: a ramnogalacturonana I e II e a homogalacturonana. De acordo com MCNEIL *et al.* [22], o grau de polimerização da ramnogalacturonana I é de aproximadamente 2.000, sendo composta por resíduos de ácido D-galacturônico, L-ramnose, D-galactose, L-arabinose e pequenas quantidades de L-fucose. As homogalacturonanas são polímeros formados por unidades de ácido D-galacturônico ligadas em $\alpha(1\rightarrow4)$.

A parede celular das dicotiledôneas é composta por aproximadamente 20% de hemicelulose, que é representada em grande parte pela xiloglucana. Este polímero é composto por uma cadeia principal formada por resíduos de D-glu-

TABELA 6 – Caracterização dos bagaços em base seca.

Processo	Cinzas (%)	Extrato Etéreo (%)	Nitrogênio Total (%)	Proteína Total (%)	Pectina (%)	Fibra Alimentar Total (%)
Prensagem	1,66 ^a ± 0,02	1,56 ^a ± 0,14	0,42 ^a ± 0,01	2,65 ^a ± 0,02	13,15 ^a ± 1,3	31,91 ^a ± 1,06
Liquefação	1,41 ^b ± 0,03	2,53 ^b ± 0,17	0,57 ^b ± 0,01	3,57 ^b ± 0,01	10,08 ^b ± 0,94	31,98 ^a ± 1,83

^{a,b} – diferença significativa ao nível de 95% de confiança (Tukey, 5%).

TABELA 7 – Proporção dos açúcares neutros presentes nos bagaços, obtidos por prensagem e liquefação.

	Ramnose (%)	Fucose (%)	Arabinose (%)	Xilose (%)	Manose (%)	Galactose (%)	Glucose (%)
Prensagem	0,81	0,74	9,20	4,16	14,12	5,55	65,42
Liquefação	0,81	0,96	8,11	5,14	13,15	7,88	63,95

cose ligados em $\beta(1\rightarrow4)$, com cadeias laterais de D-xilose adicionada de D-galactose e L-fucose [22].

Os açúcares L-ramnose e L-arabinose encontrados nos bagaços podem ser provenientes da ramnogalacturonana I, sendo que não houve liberação de L-ramnose por parte do processo de liquefação para a fração solúvel e para a L-arabinose somente uma diminuição 1,09% foi detectada.

A molécula de D - galactose encontrada nos bagaços pode ser proveniente dos polímeros ramnogalacturonana I e da xiloglucana. Os galactanos são formados por resíduos de D - galactose ligados em $\beta(1\rightarrow4)$ ou $\beta(1\rightarrow3)$ com ramificações $\beta(1\rightarrow6)$. Sua importância no que concerne às fibras alimentares está no fato de que são fontes abundantes de D - galactose e podem ser importantes na dieta de pacientes que possuem deficiência de galactose-1-fosfato-uridil transferase [6].

O galactomanano, polissacarídeo típico presente na fração celulose e hemicelulose, é formado por uma cadeia principal de D-manose ligada em $\beta(1\rightarrow4)$ com graus variados de ramificação com galactose ligada em $\alpha(1\rightarrow6)$ [6]. O bagaço obtido pela liquefação apresentou uma diminuição de 0,97% nos teores de D-manose em relação ao bagaço prensado.

A D-xilose é um monossacarídeo oriundo da xiloglucana. Os valores detectados para este açúcar demonstram que não houve atividade de xiloglucanase no complexo enzimático. Com esta constatação, é possível levantar a hipótese de que a celulose não foi extensivamente hidrolisada em suas unidades estruturais por não haver no complexo de enzimas uma atividade secundária de xiloglucanase [13].

De acordo com KRAVTCHENCKO *et al.* [17], a L-fucose, apiose e alguns outros açúcares raros foram encontrados como constituintes traços em certas substâncias pécicas, mas não há informação disponível sobre sua localização estrutural. O monossacarídeo L-fucose pode ser encontrado na fração ramnogalacturonana I da pectina e nas cadeias laterais da xiloglucana. Em estudos sobre a composição monossacarídica da fração pécica da maçã, foram encontrados elementos traços de L-fucose, como relatam CAPEK, RENARD & THIBAUT [7]. Os teores de L-fucose encontrados nos bagaços provenientes da liquefação e prensagem podem ser provenientes das cadeias laterais da xiloglucana, e podem estar relacionados com a cultivar de maçã utilizada no presente experimento.

O bagaço proveniente do processo de liquefação, após passar por etapas de desidratação e moagem, poderá ter várias aplicações tecnológicas. Pelo seu elevado teor de fibra alimentar, com 1/3 de pectina bem como pelas suas demais características químicas, poderá ser aplicado em biscoitos, pães, barra de cereais e até mesmo em produtos lácteos.

De acordo com PROTZEK, FREITAS & WASZCZYNSKYJ [27] já foram realizados estudos visando à aplicação do bagaço seco de maçã, depois de transformado em farinha, em produtos de panificação como pães, biscoitos, "cookies", "muffins" e massas alimentícias. Biscoitos amanteigados foram elaborados com 20, 30, 40 e 50% de substituição de

farinha de trigo por farinha obtida com bagaço de maçã, todas as formulações foram submetidas à análise sensorial e obtiveram bons índices de aceitação, sendo que a formulação com 20% de farinha de bagaço de maçã obteve nota 7,17 na escala hedônica.

De acordo com CHEN *et al.* [8], a fibra de maçã apresentou uma maior capacidade de hidratação, quando comparada ao farelo de trigo e aveia. Foi encontrado por PROTZEK, FREITAS & WASZCZYNSKYJ [27] o valor de 4,78 g de água/g de amostra seca para o bagaço de maçã, quando avaliado sua capacidade de absorção de água.

A contaminação microbiológica do bagaço liquefeito transformado em farinha foi avaliada, conforme apresentado na Tabela 8 em comparação com os padrões determinados pela Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária [5].

TABELA 8 - Perfil microbiológico do bagaço liquefeito transformado em farinha.

	<i>Bacillus cereus</i>	Coliformes a 45 °C	<i>Salmonella</i> sp.	Bolores e Leveduras
Bagaço	<10,0 UFC.g ⁻¹	<1,0 NMP.g ⁻¹	Ausência em 25 g	<10,0 UFC.g ⁻¹
Padrão microbiológico	-	10 ² NMP.g ⁻¹	Ausência em 25 g	-

Ao comparar os resultados obtidos com os padrões legais foi verificado que o bagaço de maçã, após 5 meses de armazenamento em temperatura ambiente manteve boa qualidade microbiológica, podendo ser aplicado em produtos alimentícios sem causar riscos à segurança alimentar.

4 - CONCLUSÕES

- Os padrões estabelecidos com a melhor condição de extração de suco de maçã por liquefação enzimática foram, tempo de 75 min, concentração da enzima de 0,1 mL.Kg⁻¹ e 50 °C de temperatura;
- O processamento de suco de maçã por liquefação possibilitou um rendimento de 83,5% com 16,5% de bagaço, enquanto que o processamento por prensagem resultou num rendimento de 64,5%, com 35,5% de bagaço, com 19%, portanto, favorecendo o processo enzimático;
- O suco obtido por liquefação enzimática apresentou valores mais elevados de acidez, cinzas, sólidos solúveis totais, cinzas, nitrogênio e proteínas totais e compostos fenólicos do que o obtido pelo processamento de prensagem, não diferindo, todavia, significativamente, nos teores de açúcares totais;
- O processamento de suco de maçã por liquefação enzimática levou à produção de um bagaço que apresentou maiores teores de cinza, de extrato etéreo e de nitrogênio total do que o liberado pelo processo de prensagem,

não diferindo, todavia, nos teores de fibras alimentares incluindo pectinas;

5. O bagaço produzido se encontrava dentro dos padrões microbiológicos preconizados pela legislação;
6. Os sucos obtidos pelos dois processos apresentaram praticamente as mesmas proporções de açúcares neutros relacionados à parede celular; e
7. O processo de liquefação enzimática apresenta vantagens práticas sobre o processo de extração por prensagem, principalmente com relação ao maior rendimento do suco e à menor liberação do bagaço.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ACAR, J. The production of cloudy apple néctar using total liquefaction enzymes. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v. 8, p. 314-317, 1999.
- [2] ALBUQUERQUE, P. M.; ALBUQUERQUE, C. T.; AMANTE, E. R. Aplicações para os resíduos sólidos da obtenção do suco de maçã. **Engarrafador Moderno**, v. 12, p. 12-16, 2002.
- [3] AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **AOAC Official Method 985.29**: Total dietary fiber in foods. [s.l.], 2000.
- [4] BERREGI, I.; SANTOS, J. I.; DEL CAMPO, G.; MIRANDA, J. I. Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by HNMR. **Talanta**, v. 61, p. 139-145, 2003.
- [5] BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padrões Microbiológicos para alimentos**. Disponível em: <http://anvisa.gov.br>. Acesso em: 18 nov. 2005.
- [6] BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A. S. **Polissacarídeos da parede da célula vegetal e sua importância como fibras alimentares**. In: LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Fibra Alimentar em Iberoamérica, 2000. Disponível em <http://ibot.sp.gov.br>. Acesso em: 6 nov. 2005.
- [7] CAPEK, P.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J-F. Enzymatic degradation of cell walls of apples and characterization of solubilized products. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 6, p. 337-340, 1995.
- [8] CHEN, H.; RUBENTHALER, G. L.; LEUNG, H. K.; BARANOWSKI, J. D. Chemical, physical, and baking properties of apple fiber compared with wheat and oat bran. **Cereal Chemistry**, v. 65, p. 244-247, 1988.
- [9] CZELUSNIACK, C.; OLIVEIRA, M. C. S.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. C.; WOSIACKI, G. Qualidade de maçãs comerciais produzidas no Brasil: aspectos físico-químicos. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 6, p. 25-31, 2003.
- [10] DRILLEAU, J.-F.; MASSIOT, P.; LE QUÉRÉ, J. M. Biochemical characteristics of apple juices and fermented from musts obtained enzymatically. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v. 4, p. 108-112, 1994.
- [11] ENDREß, H.-U. High quality resulting from product integrated environment protection-PIUS. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v. 10, p. 273-276, 2000.
- [12] GIORDANO, S. R. Gestão ambiental no sistema agroindustrial. In: **Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares**. São Paulo: Pioneira, v. 7, p. 255-281, 2002.
- [13] GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Apple pomace liquefaction: a new technology. **Fruit Processing**, Oberhonnefeld, v. 12, p. 490-495, 1996.
- [14] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3.ed. São Paulo: O Instituto, 1985.
- [15] JORGE, J. dos S.; MONTEIRO, J.B.R O efeito das fibras alimentares na ingestão, digestão e absorção dos nutrientes. **Nutrição Brasil**, v. 4, n. 4, p. 218-229, 2005.
- [16] KERTESZ, Z. I. **The pectic substances**. New York: Interscience, 1951.
- [17] KRAVTCHENKO, T. P.; VORAGEN, A. G. J.; PILNIK, W. Analytical comparison of three industrial pectin preparations. **Carbohydrate Polymers**, Grã Bretanha, v. 18, p. 17-25, 1992.
- [18] LACHMAN, J.; PIVEC, V.; ORSÁK, M.; KUČERA, J. Enzymic browning of apples by polyphenol oxidases. **Czech Journal of Food Science**, v. 18, n. 6, p. 213-218, 1992.
- [19] LANZARINI, G.; PIFFERI, P. G. Enzymes in the fruit juice industry. In: CANTARELLI, C.; LANZARINI, G. **Biotechnology applications in beverage production**. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 189-222.
- [20] LEE, K. W.; KIM, Y. J.; KIM, D. O.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6516-6520, 2003.
- [21] MARCON, M. V. **Extração e caracterização de pectinas obtidas de farinha de bagaço de maçã**. 2004, 150f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- [22] McNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cell walls of plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 625-663, 1984.
- [23] MIHALEV, K.; SCHIEBER, A.; MOLLOV, P.; CARLE, R. Effect of mash maceration on the polyphenolic content and visual quality attributes of cloudy apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 7306-7310, 2004.
- [24] NETO, B. de B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.
- [25] PILNIK, W.; VORAGEN, A. G. J. Pectic enzymes in fruit and vegetable manufacture. In: NAGADAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in food processing**. New York: Academic Press, 1993.
- [26] POLL, L. The effect of pulp holding time and pectolytic enzyme treatment on the acid content in apple juice. **Food Chemistry**, v. 47, p. 73-75, 1993.
- [27] PROTZEK, E. C.; FREITAS, R. J. S. de; WASCZYNSKJ, N. Aproveitamento de bagaço de maçã na elaboração de biscoitos ricos em fibra alimentar. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 263-275, 1998.

- [28] RAUPP, D. S.; CARRIJO, K. C. R.; COSTA, L. L. F. C.; MENDES, S. D. C.; BANZATTO, D. A. Propriedades funcionais-digestivas e nutricionais de polpa-refinada da maçã. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 395-402, 2000.
- [29] SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determinations of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 910, p. 265-273, 2001.
- [30] SCHOLS, H. A. et al. The effect of the manufacturing method on the characteristics of apple juice. **Z Lebensm Unters Forsch**, v. 192, p. 142-148, 1991.
- [31] SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1995. (Manual Técnico, nº 14).
- [32] SILVA, N. C. C. **Produto vinificado espumante de maçã obtido com células imobilizadas**. 1997, 102f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- [33] SILVA, N. C. C. **Avaliação do processo de desalcolização de bebida obtida por fermentação controlada de suco de maçã**. 2004, 107f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- [34] SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 195, p. 19-23, 1952.
- [35] SPAGNUOLO, M.; CRECCHIO, C.; PIZZIGALLO, M. D. R.; RUGGIERO, P. Synergistic effects of cellulolytic and pectinolytic enzymes in degrading sugar beet pulp. **Bio-resource Technology**, Grã Bretanha, v. 60, p. 215-222, 1997.
- [36] WANG, H. J.; THOMAS, R. L. Direct use of apple pomace in bakery products. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 618-620, 1989.
- [37] WILL, F.; SCHULZ, K.; LUDWIG, M.; OTTO, K. DIETRICH, H. The influence of enzymatic treatment of mash on the analytical composition of apple juice. **Internacional Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 653-660, 2002.

6 - AGRADECIMENTOS

À UEPG e à UTFPR, pelo uso da infra-estrutura de laboratório, ao CNPq pelas bolsas concedidas, à Estação Experimental de São Joaquim da EPAGRI pela doação das maçãs, à LNF de Bento Gonçalves pela cessão das enzimas comerciais.