



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA - 2019

Reutilização da biomassa celular na produção de hidromel.

Adriana Soares Anunciação¹; Ernesto Acosta Martinez²; Sílvia Maria Almeida de Souza³

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anunciacao.adrianasoares85@gmail.com
2. Orientador, DTEC, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ernesto.amartinez@yahoo.com.br
3. Colaboradora, DTEC, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ssalmeida@yahoo.com.br

PALAVRAS-CHAVE: mel, tamarindo, *S. cerevisiae*, viabilidade celular

INTRODUÇÃO

A tamarindo é uma matéria-prima valorizada no mundo por causa de seus componentes nutricionais que contribuem para a saúde humana. O seu fruto apresenta significativo nível de vitaminas C, E e do complexo B, além de cálcio, ferro, fósforo, potássio, manganês e fibra dietética. Há também compostos orgânicos que o tornam um poderoso antioxidante e um agente anti-inflamatório (Urszula, 2014). O hidromel é uma bebida fermentada a partir do mel, água e leveduras, cujo teor alcoólico varia entre 4 e 14% (v/v) que pode ser suplementado com ácido cítrico, ervas, especiarias, polpas ou suco de frutas. A produção de hidromel ainda ocorre de maneira empírica e artesanal, demonstrando a necessidade de pesquisas que visem o aprimoramento do processo de fabricação, considerando desde a seleção do agente da fermentação, formulação do mosto, estudo dos parâmetros fermentativos, bem como a definição de padrões de identidade e qualidade do produto final (Sroka & Tuszynski, 2007). As fermentações clássicas podem ser realizadas com reutilização de células da levedura *S. cerevisiae*, evitando assim os custos de consumo adicional de matéria prima e demanda de tempos mais longos de fermentação relacionados com a propagação do inóculo (Morais, 2013). O presente trabalho tem como objetivo avaliar a reutilização de leveduras no processo de produção de hidromel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada polpa industrial de tamarindo vendida nos supermercados de Feira de Santana - BA. Foram realizadas as análises físico-químicas da polpa tais como pH, acidez, vitamina C e cinzas (IAL, 2008), carboidratos totais (Dubois *et al.*, 1956), redutores (Nelson, 1944), e teor de sólidos solúveis (°Brix) por refratômetro.

Preparo e Tratamento do mosto de mel e crescimento de inóculo: O mel foi diluído para 30 °Brix com água destilada suplementado com extrato de levedura (0,25% m/v) e peptona (1% m/v) e submetida a esterilização a 1 atm durante 15 min. Os inóculos da *S. cerevisiae* (Montrachet e AWRI) foram preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio com pH ajustado para 5 pela adição de HCL 3 M. O crescimento foi realizado em agitador rotatório nas condições de 30°C, 200 rpm durante 24 h.

Processo de fermentação: As fermentações foram realizadas utilizando 30% de polpa de tamarindo com relação ao mosto de mel, concentração de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) (0,3 g/L) e cloreto de magnésio (MgCl₂) (0,05 g/L). Para avaliar as formulações, os mostos (pH 5) foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL e inoculados com 1 x 10⁶ cel/mL de *S. cerevisiae* (Montrachet e AWRI) seguido da incubação a temperatura 30°C sem agitação em B.O.D.

Ativação ou revitalização das leveduras entre fermentações: Foram avaliadas as condições de estocagem das leveduras entre os ciclos de fermentação, acompanhadas por medidas de viabilidade e aumentos de biomassa. No início do próximo ciclo de fermentação as células foram lavadas 3 vezes em água deionizada estéril e re-suspensas na concentração desejada para iniciar uma nova fermentação. Foram realizados quatro ciclos fermentativos. Durante a fermentação foram realizadas as análises de concentração de sólidos solúveis (°Brix), concentração de células por contagem em câmara de Neubauer e viabilidade pelo uso de azul de metileno; densidade e etanol em densímetro automático DDM 2911 Rudolph Research Analytical.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

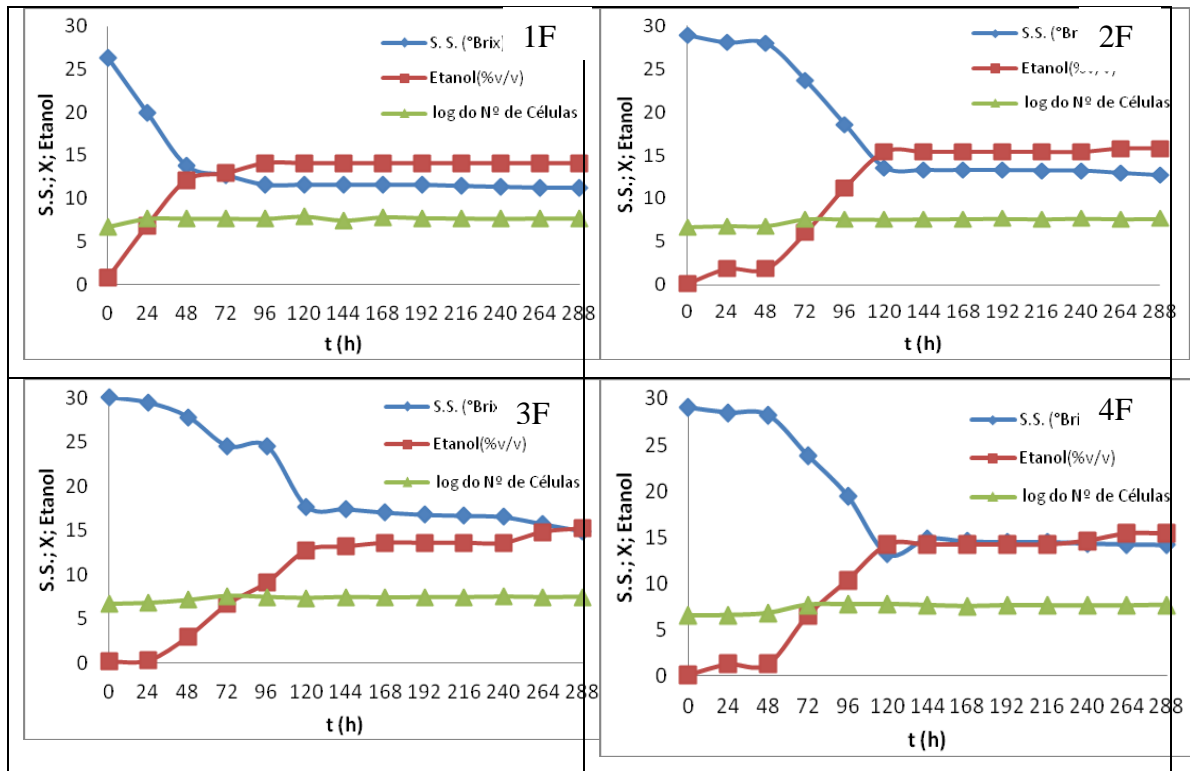
A polpa de tamarindo teve as seguintes características físico-químicas: O valor de pH da polpa comercializada foi de 2,78 próximos a 2,5 e 2,95 encontrados por Canuto *et al.* (2010) e Hamacek (2012), respectivamente. A polpa de tamarindo com pH superior (3,52) foi reportada por Batista *et al.* (2013). A legislação brasileira indica padrões de pH para polpas de manga, uva, cajá, maracujá e caju porém não existe padrão para polpas de tamarindo (BRASIL, 2000). A polpa utilizada neste trabalho possui um teor de sólidos solúveis 4 vezes menor que os valores reportados por Hamacek (2012). Diversos fatores como clima, pluviosidade durante o cultivo e adição de água durante o processo de fabricação podem ter efeito sobre o teor de sólidos solúveis nas polpas. O tempo de maturação e as variedades de tamarindo também são importantes fatores a serem considerados para o aproveitamento industrial do fruto (BATISTA *et al.*, 2015). A acidez titulável da polpa comercializada foi menor que o valor encontrado por Canuto *et al.* (2010) e maior que o valor encontrado por Hamacek (2012). Este parâmetro é o responsável pelo sabor ácido ou azedo dos frutos sendo importante na análise do estado de conservação de um produto alimentício. Dentre os ácidos mais encontrados podem estar o málico, tartárico, cítrico e pirúvico que por serem voláteis contribuem para o aroma da fruta (BATISTA *et al.*, 2013). Como consequência do menor valor de SS e maior AT resultou em uma menor relação SS/AT (0,77) quando comparada com os valores 2,38 e 3,27 reportados por Hamacek (2012) e Batista *et al.* (2013), respectivamente. Esta relação é uma das melhores formas para avaliar o sabor das frutas que ocorre geralmente como resultado do balanço de açúcares e ácidos sendo mais representativo que a medição dos dois parâmetros isoladamente (BATISTA *et al.*, 2013). O teor de vitamina C da polpa comercializada foi maior que os teores encontrados por Canuto *et al.* (2010) e Batista *et al.* (2013), que foram 0,1 e 0,89 respectivamente. As diferenças podem ser atribuídas à uma degradação menos intensa da vitamina com o período de estocagem, o contato com o oxigênio atmosférico ou com a ação da luz. Os teores de cinzas e proteínas resultaram em 0,10% e 1,30% respectivamente, sendo inferiores aos valores de 2,37 e 6,09, respectivamente verificados por Hamacek (2012).

O consumo de substrato, o crescimento celular e a produção de etanol durante as quatro fermentações de mosto de mel 30 °Brix com reaproveitamento de *S. cerevisiae* Montrachet são apresentados na Figura 1.

Constatou-se um 47,5% de consumo de substrato com a produção de $4,5 \cdot 10^7$ cel/mL e de 12,1% v/v de etanol na primeira batelada de fermentação por *S. cerevisiae* Montrachet após as 48 h (Figura 1). Foram constatados baixos consumos de substrato (3,4; 7,3 e 2,7%), produções de etanol (1,9; 3 e 1,3% v/v) e de concentrações celulares ($6,2 \cdot 10^6$; $1,32 \cdot 10^7$ e $6,7 \cdot 10^6$ cel/mL) nas bateladas 2, 3 e 4 de fermentação, respectivamente após 48 h. Entretanto, os valores de consumo de substrato (57,2; 56,2; 50,3 e 51%), concentração celular ($4,8 \cdot 10^7$; $4,5 \cdot 10^7$; $2,9 \cdot 10^7$ e $4,8 \cdot 10^7$ cel/mL) e de produção de etanol (14,1; 15,8; 15,2 e 15,4% v/v) nas quatro bateladas foram próximos a partir das 168 h se mantendo praticamente estacionários até o final da fermentação (288 h) (Figura 1). Com o uso de 30% de polpa de tamarindo na suplementação do meio de fermentação o comportamento cinético dos processos por *S. cerevisiae* Montrachet foi diferente constando-se menores valores de consumo de substrato (18,1; 5,4; 23,3 e 1,6%) e de produção de etanol (5,2; 1,8; 6,1 e 0,8% v/v) nas bateladas 1, 2, 3 e 4, respectivamente após 48 h de fermentação quando comparadas com o meio sem suplementação de polpa de tamarindo. Nas bateladas 1 e 3 foi constatado um aumento do consumo de substrato até valores de 48,3% e de 57,7% assim como da produção de etanol (12,3 e 14,1% v/v) após as 120 h. Este comportamento não foi verificado nas bateladas 2 e 4 onde

ainda neste tempo de fermentação não foi verificada a produção de hidromel, caracterizada por um teor de etanol maior que 4% v/v. Valores de consumo de substrato (56,3; 33,3; 62,4 e 46,5%), de concentração celular ($3,4 \cdot 10^7$; $2,6 \cdot 10^7$; $3 \cdot 10^7$ e $5,1 \cdot 10^7$ cel/mL) e de produção de etanol (13,6; 8,6; 14,5 e 11,9% v/v) foram verificados após 288 h nas bateladas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Assim, foi possível obter produtos com características de hidromel em todas as bateladas com o reaproveitamento ou reciclagem da cultura (levedura).

Figura 1. Consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol durante as quatro bateladas fermentativas (1F até 4F) de mosto de mel (30°Brix) com o reaproveitamento de *S. cerevisiae* Montrachet.



Constatou-se valores de 39,6% de consumo de substrato, concentração celular de $2,9 \cdot 10^7$ cel/mL com a produção de 11,1% v/v de etanol na primeira batelada de fermentação de mosto de água e mel por *S. cerevisiae* AWRI após 48 h de fermentação. Foram constatados baixos consumos de substrato (0,3; 3,3 e 7,9%) e produções de etanol (0,2; 1,9 e 2,4% v/v) nas bateladas 2, 3 e 4 de fermentação, respectivamente após 48 h. Até este tempo de fermentação, a levedura não foi capaz de produzir um fermentado contendo o teor mínimo de etanol característico do hidromel. Aumentos no consumo de substrato até valores de 53,0; 33,5; 36,3 e 48,7%, na concentração celular até valores de $5,3 \cdot 10^7$; $3,4 \cdot 10^7$; $3,7 \cdot 10^7$ e $3,8 \cdot 10^7$ cel/mL e de produção de etanol até 14,4; 10,3; 11,4 e 12,7% v/v foram verificados após 120 h de fermentação nas bateladas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Com o aumento do tempo de fermentação até 288 h nas bateladas 1, 2, 3 e 4 foi verificado um aumento nos consumos de substrato até valores de 53,6; 46,7, 48,3 e 52,7% com aumentos da produção de etanol até 14,4; 13,9; 14,4 e 13,9% v/v respectivamente. A suplementação do meio com 30% de polpa de tamarindo produziu uma diminuição do metabolismo de *S. cerevisiae* AWRI na produção de etanol. Consumos baixos de substrato (2,4; 2,3; 35,3 e 1,2%), de concentração celular ($6,9 \cdot 10^6$; $66,6 \cdot 10^6$; $5,1 \cdot 10^7$ e $3,1 \cdot 10^6$ cel/mL) e de produção de etanol (1,3; 1,8; 9 e 0,3% v/v) foram verificados após 48 h de fermentação. Um aumento no consumo de substrato até 56,1; 43,6; 56,6 e 56,1%, na concentração celular ($8,6 \cdot 10^7$; $5,2 \cdot 10^7$; $5,5 \cdot 10^7$ e $5,9 \cdot 10^7$ cel/mL) e da produção de etanol até 13,2; 11,8; 13,2 e 12,6% v/v foi verificado ao final de cada processo de fermentação (288 h) nas bateladas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

Os baixos valores de consumo de substrato e de produção de etanol verificados ao início das bateladas 2, 3 e 4 podem estar relacionados com o longo tempo em que as leveduras estiveram em contato com o meio de fermentação assim precisaram de tempo mais longo para se adaptar ao novo meio de fermentação.

Maiores valores de produtividade volumétrica em etanol (1,86 e 1,79 g/L.h) foram obtidos na primeira batelada de fermentação de meio sem adição de polpa com inóculo inicial de *S. cerevisiae* Montrachet e AWRI, respectivamente. Maiores valores de fator de conversão de substrato em produto (0,48-0,49 g/g) e de eficiência de fermentação (95%) foram obtidos sem a adição de polpa ao mosto fermentado por *S. cerevisiae* Montrachet. Maiores valores de produtividade volumétrica entre 0,67 e 0,93 g/L.h, de fator de conversão de substrato em etanol entre 0,38 e 0,40 g/g e de eficiência da fermentação entre 77 e 79% foram verificados nas fermentações dos meios não suplementado com polpa de tamarindo após 120 h por *S. cerevisiae* AWRI.

Estudos posteriores poderão ser desenvolvidos para avaliar o comportamento cinético do processo fermentativo com o uso de menor tempo de fermentação em cada batelada, evitando o contato da levedura com o fermentado, assim como realizar o reaproveitamento de células na segunda, terceira e quarta batelada de fermentação usando maior concentração inicial de inóculo o que corresponderia com a concentração obtida no tempo final de cada batelada anterior. Assim, seria possível diminuir os custos do processo pela diminuição do tempo de fermentação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível realizar o reaproveitamento da massa celular em bateladas sucessivas de fermentação para a produção de hidromel. O uso de polpa de tamarindo na suplementação do meio de fermentação produziu uma diminuição na produtividade volumétrica em etanol, no fator de rendimento de substrato em etanol e na eficiência do processo fermentativo. O uso de menores tempos de fermentação assim como de maior concentração celular a partir da segunda batelada poderiam contribuir para a diminuição dos custos do processo e o aumento dos parâmetros fermentativos.

REFERÊNCIAS

- Batista, Â. G.; Oliveira, B. D'; Oliveira, M. A.; Guedes, T. J.; Silva, D. F.; Pinto, N. A.; Villela, D. 2013. Parâmetros de qualidade de polpas de frutas congeladas: uma abordagem para produção do agronegócio familiar no Alto Vale do Jequitinhonha. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.7, n.4, p.49-54, dez.
- BRASIL. 2000. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 01, de 07 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 09 mar. 2011.
- Canuto, G. A. B.; Xavier, A. A. D.; Neves, L. C.; Benassi, M. T. 2010. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.4, p.1196-1205.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28, p.350-356, 1956.
- Hamacek, F. R. 2012. *Caracterização física, química e valor nutricional de espécies frutíferas do Cerrado de Minas Gerais*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- Morais, M. R. Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas. 2013. 132 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/100766>>.
- Nelson, N. A. Photometric adaptation of the Somogy method for determination of glucose. *Journal Biology Chemistry*, v.153, p.357, 1944.
- Sroka, P; Tuszniski, T. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*, n. 104, p. 1250-1257, 2007.
- Urszula, T.; López, J.F.; Álvarez, J.A.P.; Martos, M.V. Chemical, physicochemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of rich-fibre powder extract obtained from tamarind (*Tamarindus indica* L.). *Industrial Crops and Products*, v.55, p.155- 162, 2014.