



Universidade Federal de São João Del Rei
Engenharia de Bioprocessos

**Produção de fermentado de abacaxi (*Ananas comosus* L),
utilizando-se leveduras *Saccharomyces sp* comerciais ou
isoladas da própria fruta**

Joanna Mara de Miranda Magalhães

Orientador: José Carlos de Magalhães

Ouro Branco

Agosto/2013



**Produção de fermentado de abacaxi (*Ananas comosus* L)
utilizando-se leveduras *Saccharomyces sp* comerciais ou
isoladas da própria fruta**

Joanna Mara de Miranda Magalhães

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao como requisito parcial às exigências do
curso de Bacharelado em Engenharia de
Bioprocessos do Departamento de Química,
Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João Del Rei.

Orientador: José Carlos de Magalhães

Ouro Branco, Agosto /2013



Universidade Federal de São João Del Rei
Curso de Engenharia de Bioprocessos

**Produção de fermentado de abacaxi (*Ananas comosus L*)
utilizando-se leveduras *Saccharomyces sp* comerciais ou
isoladas da própria fruta**

Joanna Mara de Miranda Magalhães

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

José Carlos Magalhães

Nome 1- Orientador

Bruna Mara Aparecida Carvalho

Nome 2 – Examinador 1

Edson Romano Nucci

Nome 3 – Examinador 2

Ouro Branco, 05/08/2013

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Produção de fermentado de fruta	3
2.1.1. Preparo do inóculo	5
2.1.2. Preparo do mosto	9
2.1.3. Sulfitação e Chaptalização	10
2.1.4. Fermentação alcoólica	11
2.1.5. Tráfega, Filtração e armazenamento	12
2.2. Análises Físico- Químicas	13
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	15
3.1. Preparo do inóculo	15
3.1.1. Inoculação em placa	15
3.1.2. Coloração Gram, replaqueamento	15
3.1.3. Reativação dos micro-organismos	16
3.1.4. Centrifugação	17
3.2. Preparo do biorreator	17
3.3. Processo fermentativo	18
3.3.1. Obtenção do mosto	18
3.3.2. Inoculação e início da fermentação	19
3.4 Análises	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Prospeção de micro-organismo	21
4.2. Fermentação	24
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

Resumo

O setor frutícola representa um grande desperdício de matéria-prima nas áreas agrícolas do país. As bebidas fermentadas de frutas constituem produtos promissores, pois contribuem para a redução de perdas pós-colheita de frutos perecíveis e representam oportunidades para novas tecnologias e novos mercados. O presente trabalho teve como objetivo produzir a bebida alcoólica fermentada a partir de abacaxi (*Ananas comosus* L), sendo que para isso, foram isoladas leveduras (*Saccharomyces* sp) tanto a partir de fermento biológico industrial, como da própria fruta “*in natura*”. Análises realizadas durante o processo fermentativo por um período de aproximadamente 21 dias permitiram acompanhar a redução do grau Brix e a formação de etanol, o que foi comprovado no biorreator contendo apenas leveduras de fermento industrial e naquele contendo uma mistura dessa com a levedura isolada do abacaxi, com o teor alcóolico de 8 °GL (%v/v) no reator contendo leveduras de fermento biológico industrial de 9 °GL (%v/v) no reator contendo a mistura de leveduras. Os resultados, quanto à produção alcoólica foram semelhantes e estão de acordo com dados da literatura.

1. Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas tropicais e, graças às suas condições de solo e de clima diversificadas, pode também dedicar-se ao plantio de fruteiras de clima temperado e subtropical, produtos com elevado potencial para o mercado externo (MORGADO *et. al.*, 2004).

No Brasil, a produção de frutas ocorre durante todo o ano e, além da produção abundante, existe também uma enorme perda no período pós-colheita. Grande parte dessas perdas é reflexo do pouco conhecimento de como o excesso da produção poderia ser utilizado. As perdas pós-colheita, na sua maioria, geram prejuízos o que se faz procurar uma alternativa para incrementar a renda do agricultor. Uma das alternativas para minimizar essas perdas é a produção de bebida alcoólica a partir de frutas (VIEIRA, 2012).

O abacaxi é uma fruta apreciada por seu aroma e sabor característico, apresenta destaque com qualidade sensorial diferenciada e potencial de exportação em expansão. O abacaxi é conhecido pela denominação *Ananas comusus* (L.) e pertence à família *Bromeliaceae* (FACUNDO, 2009).

O abacaxi é consumido, sobretudo, sob a forma de compotas e sucos, além disso, presta-se também para a fabricação de doces cristalizados, sorvetes, cremes, gelatinas e pudins (FACUNDO, 2009). A qualidade dos frutos é atribuída às suas características físicas externas (coloração da casca, tamanho e forma do fruto), e internas conferidas por um conjunto de constituintes físico-químicos da polpa, responsáveis pelo sabor, aroma e valor nutritivo (FACUNDO, 2009).

Apesar da abundância do cultivo dessa fruta no Brasil, o aproveitamento industrial ainda é pequeno frente ao consumo da fruta in natura, sendo necessária a busca de alternativas para o seu uso, visando ao aproveitamento do excesso de safras, principalmente pela indústria, para a fabricação de produtos não tradicionais, como por exemplo vinhos, em função da concentração de açúcares fermentescíveis, acidez e características sensoriais (ARAÚJO *et al.*, 2009).

O abacaxi, em sua composição química, é constituído em média por 89,9% de água, 0,3% de proteínas, 0,5% de lipídeos, 5,8% de glicídios, 3,2% de celulose e 0,3% de sais (BORGES *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, os vinhos são preparados pela fermentação de mostos de uvas, que produzem etanol e outros produtos metabólicos (ARAÚJO *et al.*, 2009). No entanto, vinho pode ser obtido a partir de outras frutas, recebendo o nome de fermentado.

Este trabalho teve como objetivo produzir o fermentado de abacaxi (*Ananas comosus* L), utilizando-se leveduras (*Saccharomyces* sp) obtidas a partir de fermento biológico comercial e da própria fruta. Além disso, foram realizadas análises do processo fermentativo e das características físico-químicas dos produtos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produção de Fermentado de fruta

O fermentado é uma bebida da fermentação alcoólica do mosto de qualquer fruta que apresente na sua composição açúcares fermentescíveis (ASQUIERI, RABÊLO, SILVA, 2008).

Segundo a Legislação vigente, fermentado de fruta é a bebida com graduação alcoólica de quatro a quatorze por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida da fermentação alcoólica do mosto de fruta sã, fresca e madura. Fermentados que não são provenientes da uva, devem, obrigatoriamente, ser rotulados com a denominação fermentado acompanhado do nome da fruta da qual se originou, como exemplos: fermentado de abacaxi, fermentado de laranja, fermentado de caju, fermentado do figo-da-índia, entre outros, com sabores característicos de cada fruta (BRASIL, 2008).

A composição nutricional do fermentado de fruta dependerá, além da fruta empregada, que contribui nas características da bebida, da composição do mosto, tipo de inóculo, condições de fermentação e procedimentos pós- fermentação.

O fluxograma apresentado na Figura 1 mostra de uma forma geral as etapas envolvidas no processo de fermentação do mosto de frutas.

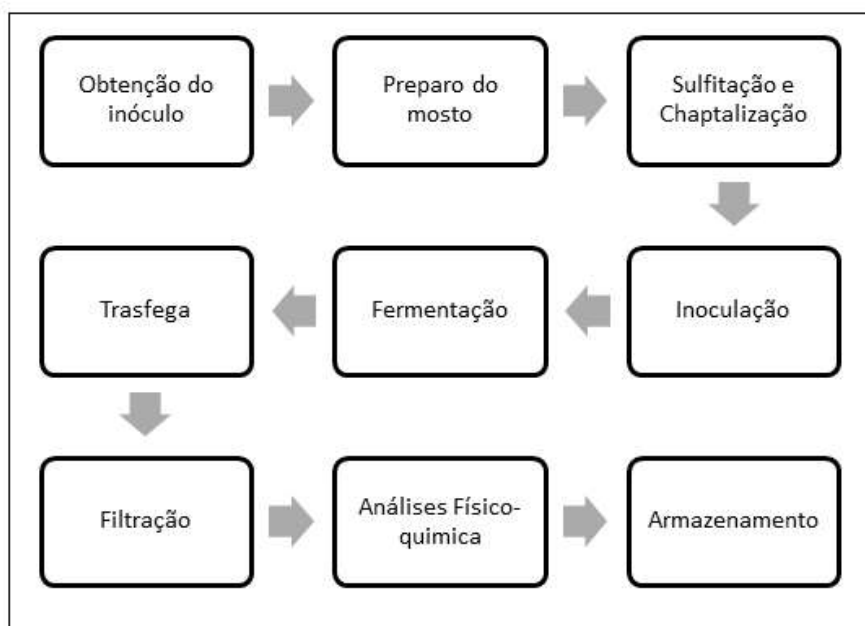


Figura 1 – Fluxograma das etapas que estão presentes no processamento de frutas para obtenção de bebidas alcoólicas fermentadas. FONTE: adaptada de VENTURINI, 2010.

O processo fermentativo é dividido em três partes: *Upstream*, Fermentação e *Downstream*.

A etapa *Upstream* consiste nos tratamentos iniciais antes da fermentação, que inclui o tratamento da matéria prima, preparo do inóculo, preparo do meio e esterilização. As características físico-químicas do meio de cultivo são de fundamental importância, não apenas para o crescimento celular como também para o rendimento em produto (BON *et al.*, 2008).

Em muitos processos fermentativos, a presença de micro-organismos estranhos denominados, genericamente, “contaminantes”, pode levar a prejuízos consideráveis. Os contaminantes podem afetar negativamente o processo, principalmente pelo fato de consumirem nutrientes do meio, competindo assim com os micro-organismos responsáveis pela fermentação desejada (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Assim, para prevenir contaminações, o bioprocesso é conduzido sob condições assépticas (BON *et al.*, 2008).

A fermentação, propriamente dita, é a transformação de substrato em produto (PACHECO, 2010). Após obtenção da bebida alcoólica, contendo além dos componentes principais – o etanol e água- outras substâncias como dióxido de carbono que se encontra dissolvido em pequenas quantidades, células de leveduras, micro-organismos, sais minerais, açúcares não fermentados e partículas sólidas em suspensão provenientes da matéria prima devem passar por tratamentos finais, etapa esta denominada, downstream, que pode ser por centrifugação ou filtração, para eliminação desses compostos indesejáveis (PACHECO, 2010).

2.1.1 Preparo do Inóculo

Os fermentos de interesse industrial pertencem ao gênero *Saccharomyces cerevisiae*. Trata-se do fermento mais abundante e o que se encontra em maior quantidade. Os fermentos selecionados se constituem primordialmente em representantes dessa espécie (MORETTO *et al.*, 1988).

A obtenção dos fermentos selecionados pode ser facilmente feita procurando-se institutos de pesquisas e universidades que isolam culturas puras de leveduras com ótimo rendimento fermentativo. Essas instituições podem fornecer ou indicar as fontes de obtenção de fermentos selecionados de diversas origens ou procedência, até mesmo oriundas de outros países (MORETTO *et al.*, 1988).

Culturas selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae* têm recebido atenção especial por apresentarem qualidades para a elaboração de bebidas alcoólicas, tais como rápida iniciação da fermentação, conversão eficiente de açúcares fermentescíveis a etanol e manutenção das células por todo período de fermentação (VENTURINI, 2010). O inóculo que será utilizado na fermentação deve apresentar uma população inicial de 10^8 células/ml, que são verificadas por contagem em câmara de Neubauer (DIAS *et al.*, 2003).

As leveduras são definidos como fungos especializados, monocelulares e desclorofilados. Do aspecto das exigências nutricionais esse grupo situa-se entre aquele que se desenvolve em substratos mais simples, constituídos por fontes de carbono e sais minerais, e aquele que exige meios mais complexos (PACHECO, 2010).

Para realização da fermentação alcoólica as linhagens selecionadas devem apresentar certos requisitos para a boa eficiência da fermentação:

- Velocidade de fermentação: a quantidade de açúcar transformado em álcool por unidade de tempo e de massa de levedura deve ser elevada;
- Resistência ao álcool: é de grande interesse a obtenção de leveduras que podem resistir a concentrações elevadas de etanol, uma vez que se pode operar

com mostos com concentrações elevadas de açúcar. Isso possibilita a obtenção de vinhos com maior teor alcoólico reduzindo os custos com a destilação;

- Eficiência da conversão: representa a capacidade da levedura de converter o açúcar em etanol;

- Resistência ao pH e antissépticos: além da resistência ao álcool, a levedura precisa tolerar o baixo pH do meio e antissépticos, uma vez que um dos recursos utilizados para combater as infecções do mosto e do vinho é baixar o pH ou adicionar antisséptico (PACHECO, 2010).

As leveduras exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar, que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, hidrogênio e oxigênio. A Tabela 1, ilustra a composição molecular de levedura comercial.

Para cultivar um micro-organismo como *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, recorre-se a um meio de cultura estéril, adicionando-se a ele uma pequena quantidade de material contendo células vivas desta levedura: a este material, dá-se o nome de inóculo e à adição do inóculo ao meio estéril denominado inoculação. Após a inoculação, o meio de cultura é incubado por tempo determinado, sob condições apropriadas de oxigenação, temperatura, etc. Durante a incubação ocorre a multiplicação do micro-organismo dando origem a uma cultura (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Tabela 1– Composição molecular de levedura comercial *Sacharomyces cerevisiae*

Constituinte	Levedura (g/100g matéria seca)
Carbono (C)	45,00 – 47,00
Hidrogênio (H)	6,00 – 6,50
Oxigênio (O)	31,00 – 32,00
Nitrogênio (N)	7,50 – 9,00
Potássio (K)	0,90 – 3,50

Fósforo (P)	1,10 – 2,00
Enxofre (S)	0,30 -0,50
Magnésio (Mg)	0,15 – 0,50
Cálcio (Ca)	0,04 – 0,90
Sódio (Na)	0,02 – 0,20
Zinco (Zn)	0,004 – 0,13
Ferro (Fe)	0,003 – 0,10
Cobre (Cu)	0,002 – 0,12
Manganês (Mn)	0,0004 – 0,0035
Cobalto (Co)	0,0005
Molibdênio (Mo)	0,000005 – 0,000009
Cloro (Cl)	0,004 – 0,10
Iodo (I)	0,00005 – 0,0004
Chumbo (Pb)	0, 0001 – 0,0007
Arsênio (As)	0,00001

(FONTE: PACHECO, 2010)

Numa cultura descontínua, as condições não permanecem ideais por muito tempo. Logo a quantidade de nutrientes começa a diminuir e produtos do metabolismo microbiano vão se acumulando. Essas modificações tem uma considerável influência sobre o crescimento dos micro-organismos. Na Figura 2 são apresentadas as fases do crescimento microbiano (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

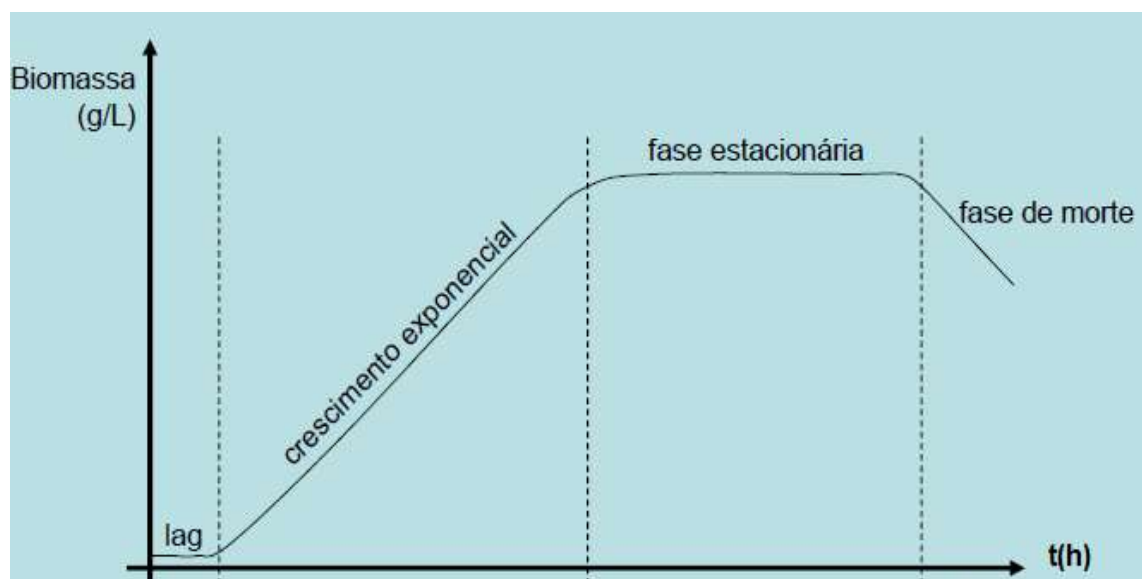


Figura 2 – Fases da curva do crescimento microbiano em sistemas fechado

A fase lag consiste em uma adaptação do micro-organismo ao meio, na qual contagem não revela aumento de número. A fase de crescimento exponencial (fase log) é a fase mais importante do crescimento microbiano. Os micro-organismos se encontram na plenitude de suas capacidades, num meio cujo suprimento de nutrientes é superior as necessidades do organismo semeado. Ao fim de certo tempo, a velocidade de crescimento vai diminuindo até atingir a fase em que o número de novos indivíduos é igual ao número de indivíduos que morre, fase denominada estacionária. Já na fase de declínio, o número de organismos que morre torna-se progressivamente superior ao dos que surgem (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Para identificação e quantificação de micro-organismos são utilizados métodos como coloração Gram e contagem em câmara de Neubauer respectivamente. Essa coloração é utilizada pois permite a detecção de bactérias contaminantes.

A concentração de células da suspensão preparada pode ser estimada através da contagem ao microscópio utilizando-se a câmara de Neubauer. Essa câmara consiste de uma lâmina de microscopia mais alta do que uma lâmina normal que mantém uma lamínula especial de quartzo exatamente a 10^{-1} mm acima do

chão da câmara. Dessa forma, quando se coloca uma solução na câmara e se cobre a mesma com a lamínula, a profundidade da solução é conhecida. Uma vez que o volume da câmara é conhecido, realiza-se a contagem de células no quadrante escolhido, estimando a quantidade de células presentes na solução (MADIGAN *et al.*, 2008).

2.1.2 Preparo do mosto

Dá-se o nome de mosto ao caldo ou suco obtido das frutas, depois de espremidas, para a elaboração dos diversos tipos de vinhos (MORETTO *et al.*, 1988).

O preparo do mosto é uma operação de importância fundamental. Quando mal preparado, leva consigo substâncias indesejáveis e outras transformações e decomposições que afetam a qualidade do vinho. As frutas, quando utilizadas completamente amadurecidas, são mais ricas em açúcar, economizando parte daquele que vai ser acrescentado para a correção do mosto para o grau alcoólico desejado e, sendo menos ácida, favorecendo a qualidade do vinho (MORETTO *et al.*, 1988).

A filtração elimina as partículas maiores, tornando o mosto adequado à multiplicação e trabalho das leveduras fermentadoras.

As frutas suculentas produzem o tipo ideal de mosto, o qual necessita apenas de algumas operações complementares para ser purificado. Existem algumas frutas, que mesmo submetidas a uma prensagem rigorosa, não fornecem caldo em quantidade suficiente, devido à concentração. Neste caso, pode-se recorrer ao emprego da água para retirar os componentes úteis existentes no suco ou então para dissolver a massa das frutas (MORETTO *et al.*, 1988).

2.1.3 Sulfitação e Chaptalização

Sulfitação é uma das técnicas mais empregadas na vinificação. O emprego do dióxido de enxofre (SO_2) como elemento antibacteriano começou no século XIX, servindo para eliminar leveduras selvagens, prevenir das enfermidades do vinho, para conservá-lo e ainda funciona como antioxidante (ESCHER, 2006).

Quando o dióxido de enxofre, também chamado de anidrido sulforoso, é adicionado a um meio aquoso, ele se distribui entre as formas SO_2 , HSO_3^- e SO_3^{2-} dependendo do pH. A sulfitação atua nas seguintes etapas:

- Inibição da oxidação (não catalisada por enzimas) de açúcares presentes. Essa oxidação conduz ao escurecimento envolvendo reações complexas das quais participam os grupos carboxilas dos açúcares. O SO_2 e os sulfitos reagem com esses grupos carbonila, formando um produto que não participa de reações subsequentes envolvidas no escurecimento.
- Inibição de reações de oxidação catalisadas por enzimas. O SO_2 inibe as enzimas catalisadoras dessas oxidações (oxidases).
- Inibição da atividade de micro-organismos presentes no vinho. A parcela do SO_2 que permanece livre é ativa, especialmente contra bactérias (PERUZZO & CANTO 2010).

Para assegurar a assepsia, ou seja, reduzir a carga microbiana deteriorante, sem afetar a atividade fermentativa das leveduras e prevenir oxidações indesejáveis, é recomendável a adição de bissulfito de sódio na concentração de $0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

A correção do açúcar ou chaptalização geralmente é feita em mostos pobres em açúcar para aumentar o grau alcoólico, produzir os vinhos suaves e licorosos, assim como, para proporcionar mais corpo a bebida. Considera-se que 2° Brix produz aproximadamente 1°GL de álcool após a fermentação. Essa proporção de 2:1 foi estabelecida devido às crescentes dificuldades dos fermentos se

desenvolverem em meio de elevado teor alcoólico, quando então precisam de maior quantidade de açúcar para aumentar um grau alcoólico (TAVARES, 2009).

2.1.4 Fermentação alcoólica

Produtos de fermentação são utilizados desde a antiguidade. Há registros que comprovam o uso de alimentos fermentados pelos sumérios, egípcios antigos e babilônios. A produção de bebidas alcoólicas pela fermentação de grãos de cereais já era conhecida antes do ano 6000 a. C. (PACHECO, 2010).

A obtenção do fermentado de fruta se dá pela fermentação alcoólica, por difusão, que é o tipo de fermentação em que se obtém essencialmente etanol, mas que compreende um grupo de reações onde são produzidos também outros álcoois, como o metanol, propanol, butanol, por exemplo (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A fermentação alcoólica é conduzida pelas leveduras, na maioria das vezes, usam-se a *Saccharomyces*, micro-organismo aeróbio facultativo, ou seja, tem habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de anaerobiose ou aerobiose. Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, processo denominado de fermentação alcoólica (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar em etanol (PACHECO, 2010). Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários e biomassa (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Segundo Oliveira *et al.*, (2011) a temperatura de fermentação é extremamente importante, pois permite obter alto rendimento em álcool, não somente para que a fermentação seja completa mais também por minimizar a perda

por evaporação. Ela afeta a velocidade da fermentação e a natureza e a quantidade de compostos secundários.

As leveduras do gênero *Saccharomyces* possuem uma temperatura ótima correspondente a 25°C, sendo seu desenvolvimento extremamente favorecido ao redor desse valor. Quanto à influência na qualidade do vinho a temperatura pode oscilar entre 25° e 35°C. As temperaturas acima de 35°C são consideradas prejudiciais, enquanto que as temperaturas 36° a 38°C são inibitórias (MORETTO *et al.*, 1988).

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada aquelas entre 4 e 5. A fermentação alcoólica inicia-se com valores de pH baixos, finalizando-se com valores de 3,5 a 4,0. Fermentações conduzidas em meios ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com a consequente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo que reduz a contaminação bacteriana (SCHMIDELL, 2001).

Aumentando-se a concentração de açúcares, aumenta-se a velocidade de fermentação, a produtividade (SCHMIDELL, 2001). Todos os fatores citados são essenciais para a elaboração do fermentado de fruta assim é feito um ajuste no mosto para que a fermentação se inicie. A quantidade de mosto a ser preparada irá depender da quantidade desejada do produto final (fermentado). Modificando-se o processo fermentativo e variando-se os substratos, é possível notar que o rendimento pode mudar, aumentando ou diminuindo, de acordo com o ajuste de cada variável (ASQUIERI *et al.*, 2009).

Considera-se o término da fermentação quando o teor de açúcar acusa o menor grau possível, geralmente 5°Brix (MORETTO *et al.*, 1988).

2.1.5 Trasfega, filtração e armazenamento

Com a trasfega, consegue-se a separação do vinho da borra. A trasfega é a mudança do vinho de um recipiente para outro, realizada com precaução separando-se o vinho limpo do depósito ou borra. A finalidade da trasfega é facilitar a clarificação do vinho e prevenir a aquisição de odores estranhos, pela presença

de células velhas das leveduras (TAVARES, 2009). A clarificação natural realiza-se por simples repouso, consistindo na sedimentação progressiva de partículas em suspensão. É influenciada pela densidade da partícula. A natureza, volume, forma do recipiente e outros fatores externos, (temperatura, arejamento, tanino, etc.) influenciam a extensão deste depósito (borra) (TAVARES, 2009).

Os processos mais naturais de clarificação aguardam a sedimentação das partículas, por tempo longo, trasfegam eliminando a borra e, se ainda continua a turvação, devem eliminar as partículas menores que não se sedimentam, pela filtração ou por meio de clarificantes (TAVARES, 2009).

A filtração mais rudimentar consiste na passagem do vinho por coadores de flanela, feltro ou panos semelhantes, sendo recomendada para pequenas quantidades e como filtração doméstica. O inconveniente apontado refere-se à exposição do vinho ao ar. A filtração industrial utiliza-se de filtros prensa, forçando o vinho sob pressão a atravessar consecutivamente diversas paredes de lona especial ou a passar por velas de porcelana. Na lavagem constante das velas dos filtros e lonas reside o sucesso e a rapidez da filtração (MORETTO, 1988).

Os vinhos são acondicionados em garrafas de vidro âmbar, fechadas sob pressão com rolhas de cortiça e armazenados à temperatura ambiente.

2.2 Análises físico- químicas

Segundo Moretto *et al.*, 1988, as análises físico-químicas são de grande importância e por isso são realizadas durante e depois do processo de fermentação para garantir a qualidade do produto final. A fermentação deve ser controlada diariamente, pelo menos quanto ao pH e desdobramento de açúcar. As observações mais rigorosas incluem a pesquisa da acidez e porcentagem de álcool, à medida que o mosto fermenta. O controle do desdobramento do açúcar é dado pelo refratômetro (Figura 3.a). Diariamente, verifica-se a quantidade de açúcar existente, o qual, decresce rapidamente como consequência de sua utilização.

Quando o teor de açúcar atinge aproximadamente 5°Brix, o fermentado é submetido a filtração e medido o teor alcoólico, por meio de um alcoômetro. Essa

medição é feita em grau Gay Lussac (%V), que indica o volume de álcool contida em 100 volumes de uma mistura feita exclusivamente de álcool e água. (Figura 3.b).



Figura 3- (a) Refratômetro (b) Alcoômetro. FONTE: Google imagens, 2013.

3. Procedimento experimental

3.1 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de duas fontes, a primeira proveniente do fermento biológico industrial e, a segunda, proveniente da própria fruta abacaxi, *in natura*.

Em um tubo Falcon foi preparada a solução de fermento biológico em tampão salina fosfatado (PBS). Já o abacaxi passou por fermentação natural, sendo exposto ao ar para induzir o aumento de leveduras residentes.

3.1.1 Inoculação em placa

Com o auxílio de swabs estéreis foram retiradas amostras do fermento e do abacaxi, as quais foram plaqueadas por estrias simples em uma placa de Petri, com Ágar Sabouraud e mantidas em estufa a 28°C.

3.1.2 Coloração Gram, replaqueamento e troca de meio

Após 48 horas, pode-se observar a proliferação de leveduras, e outros micro-organismos presente nas placas, a partir da qual foi feita a coloração pelo método de Gram e análise em microscópio óptico (MO). Pode-se perceber, após a observação ao M.O., a presença de alguma contaminação bacteriana nas amostras, sendo necessários replaqueamentos para obtenção de colônias realmente isoladas ou culturas puras. O re-isolamento, desta vez, em estrias compostas e utilizando-se Ágar Sabouraud. Este meio é recomendando para o cultivo, isolamento e identificação de fungos micelianos e leveduriformes. O pH do meio, levemente ácido e a riqueza de açúcar, inibem o desenvolvimento da maioria das bactérias.

Após o crescimento dos micro-organismos, nesta condição, e feita a nova coloração, o resultado da análise em microscópio, mostrou a presença de culturas puras em algumas placas tanto de fermento biológico quanto das que continham

amostras coletadas de abacaxi. As cepas certificadas foram então inoculadas em 1mL de meio de cultura novo e mantidas em estufa para crescimento por 24 horas. Em seguida, 1mL foi transferido para 50mL de caldo Sabouraud. A cultura foi mantida por mais 24 horas em Shaker e, após, foram armazenadas a 4° C.

Para preservação dos isolados, 18 amostras (sendo 9 do abacaxi e 9 do fermento) de 600µL cada, foram congeladas com adição de 20% de glicerol.

Para a obtenção de inóculo trabalho, o número adequado de leveduras (10^8 /mL) foi determinado por meio de contagem em contagem de células (Neubauer) a partir do crescimento/reativação dos micro-organismos.

3.1.3 Reativação dos micro-organismos

As amostras congeladas foram reativadas para dar início à fermentação. Com auxílio de micropipeta, alíquotas de 100µl foram retiradas a partir do criopreservado (descongelado à temperatura ambiente) e transferidas para placas de Petri contendo Agar Sabouraud, incubadas por 24 a 48 horas.

As amostras foram nomeadas, conforme observa-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Amostras de fermento e abacaxi identificadas.

Amostras	Nomeação
1	Fermento B
2	Fermento A11
3	Fermento A 2
4	Fermento 1B
5	Fermento 1C
6	Fermento 1A
7	Abacaxi 1A

8	Abacaxi 2A
9	Abacaxi 3A
10	Abacaxi 1B
11	Abacaxi 3B

3.1.4 Centrifugação

Os 50mL cultivados de cultura foram, então, transferidos para tubos Falcon estéreis e estes foram submetidos à centrifugação. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 4°C e 3000g. O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células utilizado para inoculação em biorreator.

3.2 Preparo do Biorreator

Para a produção do fermentado de abacaxi, foram preparados três reatores, nos quais se utilizaram recipientes de vidro com capacidade de 3 litros cada. Nas tampas dos recipientes foram feitas aberturas para a entrada de mangueiras o que permitiu a coleta de amostras diárias para as análises.

Os biorreatores passaram por um processo de assepsia, sendo lavados com álcool 70% (v/v) e colocados no fluxo com luz UV por 30 minutos.

A Figura 5 ilustra um dos biorreatores utilizados para a elaboração do fermentado de abacaxi.



Figura 5 – Biorreator preparado para a produção do fermentado de abacaxi.

3.3 Processo fermentativo

3.3.1 Obtenção do mosto

As frutas (abacaxi) sadias e maduras adquiridos no mercado local foram selecionadas e lavadas em água corrente para retirada de impurezas. Foram cortadas em cubos e trituradas em liquidificador (Figura 6). O resíduo (cascas e coroa) foi descartado. O suco foi transformado em mosto para fermentação pela adição de bissulfito de sódio (0,1 g/L), para assegurar assepsia e presença de concentração ideal de açúcar (chaptalização). A adição de açúcar foi feita até atingir o Grau Brix desejado (18 e 20°Brix).



Figura 6 – Abacaxi cortado e triturado em liquidificador.

3.3.2 Inoculação e início da fermentação

Para dar início à fermentação, foram adicionados os inóculos (*Saccharomyces sp*), obtidos do isolamento das amostras de fermento biológico e abacaxi) no mosto, como apresentado na Figura 7. No biorreator 1 foram adicionados amostras do fermento (F1A, F1B e FA2), no biorreator 2 foram adicionados amostras do abacaxi (ABA 3B, ABA 1A e ABA 3A), já no biorreator 3 amostras do fermento e do abacaxi foram misturadas (ABA 2A, ABA 1B e F 1C).



Figura 7 – Início do processo de fermentação para produção de fermentado de abacaxi.

Após o término da fermentação, que acontece quando o nível de sólidos solúveis atinge 5° Brix, os fermentados foram acondicionados em geladeira para que os sólidos presentes fossem decantados. Depois de 48 horas, foi separado o corpo de fundo do vinho através da filtração e medido o teor alcoólico.

3.4 Análises

Foram feitas análises diariamente dos fermentados para controle da fermentação. Foi medido o teor de sólidos solúveis (°Brix) com o uso do refratômetro e também foi feita a medição de pH. Após a filtração o teor alcóolico foi determinado com o uso do alcoômetro.

4. Resultados e discussão

4.1 Prospecção de micro-organismos

Após o isolamento do fermento comercial e da amostra de abacaxi, foram observadas formações de colônias nas placas de Petri. Na Figura 8 é apresentado o aspecto morfológico das culturas obtidas do abacaxi e do fermento respectivamente.

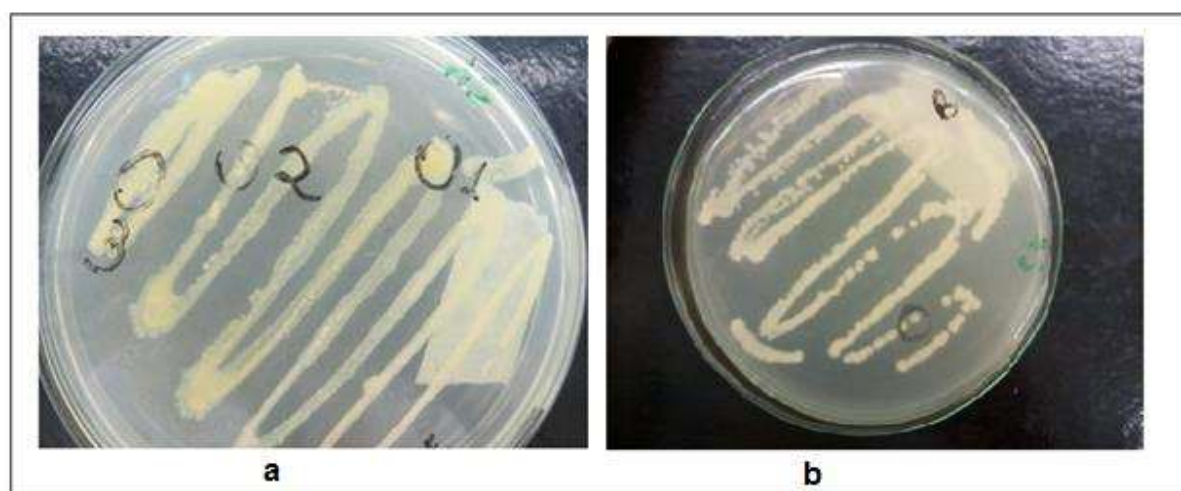


Figura 8 – Estria simples: (a) amostra de abacaxi e (b) do fermento.

Pode-se perceber na Figura acima colônias isoladas, nas quais foram retiradas amostragens para coloração Gram que foram visualizadas em microscópio óptico. Foram coradas 7 amostras denominadas A, B, C, D, E1, E2 e E3. Sendo de A a D correspondentes ao fermento e as placas de E1 a E3 amostras do abacaxi. Após a análise em microscópio, pôde-se perceber que as placas C e D continham leveduras, porém contaminadas (contendo a presença de bactérias) (Figura 9), sendo descartadas. Da placa A, por replaqueamento, foi obtida cultura pura de levedura, como representado na Figura 10.

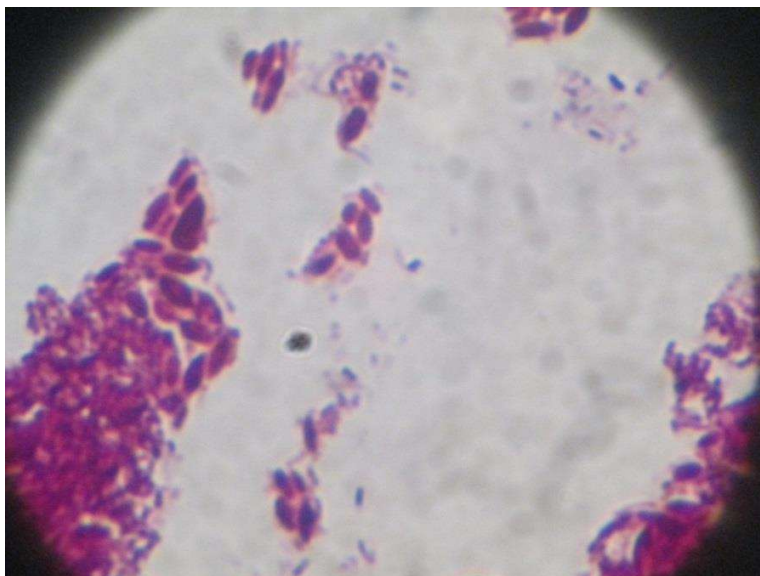


Figura 9 – Amostra do fermento C contaminada.

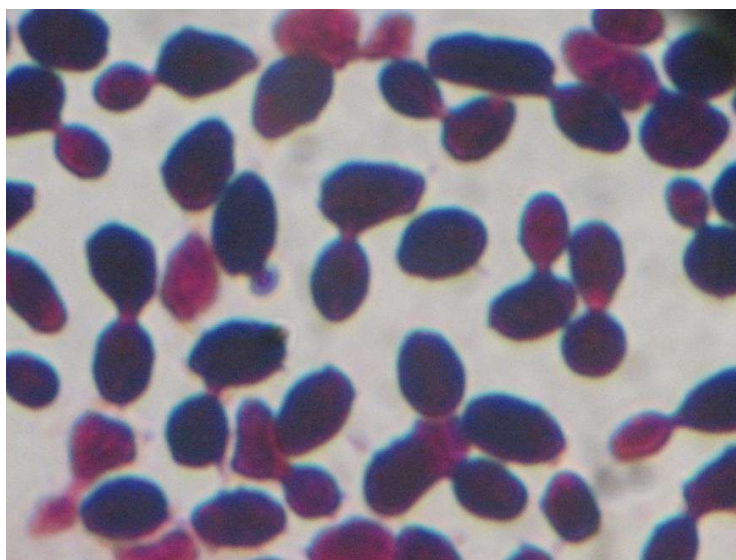


Figura 10 – Cultura pura isolada da placa do fermento A.

O experimento foi realizado durante a disciplina Laboratório biotecnológico, portanto, para elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso o procedimento foi repetido utilizando-se as amostras congeladas a partir do replaqueamento para isolar leveduras. As Figuras 11 e 12 apresentam o crescimento na placa de Petri do fermento e do abacaxi respectivamente.

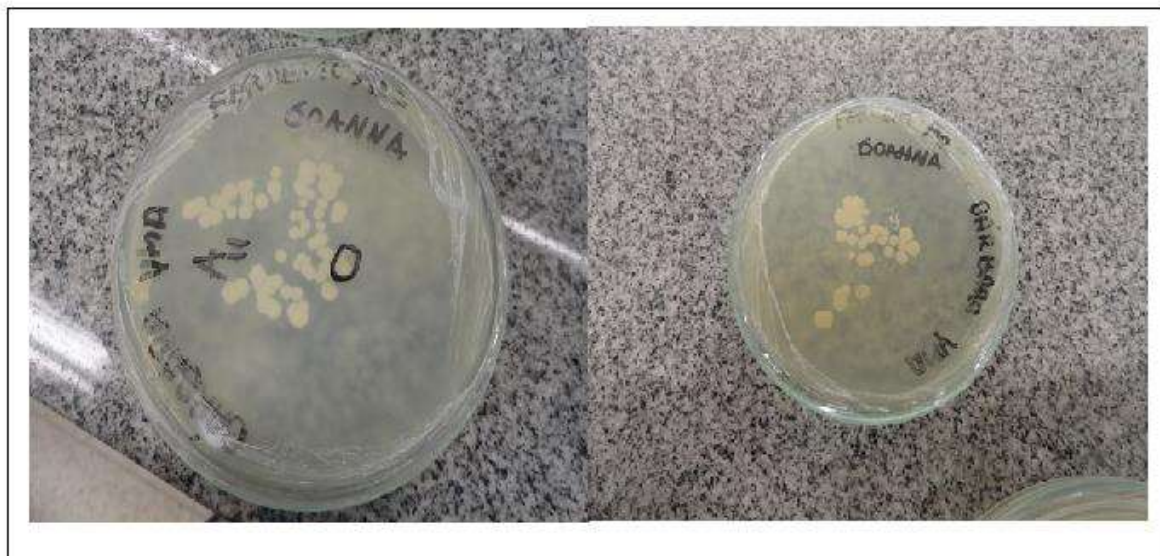


Figura 11 – Placas de Petri apresentando crescimento de leveduras do fermento.

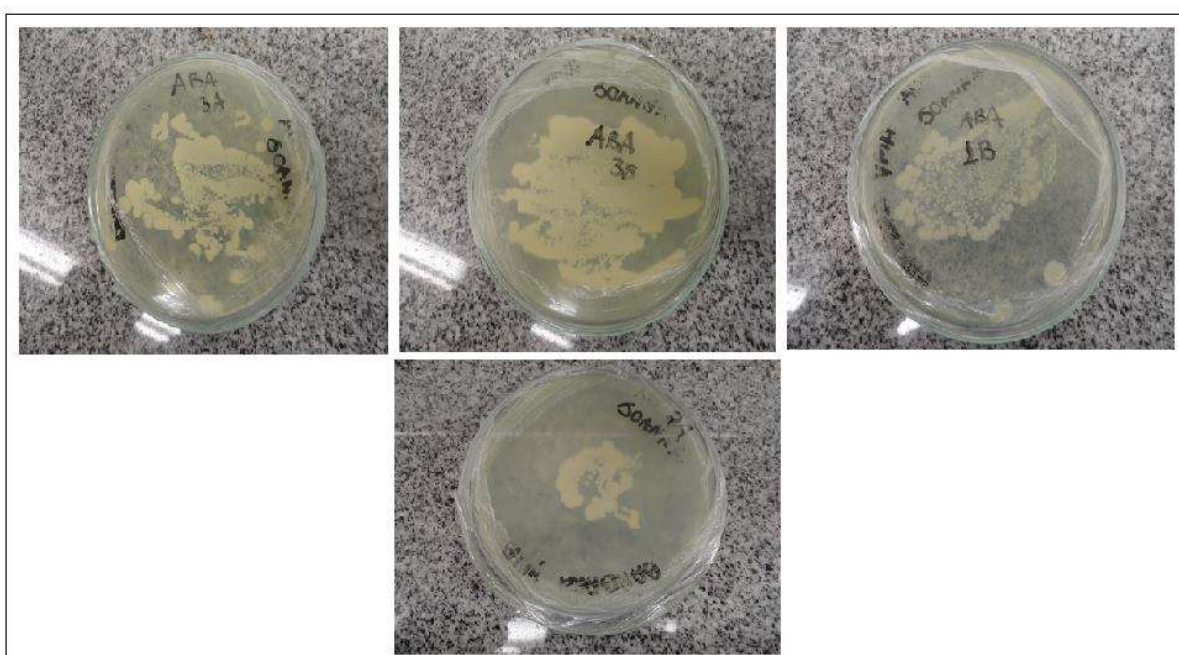


Figura 12 – Placas de Petri apresentando crescimento de leveduras do abacaxi.

As placas contendo fermento B e fermento A11, apresentaram-se contaminadas com presença de bactérias. Já as outras placas apresentaram

culturas puras, vistas em microscópio. Depois de serem transferidas para o caldo Sabouraud e colocadas em Shaker apresentaram turvação como sinal de crescimento, como mostra a Figura 13.



Figura 13 – Fermentado em caldo Sabouraud depois do crescimento contendo leveduras obtidas do fermento e do abacaxi respectivamente.

A contagem de células, realizada em câmara de Neubauer, comprovou a quantidade ideal (10^8 /mL) para iniciar o processo fermentativo em biorretor.

Após a etapa de centrifugação, foi obtido um concentrado de células. Foram utilizados as amostras (Tabela 2), exceto as amostras 1 e 2 contaminadas.

4.2 Fermentação

Inicialmente mediu-se a quantidade de sólidos solúveis (Grau Brix) da polpa de abacaxi. A partir do valor encontrado (14°Brix) conforme mencionado, foi necessário ajustar o mosto para obtenção de um teor de açúcares elevado (aproximadamente 20°Brix). Para isso a cada biorreator foi adicionado açúcar cristal (sacarose) e água em quantidades diferentes, conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores de abacaxi, água e açúcar adicionados ao mosto.

Biorreator	°Brix inicial	Abacaxi (g)	Água (ml)	Açúcar (g)
Biorreator 1	19	630,91	500	288,66
Biorreator 2	24	634,44	500	355,39
Biorreator 3	20	627,49	500	306,12

Durante a fermentação, os conteúdos dos biorreatores foram monitorados diariamente e observados quanto as mudanças de pH e °Brix.

Cada biorreator apresentou um comportamento diferente. No primeiro deles, até o 6° dia as leveduras estavam na fase Lag (adaptação metabólica), depois disso, o teor de sólidos solúveis caiu gradativamente. O biorreator 3 apresentou um decréscimo considerável a partir do quinto dia de fermentação tendo o teor de sólidos solúveis reduzido de 20 para 5°Brix. O segundo não apresentou sinais de fermentação. Como foram usadas somente amostras de leveduras isoladas do abacaxi e no terceiro biorreator amostras de ambos (fermento e abacaxi) o fato de não ter sido produzido etanol não pode ser explicado pela cepa utilizada, então o que se pode dizer é que a alta quantidade de açúcar adicionada ocasionou um estresse osmótico com consequente elevação no brix. Na Tabela 4 são apresentados os resultados.

Tabela 4 – Resultados obtidos da fermentação

Dias	Biorreator 1		Biorreator 3	
	°Brix	pH	°Brix	pH
1	19	3,58	20	3,54
2	19	3,61	20	3,59
3	19	3,53	20	3,54
4	19	3,48	20	3,45

5	19	3,5	19	3,27
6	19	3,51	18	3,30
7	18	3,52	18	3,39
8	18	3,56	17	3,40
9	17	3,54	16	3,40
10	16	3,54	15	3,62
11	16	3,49	15	3,60
12	14	3,56	14	3,59
13	13	3,53	13	3,54
14	12	3,54	12	3,49
15	11	3,57	11	3,50
16	10	3,49	10	3,48
17	9	3,5	9	3,45
18	9	3,52	7	3,45
19	7	3,56	5	3,42
20	6	3,5	-	-
21	5	3,48	-	-

O decréscimo do teor de açúcar no mosto é decorrente da multiplicação microbiana e consequente consumo do mesmo para produção de etanol pela levedura. Esse efeito pode ser melhor visualizado através das curvas abaixo (Figura 14).

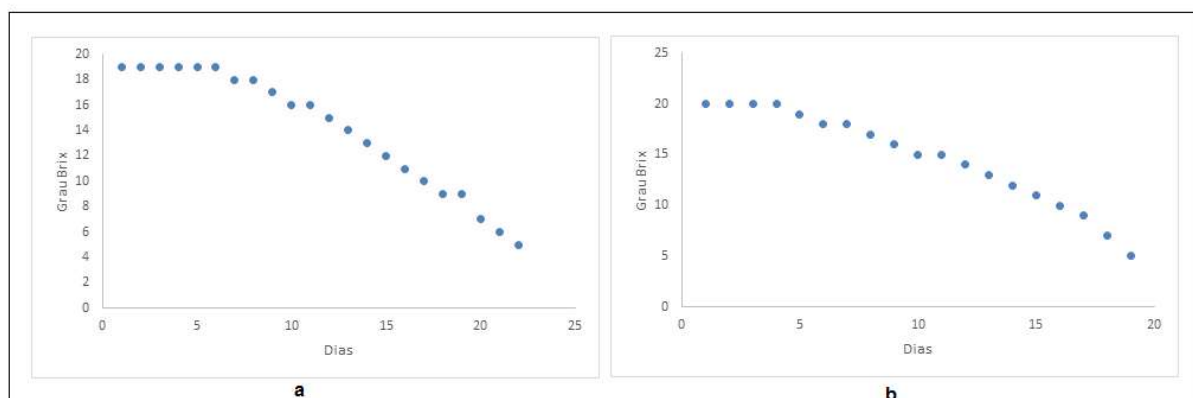


Figura 14 - Curva de consumo de açúcar durante a fermentação (a) Biorreator 1 e (b) Biorreator 3.

Conforme observado na Tabela 4, nota-se ligeira redução do pH ao longo do processo de fermentação nos biorreatores 1 e 3. Esse fato pode ser explicado pela produção de ácidos orgânicos. O pH do abacaxi é baixo e ainda foi reduzido a medida em que houve a transformação do açúcar em etanol, o que indica um bom metabolismo das leveduras. A acidificação do meio pode ter impedido o crescimento dos micro-organismos indesejados. Valores de pH acima de 4,0 tornam os vinhos sujeitos a alterações microbiológicas e de cor.

Depois do fermentado ser filtrado foi medido o teor alcoólico através do refratômetro e o resultado provou a produção de bebida fermentada de abacaxi. Na Tabela 5 são apresentados os resultados obtidos nos biorreatores 1 e 3.

Tabela 5 – Comparativo entre os fermentados obtidos do biorreator 1 e 3.

Biorreator	Grau brix inicial	pH final	Grau Brix final	Dias de fermentação	Teor alcoólico (°GL)
1	19	3,48	5	21	9
3	20	3,42	5	19	8

Os produtos elaborados apresentaram graduação alcoólica de acordo com a legislação, o que significa que as leveduras usadas apresentaram comportamento adequado para a conversão de açúcar em etanol.

Em função do tempo e disponibilidade de equipamentos, outros aspectos não foram analisados, como a determinação de ácidos orgânicos através de cromatografia, determinação de açúcares redutores, dosagem de etanol usando a técnica de cromatografia em fase gasosa, os quais poderão ser obtidos em experimentações futuras em alíquotas congeladas. Pelo mesmo motivo, também não foi possível desenvolver análise sensorial dos produtos obtidos. Estes testes poderiam detectar diferenças no aroma, sabor e palatabilidade, os quais podem resultar dos elementos não avaliados acima e poderiam mostrar outros resultados, diferentemente dos teores alcoólicos que foram similares.

5. Conclusão

O fermentado de abacaxi pode ser visto como uma bebida alternativa ao consumidor que procura novos sabores e maior variedade de produtos. O processo pode ser obtido tanto com fermentação espontânea com leveduras residentes da própria fruta ou com a introdução de leveduras comerciais, pelo fato destes processos permitirem a obtenção de teores alcoólicos semelhantes. Sua produção requer o controle dos parâmetros envolvidos, pois estes influenciam diretamente no produto final. O pH demonstrou ter um papel importante para o início da fermentação, pois quando não ajustado, as leveduras demoram na adaptação ao meio e consequentemente retardam o início da fermentação. Deve-se ter cuidado ao adicionar água para evitar a diluição excessiva do mosto e a dificuldade de acesso das leveduras ao substrato. O valor de °Brix inicial também constitui fator importante e, por isso é ideal o emprego de frutos maduros. Foi possível notar também a influência da concentração de açúcares, no Biorreator 2 a alta concentração de açúcares acarretou um estresse osmótico, não ocorrendo o processo fermentativo. Os fermentados apresentaram variação nos seus teores alcoólicos que pode ser devido às diferentes concentrações de cada preparo, porém os valores estavam dentro do previsto para uma bebida fermentada de fruta (4 a 14°GL). Dessa forma, o estudo mostrou ser viável e passível de algumas alterações nos parâmetros para otimização do fermentado de abacaxi produzido.

6. Referências Bibliográficas

ARAÚJO K.G.L.; OLIVEIRA A. U.; RODRIGUES F. S.; MANHÃES L.R.T.; CANTO M.W.; **Utilização de abacaxi (*Ananas comosus* L.) cv. Pérola e Smooth cayenne**

ASQUIERI E.R.; RABÊLO A.M.S.; SILVA A.G.M - Fermentado de jaca: estudo das características físico-químicas e sensoriais – **Ciência e Tecnologia de Alimentos vol.28 no.4 Campinas Oct./Dec. 2008. Disponível em: << <http://www.scielo.br/>>>.**

BON, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado.** Ed. Interciência. 2008. Cap. 5.

BORGES.C.D.; CHIM.J.F.; LEITÃO.A.M.; PEREIRA.E.; LUVIELMO.M.M - **Produção de suco de abacaxi obtido a partir dos resíduos da indústria conserveira** – B.CEPPA, Curitiba, v.22, n- 1 p. 25-34, junho 2004.

DIAS. D.R.; SCHWAN.R.F.; LIMA. L.C.O.; **Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.)** - Departamento de Biologia e Departamento de Ciência e Tecnologia- Universidade Federal de Lavras de Lavras — Lavras Novas-MG, Dez/2003. Disponível em <www.scielo.com.br> – Acesso em 17 de Abril de 2013.

ESCHER A. **A valorização de espaços domésticos na produção de vinhos artesanais**, 2006. Curso Superior de Tecnologia em Viticultura e Enologia. Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves. Bento Gonçalves – RS.

FACUNDO H. V.V **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento.** – Curso de mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, UFC. Fortaleza- Ce. 2009 Disponível e:<<http://www.embrapa.br>> Acesso em 04 Abr.2013

LUCARINI A.C.; DA SILVA, L. A.; BIANCHI, R.A.C. **Um sistema para a contagem semi-automática de micro-organismos.** Pesquisa e Tecnologia FEI nº 26. p.36-40. Disponível em: < <http://fei.edu.br>> Acesso em: 10 de abril de 2013.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2008. 608 p.

MORETTO E.; ALVES R.F.; CAMPOS C.M.T.; ARCHER R.M.B.; PRUDÊNCIO A.J; **Vinhos & Vinagres (Processamento e Análises)** – Florianópolis: Ed. Da UFSC, 1988, 168p – (Série Didática).

MORGADO. I.F. Aquino C.N.P. Terra D. C.T. **Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços no Estado do Rio de Janeiro.** Economia e Marketing, Rev. Bras. Frutic. vol.26 no.1 Jaboticabal Apr. 2004. Disponível em < <http://www.scielo.br/>>. Acesso: 04 Abr. 2013.

OLIVEIRA A.S. *et al.* Produção de Fermentado Alcoólico do Fruto de Mandacaru sem Espinhos (*Cereus jamacaru*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, V.13, n.3, p.271 -277, Campina Grande, 2011.

PACHECO T.F.; **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** 2010, 94p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. **para a produção de vinhos - estudo da composição química e aceitabilidade-** Ciência e Tecnologia de Alimentos - Campinas, 29(1): 56-61, jan – mar. 2009.

PERUZZO T.; CANTO E., **Informe-se sobre a química: Porque o vinho é sulfitado?** N.22 , 2010. Disponível em: < www.moderna.com.br> - Acesso em 10 de julho de 2013.

SCHMIDELL W.; LIMA U.A.; AQUARONI E.; BORZANI W. **Biotecnologia industrial, Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blucher , 2001 Vol.3 593p.

SCHMIDELL W.; LIMA U.A.; AQUARONI E.; BORZANI W. **Biotecnologia industrial – Engenharia Bioquímica** São Paulo: Edgard Blucher , 2001 Vol.2 541p.

TAVARES J.T.Q.; **Produção de fermentado alcoólico de cana-de-açúcar, caracterização e avaliação do seu envelhecimento,** 2009, 118 p. Doutorado em Ciências Agrárias - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas, Bahia.

VENTURINI Filho, W. G. **Bebidas não alcóolicas: ciência e tecnologia.** São Paulo: Edgard Blucher, 2010. v.2. 385 p.

VIEIRA, C.R. Dossiê Técnico – **Produção de fermentados a partir de frutas.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). Janeiro de 2012.