



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCAS CALDEIRÃO RODRIGUES MIRANDA

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ACÉTICO A PARTIR DE
MELAÇO DE SOJA LUCAS**

Londrina
2017

LUCAS CALDEIRÃO RODRIGUES MIRANDA

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ACÉTICO A PARTIR DE
MELAÇO DE SOJA LUCAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Orientadora: Wilma Aparecida Spinosa.
Coorientadora: Elza Louko Ida.

Londrina
2017

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M672p Miranda, Lucas Caldeirão Rodrigues.
Produção de fermentado acético a partir de melão de soja / Lucas Caldeirão
Rodrigues Miranda. – Londrina, 2015.
59 f. : il.

Orientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientador: Elza Iouko Ida.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos fermentados – Teses. 2. Soja – Produtos – Teses. 3. Vinagre –
Teses. 4. Ácido acético – Teses. 5. Concentrado de proteína de soja – Teses. I. Spinosa,
Wilma Aparecida. II. Ida, Elza Iouko. III. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos. IV. Título.

CDU 661.73

LUCAS CALDEIRÃO RODRIGUES MIRANDA

**PRODUÇÃO DE FERMENTADO ACÉTICO A PARTIR DE MELAÇO
DE SOJA LUCAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida
Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dra. Estela de Oliveira Nunes
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Prof. Dr. Raúl Jorge Hernan Castro-Gómez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de abril de 2015.

A mim.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo financiamento deste estudo.

Às professoras Wilma Aparecida Spinosa e Elza Louko Ida pela orientação e coorientação.

À empresa processadora de soja Selecta[®] e seus colaboradores Adilson Ribeiro Resende e Thiago M. Sousa.

Às estudantes e técnicas da UNOPAR. À Wanda da destilaria Americana.

Aos companheiros estudantes do departamento que tanto me ensinou.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos que transferiram o conhecimento necessário para minha formação.

Aos amigos que, de longe, foram muito mais do que presentes: Lucas Gustavo, Lorrán Ribeiro, Cláudia Camille Caetano, Dheyson dos Santos Silva, Vanessa Salum, Rafael Pedroso, Edileusa Costa, Leandro Rosa, Nelma Garcia e Sônia Serra.

Aos amigos de teto: Heron Heloy, Erick Lopes e Ricardo Dalai.

À querida Iyalorixá Cleusa.

Aos amigos recentes, mas para sempre, Alessandra Bosso, Mariah Benine, Janaína de Carvalho e toda a especialidade a Leonardo Fonseca Maciel.

Às mulheres de minha vida: Virgulina, Lucimara e Isadora.

A Xangô, Yemanjá, Oxóssi, Oxum, Oxumarê e a todas as divindades de minha crença.

A todos aqueles que se sentirem parte...

Muito obrigado!

“É calma...
Vento vem e leva embora”
(Jota Velloso)

MIRANDA, Lucas Caldeirão Rodrigues. **Produção de fermentado acético a partir de melão de soja**. 2015. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O melão de soja é um coproduto da fabricação do concentrado protéico de soja no qual contém, majoritariamente, açúcares, dos quais a sacarose é o mais abundante. Grande parte deste coproduto é utilizado para alimentação animal ou então rejeitado e, no Brasil, poucas indústrias utilizam o melão de soja para a produção de etanol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização do melão de soja para a produção de fermentado acético. Foi estudado o rendimento da fermentação alcoólica em diferentes concentrações iniciais de melão de soja (20, 25 e 30°Brix) conduzidas em condição estática ou sob agitação. A máxima produção de etanol foi de 47,56 g/L para a fermentação conduzida sob agitação. A partir do fermentado alcoólico de melão de soja foi produzido o fermentado acético e acompanhado oito ciclos fermentativos (cinco de adaptação e três de produção). A acidez média dos fermentados foi de 50,70 g/L com rendimento em ácido acético (YAA), rendimento em concentração total (YCT) e produtividade média (PAA) de 65,02, 92,76% e 0,033 g/L/h.

Palavras-chave: Vinagre. Fermentado acético. Fermentação alcoólica. Melão de soja. Coprodutos.

MIRANDA, Lucas Caldeirão Rodrigues. **Production of acetic fermented from soybean molasses**. 2015. 59 p. Dissertation (Masters degree in Food Science) – Universidade Estadual De Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Soybean molasses is a by-product of protein-concentrate soybean meal production which mostly contains sugars, of which, sucrose is the major. Much part of this byproduct is used for animal feed, rejected or, in Brazil, few industries uses the soybean molasses to producing ethanol. The aim of this work was to evaluate the utilization of soybean molasses to produce acetic fermented. It was studied the yield of alcoholic fermentation under different initial concentration of molasses (20, 25 and 30°Brix) done in static condition or under agitation. The maximum ethanol production was 47.56 g/L for the stirred fermentation. From molasses alcoholic fermented of soybean molasses was produced the acetic fermented and accompanied eight fermentative cycles (five of adaptation and three of production). The average acidity of the fermented was 50.60 g/L with acetic yield (Y_{AA}), total concentration yield (Y_{CT}) and average productivity of 65.01%, 92.76 and 0.033 g/L/h.

Keywords: Vinegar. Acetic fermentation. Alcoholic fermentation. Soybean molasses. Byproduct.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sequência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos	23
Figura 2. Oxidação do etanol a ácido acético por ação das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase	25
Figura 3. Fluxograma de produção do farelo de soja concentrado e obtenção do melão de soja.	28
Figura 4. Estrutura dos carboidratos da soja.....	29
Figura 5. Estrutura química comum dos flavonoides	30
Figura 6. Estrutura química e radical das isoflavonas agliconas, glicosídicas e glicosídicas conjugadas.	31
 ARTIGO	
Figura 1. Consumo de açúcares totais, formação de etanol e desenvolvimento microbiano em relação ao tempo de fermentação sob agitação (a) e estática (b).....	52
Figura 2. Balanço de massa para a produção de fermentado acético (40 g/L) e ácido acético.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção de diversos produtos do metabolismo fermentativo de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em g/L de glicose metabolizada.....	24
Tabela 2. Composição aproximada do melaço de soja em base seca.	29
ARTIGO	
Tabela 1. Caracterização do melaço de soja em base seca.....	50
Tabela 2. Parâmetros fermentativos dos experimentos em diferentes °Brix em condição estática (E) ou sob agitação (A).....	51
Tabela 3. Tempo de fermentação, variação de açúcares totais e etanol, rendimentos e produtividade para as fermentações sob agitação e estática.....	53
Tabela 4. Parâmetros cinéticos para as fermentações estática e sob agitação.....	53
Tabela 5. Ciclos fermentativos para a produção de vinagre	54
Tabela 6. Caracterização físico-química do fermentado acético de melaço de soja.....	55
Tabela 7. Fenólicos totais (mg GAE/100mL) e isoflavonas (mg/100mL) presentes no mosto para fermentação alcoólica, fermentado alcoólico e fermentado acético de melaço de soja, em base úmida.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

\$	Dólar
%	Porcentagem
°Brix	Porcentagem de sólidos solúveis (m/v)
°C	Graus Celsius
µm	Microgramas
µx	Taxa específica de formação de células
A	Experimento conduzido sob agitação
AA	Acidez acética
AEC	Antes da Era Comum
AT	Açúcares totais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAA	Bactérias do ácido acético
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
C ₂ H ₅ OH	Etanol
CCT	Coleção de cultura tropical
cel	Células
CH ₃ O ₂ H	Ácido Acético
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
cm ³	Centímetros cúbicos
C _n (H ₂ O) _n	Estrutura geral dos carboidratos
CO ₂	Gás carbônico
CT	Concentração total
DAD	<i>Diode array detector</i>
dP	Variação de etanol
dS	Variação de açúcares totais
dt	Variação de tempo
dX	Variação de concentração celular
E	Experimento conduzido em condição estática
ET	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
f	Final
g	Gramas

GAE	<i>Gallic acid equivalent</i>
h	Hora
H ₂ O	Água
<i>i</i>	Inicial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
kg	Quilogramas
L	Litros
log	Logaritmo
m	Massa
M	Molar
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MYP	<i>Manitol, yeast, peptone</i>
n	Número de geração microbiana
nd	Não detectado
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
P	Etanol
P.A.	Para Análise
pH	Potencial hidrogeniônico
rp	Taxa de formação de etanol
rpm	Rotações por minuto
rs	Taxa de consumo de substrato
rx	Taxa de formação de celular
S	Açúcares totais
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
t	Tempo
tg	Tempo de geração microbiano
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
UV	Ultravioleta
v	Volume

X	Concentração celular
Y1	Rendimento em etanol sobre os açúcares totais iniciais
Y2	Rendimento em etanol sobre os açúcares consumidos
Y _{AA}	Rendimento em acidez acética
Y _{CT}	Rendimento em concentração total
YM	<i>Yeast, malt</i>
Yp/s	Rendimento em etanol sobre o teórico máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS GERAIS	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	VINAGRE.....	19
3.1.1	Aspectos Gerais.....	19
3.1.2	Métodos de Produção.....	20
3.1.2.1	Processo lento ou Orléans.....	20
3.1.2.2	Processo rápido ou alemão	21
3.1.2.3	Processo submerso	21
3.1.2.4	Comparação entre métodos de produção de vinagres	22
3.1.3	Bioquímica das Fermentações Alcoólica e Acética.....	22
3.1.4	Microrganismos Utilizados nas Fermentações Alcoólica e Acética	25
3.1.4.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.1.4.2	Bactérias do ácido acético (BAA).....	26
3.2	MELAÇO DE SOJA	27
3.2.1	Isoflavonas.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1	MATÉRIA-PRIMA	32
4.1	MICROORGANISMOS	32
4.2	EQUIPAMENTOS.....	32
4.2.1	Demais Equipamentos.....	32
4.3	REAGENTES.....	33
4.4	CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	33
4.4.1	Ativação e Preparo do inóculo	33
4.4.2	Efeito da Concentração Inicial de Melaço de Soja na Produção de Etanol.....	33

4.4.3	Cinética das Fermentações Alcoólicas sob as Condições de Agitação ou Estática	34
4.4.4	Fermentação Acética	34
4.5	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS.....	34
4.5.1	Extrato seco e cinzas	34
4.5.2	Determinação de Nitrogênio Total	35
4.5.3	Determinação de Lipídios	35
4.5.4	Determinação de Açúcares Totais por Fenol-sulfúrico	35
4.5.5	Determinação de Etanol por Densimetria	35
4.5.6	Acidez Total	36
4.5.7	Densidade Relativa a 20°C	36
4.5.8	Determinação de Fenólicos Totais.....	36
4.5.9	Extração e Quantificação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência	36
4.5.10	Contagem das Células.....	37
4.5.10.1	Leveduras	37
4.5.10.12	Bactérias do ácido acético	38
4.6	CÁLCULOS DE RENDIMENTOS, PRODUTIVIDADES E PARÂMETROS CINÉTICOS	38
4.6.1	Rendimento da Fermentação Alcoólica	38
4.6.2	Parâmetros Cinéticos e Tempo de Geração.....	39
4.6.3	Rendimento da Fermentação Acética.....	40
5	REFERÊNCIAS	41
ARTIGO	44	
1.	Introdução	44
2.	Material e métodos	45
2.1.	Matéria-prima	45
2.2.	Caracterização do melaço de soja	46
2.3.	Ativação dos microrganismos e preparo dos inóculos.....	46
2.4.	Fermentação alcoólica	46

2.4.1.	Efeito da concentração inicial de melaço de soja na fermentação alcoólica	46
2.4.2.	Cinética da fermentação alcoólica	47
2.5.	Fermentação acética	47
2.6.	Determinação de açúcares totais, etanol, acidez acética total e contagem de células	47
2.7.	Determinação de isoflavonas	48
2.8.	Determinação de fenólicos totais	48
2.9.	Cálculos	49
3.	Resultados e discussão	50
3.1.	Caracterização do melaço	50
3.2.	Efeito da concentração inicial de melaço de soja na produção de etanol	50
3.3.	Cinética da fermentação alcoólica em biorreator	52
3.4.	Produção do fermentado acético	54
3.5.	Caracterização do fermentado acético	55
3.6.	Balanço de massa	56
4.	Conclusão	57
5.	Referências	57

1 INTRODUÇÃO

O vinagre é um condimento ácido e fermentado conhecido desde a antiguidade, sendo possível encontrar relatos em textos babilônicos, cerca de 4.000 AEC. O uso do vinagre vai desde a culinária até a medicina popular, entretanto, o Brasil, assim como alguns países, não tem a cultura de produzir vinagres de matéria-prima distinta do álcool, vinho e maçã, tratando-o apenas como um condimento azedo de baixo valor. Por outro lado, em países como a França e a Itália, uma garrafa de vinagre pode ter um alto valor agregado, sendo comparada, culturalmente, aos importantes vinhos (SPINOSA, 2002).

Diversos estudos têm relacionado a ingestão de vinagre como um auxiliar na redução da ocorrência de doenças crônico-degenerativas. Isto tem sido atribuído não apenas pela presença do ácido acético, que é por si um agente antioxidante; mas, também pela presença de diversos ácidos orgânicos produzidos durante as fermentações e compostos fenólicos provenientes das matérias-primas de onde o vinagre é produzido (LEE et al., 2013; QIU et al., 2010; XU, TAO e AO, 2007).

O melaço de soja é um coproduto gerado na produção do concentrado proteico de soja. O concentrado proteico é utilizado tanto na alimentação humana quanto na industrialização de alimentos destinado a animais. Já o melaço de soja tem seu uso apenas voltado para a alimentação animal, sobretudo, na nutrição de suínos. Dentre os componentes do melaço, os açúcares representam cerca de 60% e as isoflavonas podem chegar a mais de 2% dependendo do cultivar utilizado e da safra. As isoflavonas são consideradas antioxidantes dietéticos e estudos relacionam o consumo destas com a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças específicas do sexo feminino. Os açúcares majoritários no melaço estão na forma de sacarose, estaquiose e rafinose. A sacarose compõe a maior parte desses açúcares na qual é passível de ser convertida em etanol por microrganismos como a *Saccharomyces cerevisiae* (MACHADO, 1999; SIQUEIRA, 2008). Tal característica é interessante, pois, qualquer substrato alcoólico pode servir de meio de cultivo para as bactérias acéticas produzirem vinagre.

A pesquisa desenvolvida objetivou a inovação em relação ao uso de melaço de soja para a obtenção de um fermentado acético. Buscas foram realizadas em bases indexadas sobre a literatura pertinente e nenhum relato foi encontrado sobre o uso do referido melaço para esse fim.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Investigar o potencial uso do melaço de soja como matéria-prima para a produção de fermentado acético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da concentração de sólidos solúveis (°Brix) sobre a produtividade e rendimento da fermentação alcoólica.
- Investigar o comportamento cinético da fermentação alcoólica.
- Testar a utilização de fermentado alcoólico de melaço de soja na produção de fermentado acético.
- Investigar ciclos de fermentação acética.
- Determinar as características físico-químicas do fermentado acético produzido.

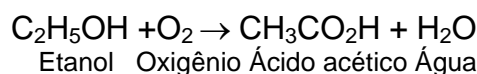
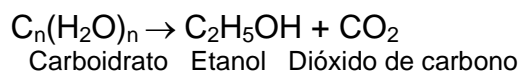
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 VINAGRE

3.1.1 Aspectos Gerais

O vinagre, ou fermentado acético, é um alimento líquido da classe dos condimentos produzido por dupla fermentação (primeiro, alcoólica e, subsequentemente, acética), a partir de produtos amiláceos e ou açucarados (FAO/WHO, 2000; SPINOSA, 2002).

Como a fermentação acética é sequência da alcoólica, qualquer matéria-prima capaz de fornecer as condições adequadas para a fermentação alcoólica é também substrato para produção de vinagre. A fermentação alcoólica é conduzida em anaerobiose, por meio de mostos que contenham 10% (m/v) ou mais de açúcares, em baixo pH. Nos processos industriais, o pH é ajustado entre 4,0 e 5,0, sendo essa a faixa ideal para favorecer o desenvolvimento da *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo mais empregado nesse tipo de fermentação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Ao final da fermentação alcoólica o vinho é submetido, aerobicamente, ao processo de acetificação, quando o álcool é oxidado a ácido acético por bactérias do gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter* (ADAMS e MOSS, 2008; ZANCANARO, 2001).



O termo vinagre vem do francês *vinaigre* que significa 'vinho azedo'. O vinagre recebeu essa denominação devido ao processo de acetificação que os vinhos (expostos ao ar) sofriam durante o armazenamento. Além do vinho de uva, o vinagre pode ser produzido de sucos de outras frutas como a maçã, abacaxi, laranja, pera, morango, framboesa, banana, ameixa, pêssigo, jabuticaba e caqui; fontes cereais como o arroz, cevada, centeio, milho e trigo, bem como, tubérculos amiláceos, como a batata, batata-doce e mandioca. São comuns, também, os vinagres de xarope de açúcar, melaços diversos, mel e soro do leite ou, então, de fontes alcoólicas diluídas como do álcool

propriamente dito, aguardente e outros destilados (ADAMS; MOSS, 2008; FAO/WHO, 2000; ZANCANARO, 2001).

A diversidade de matéria-prima na produção de vinagre implica diferença da composição do produto. O mesmo ocorre nos vinagres obtidos a partir de uvas brancas em comparação àqueles de uvas tintas, bem como, em seus atributos sensoriais (RIZZON; MIELE, 1998).

Segundo o '*Agriculture and Agri-Food Canada*' (2011), no ano de 2009, a Itália exportou cerca de U\$ 258 milhões em vinagre, seguida da Alemanha (\$ 31 milhões), Espanha (\$ 30 milhões) e França (\$ 27 milhões). Neste mesmo ano os Estados Unidos importaram cerca de 98 milhões de dólares, seguidos pela Alemanha (\$ 72 milhões), França (\$ 38 milhões) e Reino Unido (\$ 30 milhões). O Brasil, no ano de 2007, produziu pouco mais de 2 milhões de litros de vinagre, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

A legislação brasileira, por meio do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2012) preconiza o mínimo de 4% (m/v) de acidez acética em vinagres.

3.1.2 Métodos de Produção

Existem três diferentes processos para produzir vinagre a partir de uma solução diluída de etanol.

3.1.2.1 Processo lento ou Orléans

Este método de produção, também denominado de processo francês ou Orléans, é conhecido desde a Antiguidade, entretanto foi aprimorado há apenas duzentos anos. O processo lento é decorrente da exposição do vinho ao ar (ZANCANARO, 2001). Na Antiguidade, o vinho estocado em barricas semicheias era contaminado por bactérias acéticas, as quais promoviam a conversão do etanol em ácido acético. Atualmente, o método permanece com o mesmo princípio, porém, o conhecimento e as tecnologias adquiridas permitiram o melhor controle das variáveis de processo. Durante a fermentação lenta, as bactérias acéticas produzem um polímero alfa-celulose denominado zoogleia. Este polímero quando submerso dificulta o processo fermentativo por limitar a

difusão de oxigênio e a retirada de produto (ADAMS; MOSS, 2008; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; ZANCANARO, 2001).

No processo de obtenção de vinagre, a adição de vinho e a retirada de vinagre devem ser realizadas em quantidade e periodicidade constantes. Desta maneira, o processo torna-se semicontínuo. O vinagre obtido por este método é considerado de qualidade superior, uma vez que durante a produção ocorre amadurecimento e redução da pungência, tornando-o mais suave e aceitável sensorialmente (SPINOSA, 1996; 2002).

3.1.2.2 Processo rápido ou alemão

Este método consiste na recirculação da mistura vinho/vinagre por um material que serve de suporte, com elevada área superficial exposta (bagaço de cana, madeira, carvão e bambu). As bactérias acéticas permanecem aderidas a este suporte e o ar atmosférico circula em contracorrente. O gerador pode ser construído em alvenaria, aço ou polipropileno. Porém, devido ao pouco controle sobre o processo e altas taxas de contaminações por insetos e nematóides o método está em desuso para produção em grande escala. (ZANCANARO, 2001).

3.1.2.3 Processo submerso

Entre as indústrias vinagreiras, o processo submerso é o de maior produtividade e, também, o mais difundido. As bactérias acéticas ficam suspensas no meio que é oxigenado por um sistema autoaspirante, localizado no fundo do biorreator que incorpora ar. O acetador conta com um alcoógrafo, para o monitoramento do teor alcoólico, com dispositivo quebra-espuma, que atua por centrifugação, localizado na parte superior do tanque de acetificação e com sistemas automáticos de carga e descarga (ADAMS; MOSS, 2008; ZANCANARO, 2001). O acetador mais utilizado para a produção submersa de vinagre é o acetificador de Frings, patenteado por Heinrich Frings, a partir de conclusões desenvolvidas por Otto Hromatka e Heinrich Ebner, em 1949 (SPINOSA, 2002).

Neste método, o produto é retirado e o meio repostado quando a concentração de etanol atinge 0,2%. O consumo total do etanol prejudica o processo fermentativo pela oxidação do ácido acético a dióxido de carbono e água pelas bactérias

acéticas. A condução da fermentação é semicontínua, uma vez que, em sistemas implementados, há a retirada e adição de $\frac{1}{4}$ de produto e substrato alcoólico, respectivamente (ZANCANARO, 2001).

O vinagre forte, quando retirado do acetificador, encontra-se turvo, sendo necessária sua filtração. O tempo de fermentação dependerá da concentração alcoólica do meio. O vinho para acetificação necessita ser suplementado para aumentar a produtividade (ADAMS; MOSS, 2008; ZANCANARO, 2001).

3.1.2.4 Comparação entre métodos de produção de vinagres

É possível obter vinagres de qualidade a partir de qualquer um dos três métodos uma vez que os requisitos básicos de produção devem ser severamente seguidos. Entretanto, outros fatores como custo de equipamentos, produtividade e facilidade operacional devem ser levados em consideração. O processo submerso é exclusivo para a produção industrial de vinagre e de ácido acético, devido a sua alta produtividade e o alto custo com equipamentos. Já o processo lento é artesanal ou semi-artesanal, por conta de sua baixa produtividade e baixo custo. Existem outros métodos de produção de vinagre, no entanto os três métodos citados dão a ideia histórica do processamento do vinagre e a evolução tecnológica dos processos. De maneira geral, qualquer método de produção de vinagre terá como parâmetros de controle a acidez, teor alcoólico, tempo, frequência e vazão da adição e retirada de meio de cultivo e em alguns casos a difusão de oxigênio (ZANCANARO, 2001).

3.1.3 Bioquímica das Fermentações Alcoólica e Acética

Em termos bioquímicos, a fermentação é a degradação de carboidratos em condições anaeróbias, ou seja, o aceptor final de elétrons é uma molécula diferente de oxigênio. Na biotecnologia industrial a denominação fermentação é utilizada quando se faz o uso de reatores biológicos ou mesmo enzimáticos (bioquímicos) para a obtenção de um determinado produto, seja este um produto de metabolismo propriamente dito (enzimas) ou mesmo células. Logo, fermentação acética tem enquadramento no uso biotecnológico industrial, visto que, a via bioquímica de produção de ácido acético é, na verdade, uma oxidação aeróbica (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008;

(Fonte: LIMA; BASSO; AMORIM, 2001)

Cada molécula de glicose, por exemplo, é convertida em duas moléculas de piruvato, que sofrem ação das enzimas descarboxilase pirúvica e álcool desidrogenase, as quais produzem duas moléculas de etanol e duas de dióxido de carbono. O objetivo da levedura ao fermentar os açúcares é produzir ATP (adenosina trifosfato), molécula essa altamente energética utilizada para realização das atividades fisiológicas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008; NELSON; COX, 2004; SMITH, MARKS; LIEBERMAN, 2005).

Durante a atuação da levedura, não apenas a via de catabolismo de carboidratos está atuante, mas, também diversas outras funções metabólicas. E, como consequência, há a produção de diversos outros compostos além do etanol e gás carbônico. Estima-se que cerca de 5% dos carboidratos metabolizados sejam desviados para gerar produtos secundários da fermentação. A Tabela 1 apresenta alguns produtos secundários relacionados ao metabolismo das leveduras (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Tabela 1. Proporção de diversos produtos do metabolismo fermentativo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em g/L de glicose metabolizada.

Produtos da fermentação	(g/L)
Etanol	43,0 – 47,0
Gás carbônico	41,0 – 45,0
Glicerol	3,0 – 6,0
Ácido succínico	0,3 – 1,2
Ácido acético	0,1 – 0,7
Óleo fúsel	-
Butilenoglicol	-
Biomassa (massa seca)	1,0 – 2,0

(Fonte: LIMA; BASSO; AMORIM, 2001. Adaptada)

O metabolismo de síntese de ácido acético, proveniente do etanol ainda não está completamente elucidado. Porém, sabe-se que as enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase são as responsáveis pela conversão do etanol em acetaldeído e, posteriormente, em ácido acético (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

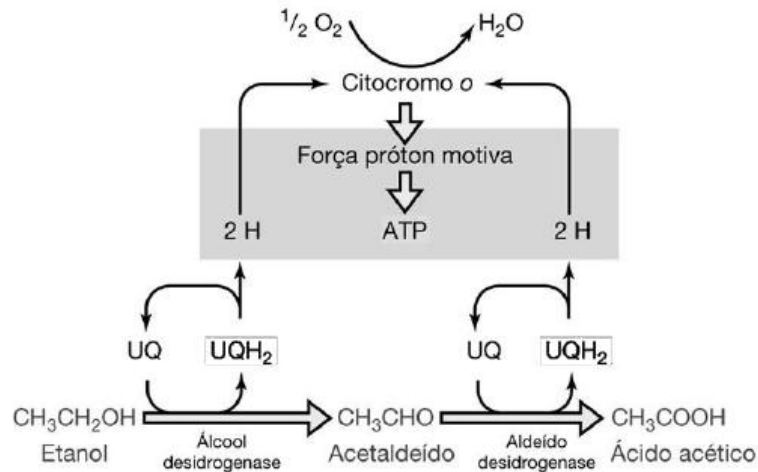


Figura 2. Oxidação do etanol a ácido acético por ação das enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase.

(Fonte: MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008)

3.1.4 Microrganismos Utilizados nas Fermentações Alcoólica e Acética

Os microrganismos comumente utilizados na produção de álcool e, posteriormente, do vinagre são a *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias do ácido acético (BAA), respectivamente.

3.1.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo eucarioto mais difundido na produção de alimentos fermentados e, também, na produção de etanol combustível. O curto tempo de multiplicação, a alta adaptabilidade e facilidade de manipulação genética, são fatores que justificam o vasto conhecimento encontrado na literatura acerca deste microrganismo. Quanto à fonte de carbono, a *S. cerevisiae* utiliza preferencialmente, hexoses (glicose), já a metabolização de pentoses (xilose) é limitada, pois os genes responsáveis são pouco expressivos. O consumo de polissacarídeos depende da excreção de enzimas como a amilase e hemicelulase. Apesar de ser um microrganismo facultativo, a fermentação é sua rota metabólica preferencial, mesmo na presença de oxigênio (efeito Crabtree), por outro lado ela é capaz de oxidar o etanol produzido a dióxido de carbono e água. O metabolismo aeróbio é preferencial quando a concentração

de glicose ou outra fonte de carbono é basal. Outros nutrientes de importância para o desenvolvimento das leveduras são a presença de sais e fonte de nitrogênio. Em geral, os meios utilizados para biocombustíveis necessitam de suplementações de nitrogênio e fósforo. Entretanto esse é um fator que dependerá de variáveis como a linhagem da levedura, a concentração do inóculo e matéria-prima utilizada como meio de cultivo. O pH ácido favorece o desenvolvimento desses microrganismos e diminui a incidência de contaminantes. A *S. cerevisiae* é naturalmente resistente ao etanol. No entanto existem linhagens de leveduras capazes de suportar alto teor de etanol. Essas linhagens são muito utilizadas pelas usinas sucroalcooleiras (LALUCE et al., 2012).

3.1.4.2 Bactérias do ácido acético (BAA)

São classificados como bactérias do ácido acético bacilos mesófilos, Gram negativos, dotados de flagelos polares ou peritríquios, aeróbios estritos que oxidam açúcares com produção de ácidos orgânicos e oxidam etanol a ácido acético. Essas bactérias são resistentes ao ácido, podem desenvolver-se em pH inferior a 5,0, o que as tornam favoráveis para a produção de vinagre e até mesmo ácido acético. Os dois principais gêneros são o *Acetobacter* e o *Gluconobacter* (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

As bactérias do gênero *Acetobacter* possuem flagelos peritríquios e são consideradas superoxidantes, pois, são capazes de oxidar o etanol em ácido acético e este em água e gás carbônico. Isso ocorre porque estas possuem todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico atuantes. Apesar dessa característica, são as mais encontradas nas culturas acéticas industriais devido a sua alta produtividade. O gênero *Gluconobacter* possui flagelos polares e são denominadas suboxidantes por possuírem o ciclo do ácido cítrico incompleto (ADAMS; MOSS, 2008; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008). As indústrias vinagreiras raramente utilizam culturas puras de BAA. Quando isso acontece os vinagres produzidos apresentam características sensoriais inadequadas em relação àqueles produzidos com culturas mistas (WAITES et al., 2001).

As BAA são frequentemente encontradas em alimentos alcoólicos como vinhos, cervejas e cidra. As bactérias suboxidantes, quando metabolizam monossacarídeos produzem o ácido do respectivo carboidrato. Em meio que contém glicose, esta será oxidada a ácido glucônico; a partir da galactose será gerado ácido

galacturônico, e assim, sucessivamente. Esses microrganismos são capazes, também, de sintetizar um polímero celulósico denominado zoogleia ou “mãe do vinagre” (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2008).

3.2. MELAÇO DE SOJA

A soja possui grande variação genotípica, em termos agronômicos como rendimento, ciclo reprodutivo, e resistência ao estresse e doenças; composição química, sobretudo no conteúdo de óleo e proteínas, composição de ácidos graxos, e tipos de proteínas de reserva; e em características de aparência. Tais variações são determinantes na utilização do grão para elaboração e aplicação em alimentos. Devido às diferenças de uso, dois tipos de grãos de soja emergiram: grãos destinados a alimentação humana e grãos para óleo. Os grãos para óleo incluem todos os comumente produzidos a partir de soja. Por outro lado, os grãos para alimentação humana vêm sendo selecionados e desenvolvidos para o consumo direto. Tais grãos não diferem grandemente das variedades de óleo, exceto pelo alto teor proteico, menor produtividade e baixo teor de óleo (LIU, 1997).

No hemisfério leste, a soja é comumente utilizada na elaboração dos produtos tradicionais, voltados para o humano, incluindo o *tofu*, extrato aquoso, brotos de soja, *miso*, *natto* e *tempeh*. No oeste, a maior parte é destinada a extração de óleo e produção de farinha desengordurada. O óleo é majoritariamente consumido na alimentação humana, enquanto, a farinha é destinada para a alimentação animal. Apenas uma pequena porção é processada em ingredientes proteicos, o que inclui a farinha de soja, concentrado proteico, isolado proteico, e proteína texturizada de soja. Esses ingredientes têm sido aplicados em diversos produtos cozidos, lácteos, cárneos e em fórmulas infantis, denominados produtos modernos de soja. Os grãos de soja destinados à extração do óleo e produção de farinha e derivados são os mais cultivados devido seu interesse econômico (LIU, 1997).

O melaço de soja é um líquido viscoso de coloração marrom e sabor agridoce, gerado durante a produção do concentrado proteico de soja (CHAJUSS, 2004).

O concentrado proteico (72% proteína) é obtido pela remoção de açúcares e outros componentes hidrossolúveis presentes na farinha de soja desengordurada. Para tal, três processos podem ser utilizados: (1) a lixiviação ácida, baseada na precipitação das proteínas pelo ponto isoelétrico (pH 4,5); (2) emprego de

calor úmido, que precipita as proteínas, e posterior lixiviação com água onde carboidratos e outros componentes solúveis são arrastados e; (3) por meio de extração hidroalcoólica, onde se faz a lavagem da farinha desengordurada com solução de 60-80% de etanol. Este último método é o mais utilizado em escala industrial. O solvente é então recuperado por evaporação e retorna ao processo, os componentes sólidos do extrato são concentrados e o remanescente, denominado de melaço de soja. Comercialmente, o melaço é vendido desidratado como suplemento de ração animal (LIU, 1997).

Estima-se que para cada tonelada de soja processada podem ser obtidos cerca de 230 kg de melaço (SIQUEIRA, 2008). O fluxograma de obtenção do melaço e do concentrado proteico a partir da farinha desengordurada é apresentado na Figura 3.

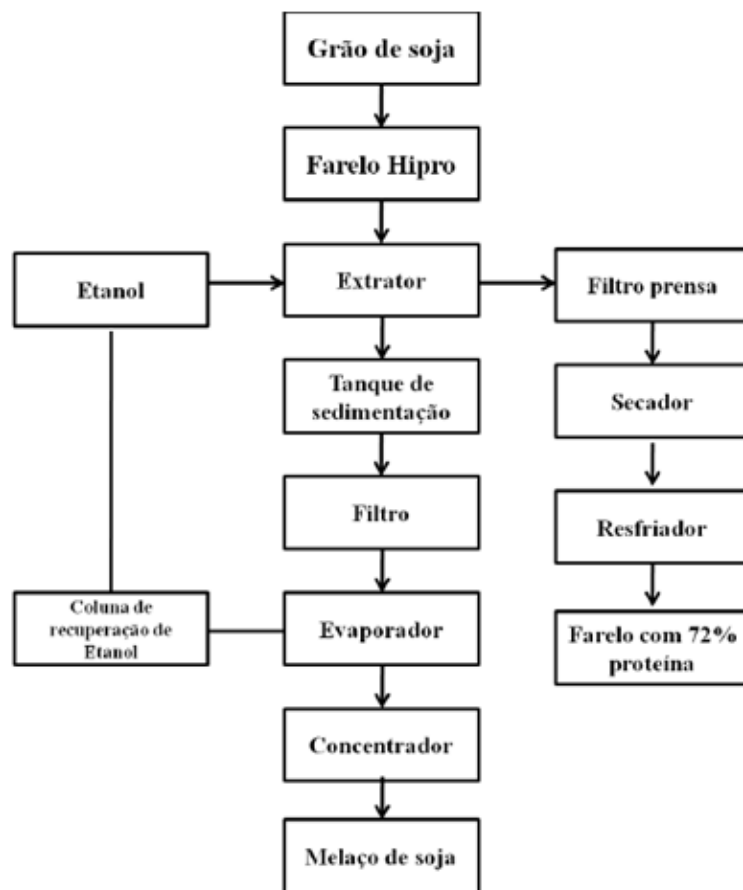


Figura 3. Fluxograma de produção do farelo de soja concentrado e obtenção do melaço de soja.

(Fonte: SIQUEIRA, 2008. Adaptado)

O melaço de soja é rico em açúcares (Tabela 2), dos quais a estaquiose e

a sacarose são os mais abundantes (LIU, 1997). A sacarose e os monossacarídeos são facilmente bioconvertidos a etanol pela levedura *S. cerevisiae*. Mas a estaquiose e a rafinose necessitam de hidrólise prévia, uma vez que a levedura não possui enzimas responsáveis pelo rompimento das ligações alfa-galactose (Figura 4) desses açúcares (MACHADO, 1999).

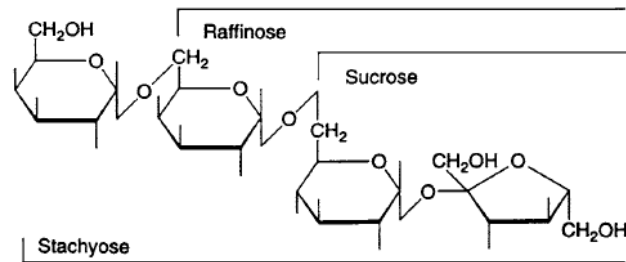


Figura 4. Estrutura dos carboidratos da soja.

(Fonte: LIU, 2004)

Os componentes minoritários do melão incluem as isoflavonas, saponinas, ácidos fenólicos, ômega 3 e outros diversos componentes presentes no grão de soja, que são arrastados no solvente hidroalcoólico. Tais compostos merecem destaque por serem considerados antioxidantes dietéticos, sobretudo as isoflavonas. (LIU, 2004).

Tabela 2. Composição aproximada do melão de soja em base seca.

Componente	Porcentagem %
Açúcares totais	58 – 65
Oligossacarídeos	
Estaquiose	23 – 26
Rafinose	4 – 5
Dissacarídeos	
Sacarose	26 – 32
Monossacarídeos	
Frutose	1,2 – 1,6
Glicose	0,9 – 1,3
Conteúdo proteico	5 – 7
Material lipídico	4 – 7
Cinzas	3 – 7
Saponinas	6 – 15
Isoflavonas	0,8 – 2,5

(Fonte: CHAJUSS, 2004. Adaptado)

3.2.1 Isoflavonas.

As isoflavonas são um grupo de compostos da classe dos flavonóides formados por uma estrutura básica comum (Figura 5), constituída por dois anéis benzenos unidos por uma ponte de três carbonos que podem ou não estar formando um anel pirano. Na soja, as isoflavonas são encontradas em três formas básicas: daidzeína, genisteína e gliciteína. Cada uma dessas formas básicas, denominadas de agliconas ou formas livres, pode estar em uma forma glicosídica ou duas outras formas glicosídicas conjugadas: acetilglicosídica e malonilglicosídica, totalizando doze formas químicas (Figura 6) diferentes (LIU, 2004).

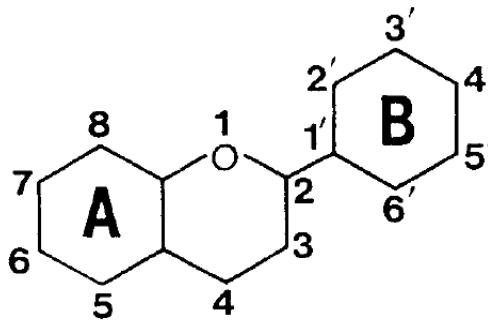


Figura 5. Estrutura química comum dos flavonóides.

(Fonte: LIU, 2004)

Estudos demonstraram que as isoflavonas possuem ação benéfica no organismo humano, agindo como fator de prevenção na ocorrência de doenças cardiovasculares, câncer e osteoporose, além de competir, levemente, com o estrogênio, diminuindo os sintomas pré e pós-menstrual (LIU, 2004).

A farinha de soja desengordurada, o gérmen e o melaço de soja têm sido usados como matéria-prima para a extração das isoflavonas, sendo que a extração por meio do melaço é a mais difundida (LIU, 2004).

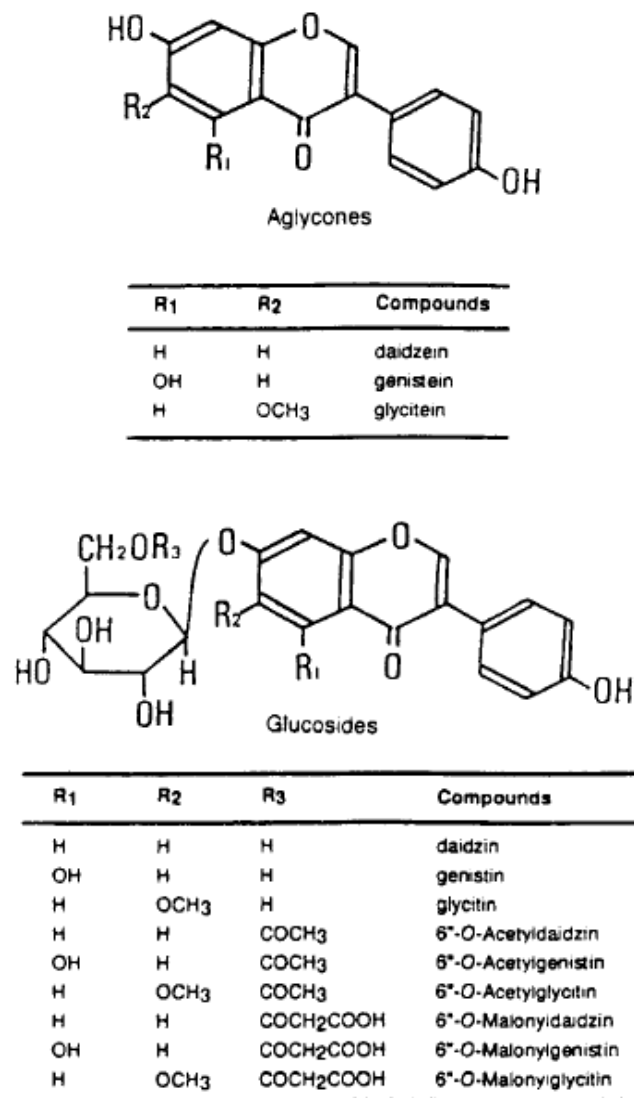


Figura 6. Estrutura química e radical das isoflavonas agliconas, glicosídicas e glicosídicas conjugadas.

(Fonte: LIU, 2004)

4 Material e métodos

4.1 MATÉRIA-PRIMA

O melação de soja utilizado neste trabalho foi obtido da empresa processadora de soja Selecta[®], localizada na cidade de Araguari, Minas Gerais.

4.1 MICRORGANISMOS

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCT 0759 (ATCC[®] 2345), utilizada na fermentação alcoólica, foi obtida na Fundação André Tosello de Pesquisa Tecnológica, situada na cidade de Campinas, São Paulo.

Para a promoção da fermentação acética foi utilizada cultura mista de bactérias do ácido acético, provenientes da indústria produtora de vinagre Tecnologia em Saúde, Indústria de Alimentos, localizada na cidade de Assis, São Paulo.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os testes iniciais para a fermentação alcoólica foram conduzidos em frascos erlenmeyer, em incubadora de bancada (Cientec[®], Brasil, CT-712 R), com controle de temperatura ou em estufa incubadora (TECNAL[®], Brasil, B.O.D. TE-391).

As cinéticas das fermentações alcoólicas e acética foram conduzidas em batelada, em biorreator experimental de bancada (BioFoco[®], Brasil, Rubia *basic*) com as seguintes características: volume total (6L) e volume operacional (4L), dotado de entrada de gases, sistema trocador de calor do tipo 'jaqueta', medidor de pH e temperatura.

4.2.1 Demais Equipamentos

Microdestilador de álcool TECNAL[®] TE-012; Espectrofotômetro Thermo[®] Genesys6; Refratômetro portátil ATAGO[®] Pocket PAL-BX/RI; Autoclave FABBE[®] Primar; Destilador de nitrogênio Marconi[®] MA – 036; Microscópio ótico Olympus CH30.

4.3 REAGENTES

Os reagentes utilizados nas análises químicas foram de grau analítico (P.A.), enquanto utilizados em cromatografia foram de padrão cromatográfico.

4.4 CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos em três etapas: (1) estudo do efeito do teor de sólidos solúveis (°Brix) sobre o rendimento e produtividade da fermentação alcoólica, nas condições com agitação ou estática, (2) estudo dos parâmetros cinéticos do desenvolvimento microbiano, consumo de substrato e obtenção de produto nos melhores valores de rendimento e produtividade das fermentações estática e sob agitação e por fim a (3) fermentação acética do fermentado alcoólico.

4.4.1 Ativação e Preparo do inóculo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi ativada em caldo *yeast malt* (YM) a 30°C, por 24 horas e 150 rpm em incubadora de bancada (Cientec[®], Brasil, CT-712 R). Após a ativação, o microrganismo foi adaptado ao melaço de soja pela transferência sucessiva de 10% de inóculo para diferentes diluições de melaço (10, 15 e 20 °Brix). O melaço foi previamente esterilizado em autoclave (FABBE[®], Brasil, Primar), a 121°C por 15 minutos. Para cada concentração de melaço, a levedura permaneceu por 24h, nas mesmas condições da etapa de ativação. A última diluição (20 °Brix) foi tomada como inóculo para a condução dos experimentos.

4.4.2 Efeito da Concentração Inicial de Melaço de Soja na Produção de Etanol

A fermentação alcoólica com diferentes teores de sólidos solúveis (20, 25 e 30 °Brix) foi inicialmente realizada em frascos erlenmeyer em incubadora rotatória a 150 rpm ou estática em estufa incubadora (TECNAL[®], Brasil, B.O.D. TE-391). A concentração inicial de inóculo foi de 10% (10^7 células/mL), a temperatura foi mantida em 30 °C e pH 5.5. O tempo de fermentação foi o necessário para a estabilização do valor de °Brix ou ausência de bolhas provenientes da liberação de CO₂. Os meios para fermentação foram

esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.4.3 Cinética das Fermentações Alcoólicas sob as Condições de Agitação ou Estática

Os dados cinéticos foram obtidos da fermentação em reator experimental (item 4.2) nas condições de 30 °Brix inicial, 30 °C, 10% de inóculo e 250 rpm para a fermentação sob agitação, as mesmas condições de concentração inicial de melaço, temperatura e concentração de inóculo foram adotadas para a cinética sem agitação.

4.4.4 Fermentação Acética

A fermentação acética ocorreu em biorreator como descrito no item 4.2. No início do processo de acetificação, foi preparada uma calda a partir da mistura de vinagre de álcool de cereal (milho), não filtrado (10% (m/v) em ácido acético) e de álcool de cereal (milho) (50% (v/v)). A concentração total (CT) da calda inicial foi de 10%, sendo 5% (v/v) em etanol e 5% (m/v) em ácido acético. A CT é definida como a soma da concentração de etanol (%v/v) e ácido acético (%m/v) (SPINOSA, 2002).

Os ciclos fermentativos foram acompanhados e a retirada de produto era feita quando a concentração de etanol, na calda, atingia o teor igual ou menor a 0.5% (v/v). A reposição com fermentado alcoólico de melaço centrifugado (12000 x g/15min a 4°C) foi necessária para manutenção da CT. Foram acompanhados oito ciclos fermentativos sendo os dados de rendimento e produtividade calculados a partir de cada ciclo. As condições do processo foram de 0,5 L/min de vazão ar, 800 rpm e a contagem de bactérias do ácido acético no fermentador permaneceu igual ou superior a 10⁸ UFC/mL. O produto foi caracterizado quanto ao extrato seco, cinzas, acidez acética, etanol, açúcares remanescentes e densidade a 20°C.

4.5 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.5.1 Extrato seco e cinzas

A determinação de extrato seco do melaço e do fermentado acético foi

realizada por estufa a 105°C e cinzas pelo método de mufla a 550°C (IAL,2008)

4.5.2 Determinação de Nitrogênio Total

O nitrogênio total no melaço de soja foi quantificado por metodologia de Kjeldahl. Tomando o valor 6,25 como fator de conversão (IAL, 2008).

4.5.3 Determinação de Lipídios

Os lipídios totais foram quantificados por Bligh-Dyer (1959).

4.5.4 Determinação de Açúcares Totais por Fenol-sulfúrico

A quantificação de açúcares totais se deu pela metodologia de fenol-sulfúrico (DOUBOIS et al., 1956). A técnica consistiu em adicionar 0,5 mL da amostra, devidamente diluída e centrifugada, em 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. A mistura permaneceu em repouso por 20 minutos. Após este tempo, foi realizado a leitura em absorbância, da densidade ótica em espectrofotômetro (Thermo[®], EUA, Genesys6) a 490 nm, a posição zero do aparelho foi obtida com 0,5 mL de água destilada em 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico.

A curva de padrão foi realizada com cinco diferentes diluições de solução de glicose com entre 20 e 100 µg/mL.

4.5.5 Determinação de Etanol por Densimetria

O fermentado alcoólico ou vinagre foi previamente destilado em microdestilador de álcool (TECNAL[®], Brasil, TE-012) e a quantificação realizada por meio de análise de densidade em densímetro digital (Rudolph Research Analytical[®], EUA, DDM 2909).

4.5.6 Acidez Total

A acidez total foi determinada por titulação com NaOH 0,1M tendo fenolftaleína (1%) como indicador de pH. Cada mililitro da solução de hidróxido de sódio consumida corresponde a 0,6% de acidez, expressa em gramas de ácido acético ($\text{H}_3\text{C-COOH}$), por 100 mL de solução (BRASIL, 2005).

4.5.7 Densidade Relativa a 20°C

A análise de densidade foi realizada em densímetro digital (Rudolph Research Analytical[®], EUA, DDM 2909) a 20°C.

4.5.8 Determinação de Fenólicos Totais

As amostras foram diluídas em água destilada e submetidas à determinação de fenólicos totais pela oxidação destes compostos em meio alcalino pelo ácido fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, resultando na coloração azul originada pelos azuis de wolfrâmio e molibidênio.

O ensaio se deu pela adição de 0,1 mL da amostra em 2,5 mL solução aquosa Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. A amostra foi mantida em banho-maria a 50°C por 5 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo[®], EUA, Genesys6) na absorvância de 760 nm. O branco foi realizado como referência, substituindo o volume de amostra por água destilada. O resultado foi expresso em miligramas de ácido gálico por cem mililitros (mg GAE/100mL) (MACIEL et al., 2011).

4.5.9 Extração e Quantificação de Isoflavonas por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A extração de isoflavonas foi realizada pela diluição de 20 vezes do melão de soja e 3,5 vezes do vinho ou fermentado acético em solução extratora (água ultrapura, acetona e etanol, na proporção 1:1:1). As amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos a cada 15 minutos por 1 hora e depois em banho ultrassônico por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 794 x g em centrífuga previamente

refrigerada a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF 0,22 µm. O filtrado foi submetido à cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE), como descrito por Handa et al.. (2014). O cromatógrafo *UltraPerformance Liquid Chromatography* (Waters®, EUA, Acquity UPLC) possui sistema de injeção automática, forno com temperatura controlada de 35°C e detector de arranjo de diodos (DAD). A eluição da amostra foi realizada em coluna de fase reversa BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm, partículas de 1,7 µm). Para a separação foi utilizado um sistema de gradiente binário, não linear, com fase inicial de 90% de água acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. O detector foi ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. As soluções-padrão para a construção das curvas de calibração foram daidzina, genistina, glicitina, malonil-daidzina, malonil-genistina, malonil-glicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, gliciteína, genisteína e daidzeína.

A identificação e a quantificação das isoflavonas foram feitas por comparação dos tempos de retenção e espectros na região do UV dos padrões de referência.

4.5.10 Contagem das Células

4.5.10.1 Leveduras

A contagem das células de *S. cerevisiae* foi realizada em câmara de Neubauer com leitura em microscópio ótico, (Olympus®, Japão, CH30). Foram considerados cinco quadrados, uma vez que cada quadrado possui 25 quadrículas com volume de 0,1 mm³ (0,1 µL).

As amostras foram diluídas e transferidas para a câmara de contagem com auxílio de micropipeta estéril. O corante azul de metileno (1% m/v) foi empregado para a identificação de células viáveis. O resultado foi expresso em logaritmo do número de células por mL (log cel/mL) de acordo com a equação 1.

$$\log \text{ cel/mL} = \log \left(\frac{n^{\circ} \text{ células} * 1/Vq}{n^{\circ}q} * 25 * D \right) \quad (1)$$

Sendo, n° células o número total de células vivas (não coradas) contadas nas quadrículas; $n^{\circ}q$ o número de quadrículas contadas; Vq o volume de cada quadrícula (0,0001 mL); e D a diluição.

4.5.10.12 Bactérias do ácido acético

As bactérias do ácido acético foram quantificadas por contagem em placas, com meio '*manitol, yeast and peptone*' (MYP) em dupla camada (0,5% de ágar na camada inferior e 1% na superior) a 30°C por 48 horas e expressas em unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (SPINOSA, 2002).

4.6 CÁLCULOS DE RENDIMENTOS, PRODUTIVIDADES E PARÂMETROS CINÉTICOS

4.6.1 Rendimento da Fermentação Alcoólica

O rendimento sobre os açúcares totais iniciais ($Y1$), sobre os açúcares consumidos ($Y2$) e o rendimento da formação de produto sobre o substrato consumido (Yp/s) foram calculados a partir das equações 2, 3 e 4, respectivamente.

$$Y1(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si, g/L) * 0,511} \quad (2)$$

$$Y2(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si - Sf,) * 0,511} \quad (3)$$

$$Yp/s(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si - Sf)} \quad (4)$$

Sendo, Pf o etanol final (g/L); Pi o etanol inicial (g/L); Si os açúcares totais iniciais (g/L); Sf os açúcares totais finais (g/L).

4.6.2 Parâmetros Cinéticos e Tempo de Geração

As taxas instantâneas de formação de células (r_x), consumo de substrato (r_s) e formação de produto (r_p) foram obtidos da inclinação da reta onde os dados melhor se ajustaram. Neste intervalo, as velocidades são máximas e constantes. O ângulo representa a variação de número de células, substrato ou produto sobre a variação de tempo, representado pelas equações 5, 6 e 7.

$$r_x (\log \text{ cel/mL/h}) = \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

$$r_s (g/L/h) = \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

$$r_s (g/L/h) = \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

Sendo, dX a variação da contagem de células (log cel/mL) em um intervalo de tempo; dP a variação de etanol (g/L) em um intervalo de tempo; dS a variação de açúcares totais no intervalo de tempo (g/L); e dt a variação de tempo (h).

A taxa específica de formação de células (μ_x) foi calculada pela expressão 8.

$$\mu_x (h) = r_x * \frac{1}{X} \quad (8)$$

Sendo, r_x a variação logarítmica do número de células por mL em uma variação de tempo (log cel/mL/h); e X o logaritmo de células por mL no tempo (log cel/mL).

O tempo de geração (t_g) foi calculado pelas equações 9 e 10.

$$t_g(h) = \frac{t}{n} \quad (9)$$

$$n = \frac{\log X - \log X_i}{\log 2} \quad (10)$$

Sendo, t é tempo (h); $\log X$ é o logaritmo de células por mL (log cel/mL) no tempo t ; $\log X_i$ é o logaritmo de células por mL (log cel/mL) no tempo inicial.

4.6.3 Rendimento da Fermentação Acética

O rendimento em ácido acético (Y_{AA}), rendimento em concentração total (Y_{CT}) e produtividade em ácido acético (P_{AA}) foram calculados pelas expressões 11, 12 e 13, respectivamente.

$$Y_{AA} = \frac{AA_2 * 0,77 * 100}{V_r} \quad (11)$$

$$Y_{CT} = \frac{CT_2 * 100}{CT_1} \quad (12)$$

$$P_{AA} = \frac{V_f * AA_2}{t * V_r} * 10 \quad (13)$$

Sendo, AA_2 a acidez acética final (g/100mL); V_r o volume do reator, CT_1 a concentração total (%) no início do ciclo; CT_2 a concentração total (%) no final do ciclo; V_f o volume (L) de produto retirado; t o tempo (h) do ciclo.

5 REFERÊNCIAS

ADAMS, M.R. MOSS, M.O. Fermented and Microbial Foods. In: ADAMS, M.R. MOSS, M.O. **Food Microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. v. 1, p. 356-362.

AGRICULTURE AND AGRI-FOOD OF CANADA. **The Global Vinegar Market: Opportunities for Canadian Vinegar Exporters**, jan. 2011.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** v.37, p. 911-917. 1959

BORZANI, W. Cinética de reações enzimáticas. In: AQUARONE, E., *et al.* **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na Produção Alimentos**. São Paulo: Editora Blücher, v.4, 2001. p.183-208.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa Nº 24, de 8 de Setembro de 2005**. Brasília: Imprensa Nacional, 2005.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Instrução Normativa Nº 6, de 3 de Abril de 2012**. Brasília: Imprensa Nacional, 2012.

CHAJUSS, D. Soy Molasses: Processing and Utilization as a Functional Food In: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, R.F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.** v.28, p.350–356. 1956.

FAO/WHO, Food Standards Programme. **Proposed Draft Revised Regional Standard for Vinegar**. Rome, Italy, 2000.

HANDA, C.L., COUTO, U.R., VICENSOTI, A.H., GEORGETTI, S.R, IDA, E.I. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. **Food chemistry**. v.152, p. 56-65. 2014.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Diretoria de Pesquisa. Coordenação das Estatísticas Econômicas e Classificações. Lista de Produtos da Indústria. **Prodlist– Indústria 2010**, Rio de Janeiro, 2011.

LALUCE, C. LONGO, E. POMBEIRO-SPONCHIADO, S.R. CILLI, E.F. GALLARDO, J.C.M e MASIERO, M.O.C. A complexibilidade da produção de bioetanol em fermentações abertas de matérias-primas industriais. In: LEMOS, E.G.M. STRADIOTO, N.R. **Bioenergia. Desenvolvimento Pesquisa e Inovação**. São Paulo: Editora UNESP, 2012. p. 165-194.

- LEE, J. CHO, H. JEONG, J. LEE, M. JEONG, Y. SHIM, K. SEO, K. K. New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model. **Food Chemistry**, v. 141. p. 3241-3249, june, 2013.
- LEE, S. YOON, S. KIM, G. WOO, S.M. JEONG, Y. YEO, J.S. KIM, K. KWON, J. Effect of Nuruk and Fermentation Method on Organic Acid and Volatile Compounds in Brown Rice Vinegar. **Food Science Biotechnology**. v.21. n.2, p. 453-460, april 2012.
- LIMA, U.A. BASSO, L.C. AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A. *et al...* **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: EdgardBlücher, v.3, 2001. p.1–43.
- LIU, K. Soybeans as a Powerhouse of Nutrients and PhytochemicalsIn: LIU, K. **Soybeans as Functional Foods and Ingredients**. Champaign: AOCS Press, 2004.
- LIU, K. **Soybeans: Chemistry, Technology, and Utilization**. New York:Chapman & Hall, 1997.
- MACHADO, R.P. **Produção de etanol a partir do melaço de soja**. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MACIEL, L.F., OLIVEIRA, C.S., BISPO, E.S., MIRANDA, M.P.S. Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. **Brit. FoodJ**. v.113, p.1103-1113.2011.
- MADIGAN, M.T. MARTINKO J.M. PARKER, J. **Brock – Biología de los Microorganismos**. 10.ed. Madrid: Prentice Hall Iberia, 2008.
- NELSON, D. L. COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4.ed. New York: W.H. Freeman, 2004.
- QIU, J. REN, C. FAN, J. LI, Z. Antioxidant activities of aged oat vinegar *in vitro* and inmouse serum and liver. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90.p. 1851-1958, jun. 2010.
- RIZZON, L.A. MIELE, A. Características analíticas de vinagres comerciais de vinhos brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.1 , n.1,2 , p. 25-31, jan./dez., 1998.
- SIQUEIRA, P.F. KARP, S.G. CARVALHO, J.C. STURM, W. RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A. THOLOZAN, J. SINGHANIA, R.R. PANDEY, A. SOCCOL, C.R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v.99 p. 8156–8163, maio, 2008.
- SMITH, C. MARKS, A.L. e LIEBERMAN. M. **Marks' Basic Medical Biochemistry:A clinical approach**. 2.ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Spinosa, W. A., Santos Júnior, V. dos, Galvan, D., Fiorio, J. L., Gomez, R. J. H. C.. (2015). Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. **Food Science and Technology (Campinas)**, 35(1), 196-201. Retrieved May 29, 2015, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000100196&lng=en&tlng=en. 10.1590/1678-457X.6605.

SPINOSA, W.A. 2002. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. 2002. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

SPINOSA, W.A. 1996. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

WAITES, M. J. MORGAN, N. L. ROCKEY, J. S. HIGTON, G. **Industrial microbiology: An introduction**. 1.ed. London: Blackwell Publishing, 2001.

XU, Q. TAO, W. AO, Z. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. **Food Chemistry**, v.102. p. 841-849, 2007.

ZANCANARO JR., O. Vinagres. In: AQUARONE, E., *et.al.* **Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na Produção Alimentos**. São Paulo: Editora Blücher, v.4, 2001. p.183-208.

ARTIGO

PRODUÇÃO DE FERMENTADO ACÉTICO A PARTIR DE MELAÇO DE SOJA

Lucas C. R. Miranda*, Cyntia A. Tanaka, Elza. I. Ida, Wilma A. Spinosa.

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 580, Londrina, PR, BRA 86057-970.

*Autor para correspondência: Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 580, Londrina, PR, BRA 86057-970. Tel.: +55 43 3337 1480.

Endereço de e-mail: lcrmiranda@gmail.com

ABSTRACT

Soybean molasses is a by-product of protein-concentrate soybean meal production which mostly contains sugars, of which, sucrose is the major. Much part of this by-product is used for animal feed, rejected or, in Brazil, few industries uses the soybean molasses to producing ethanol. The aim of this work was to evaluate the utilization of soybean molasses to produce acetic fermented. It was studied the yield of alcoholic fermentation under different initial concentration of molasses (20, 25 and 30 °Brix) done in static condition or under agitation. The maximum ethanol production was 47.56 g/L for the stirred fermentation. From molasses alcoholic fermented of soybean molasses was produced the acetic fermented and accompanied eight fermentative cycles (five of adaptation and three of production). The average acidity of the fermented was 50.60 g/L with acetic yield (Y_{AA}), total concentration yield (Y_{CT}) and average productivity of 65.01%, 92.76 and 0.033 g/L/h.

Key words: Vinegar. Acetic fermentation. Alcoholic fermentation. Soybean molasses. byproduct.

1. Introdução

O melaço de soja é um líquido viscoso, de coloração marrom e sabor agridoce, proveniente da indústria processadora do concentrado proteico de soja (70% em base seca). A farinha de soja desengordurada é submetida à lavagem com etanol e água para a concentração das proteínas. Os carboidratos e outros compostos hidrossolúveis são arrastados e, posteriormente, concentrados pela evaporação do etanol e parte da água, resultando no melaço. Os açúcares majoritários do melaço são a sacarose, rafinose e estaquiase (Siqueira et al., 2008). Além de carboidratos, o melaço contém proteínas, lipídios, minerais e isoflavonas. (Hosny;Rozzana, 1999; Machado, 1999; Siqueira et al., 2008). Grande parte deste coproduto é utilizada para a alimentação

animal ou então descartado como rejeito. No Brasil, existem indústrias processadoras de soja que utilizam o melaço para produção de álcool hidratado, uma vez que a sacarose é o açúcar predominante e plenamente capaz de ser metabolizado por *Saccharomyces cerevisiae* (Machado, 1999; Siqueira et al., 2008). A rafinose e a estaquiase possuem ligações glicosídicas do tipo α -1,6 e, pela ausência da enzima α -galactosidase, o microrganismo em questão não é capaz de metabolizar estes açúcares (Machado, 1999; Siqueira et al., 2008).

O vinagre é um alimento líquido da classe dos condimentos produzido por dupla fermentação, primeira alcoólica e subsequente acética, a partir de produtos amiláceos e ou açucarados (FAO/WHO, 2000). Apesar do processo de acetificação pelas bactérias do ácido acético (BAA) ser, em termos bioquímicos, uma oxidação, é comum referir-se ao processo de obtenção de vinagre como fermentação.

Há três principais processos para a obtenção do vinagre a partir de matérias-primas alcoólicas diluídas. O processo lento, rápido e submerso (Spinosa, 2002; Valera et al., 2015).

O método submerso consiste na agitação e aeração controlada do mosto fermentativo, onde as bactérias do ácido acético, obrigatoriamente aeróbicas, oxidam o etanol em, primeiramente, acetaldeído e depois em ácido acético. O processo de fermentação acética envolve diversos gêneros bacterianos dos quais podem ser citados *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Ameyamaea* e *Komagataeibacter* (Valera et al., 2015).

Em um fermentador com desenho adequado para o processo submerso, a agitação e a aeração promovem a formação de microbolhas de ar que facilita a difusão do oxigênio, aumentam o contato das bactérias com o substrato e, por consequência, aumentam a eficiência e produtividade da fermentação. Sabe-se que a ausência de aeração por um minuto pode causar oito dias não produtivos (Hitschmann e Stockinger, 1985).

Com o intuito de expandir a utilização do melaço de soja, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de fermentado acético a partir deste coproduto.

2. Material e métodos

2.1. Matéria-prima

O melaço de soja utilizado neste trabalho foi obtido da empresa processadora de soja Selecta[®], localizada na cidade de Araguari, Minas Gerais.

2.2. Caracterização do melão de soja

O melão de soja foi caracterizado para extrato seco por método gravimétrico em estufa a 105°, cinzas em forno mufla a 550°C, proteínas por Kjeldahl (IAL, 2008) e lipídios por Bligh-Dyer (Bligh-Dyer, 1959).

2.3. Ativação dos microrganismos e preparo dos inóculos

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC® 2345) liofilizada foi ativada em caldo *yeast, malt* (YM) a 30°C, por 24 horas e 150 rpm em incubadora de bancada (Cientec®, Brasil, CT-712 R). Após a ativação, o microrganismo foi adaptado ao melão de soja pela transferência sucessiva de 10% de inóculo para diferentes diluições de melão (10,15 e 20 °Brix), esterilizado em autoclave (FABBE®, Brasil, Primar), a 121 °C por 15 minutos. Para cada concentração de melão, a levedura permaneceu 24h, nas mesmas condições temperatura e rotação da etapa de ativação. A última diluição (20 °Brix) foi tomada como inóculo para a condução dos experimentos.

A cultura mista de bactérias acéticas foi adquirida pela coleta de vinagre forte sem filtrar de um fermentador rápido da indústria produtora de vinagres Tecnologia em Saúde Indústria de Alimentos, Assis, São Paulo. O volume de 50 mL de vinagre forte foi adicionado a 250 mL de caldo *manitol-yeast* (MY) mantido sob agitação (Cientec®, Brasil, CT-712 R) a 30 °C por 72 horas. Este inóculo inicial foi transferido para o biorreator (Biofoco®, Brasil. *Rubia basic*) contendo 4 L de uma calda preparada a partir da mistura de vinagre de álcool de cereal (milho), não filtrado (10% (m/v) em ácido acético) e álcool de cereal (milho) (50% (v/v)). A concentração total (CT) da calda inicial foi de 10%, sendo 5% (v/v) em etanol e 5% (m/v) em ácido acético. A CT é definida como a soma da concentração de etanol (%v/v) e ácido acético (%m/v). Quando a concentração de etanol atingiu 0,5% (v/v), foi realizada a troca de calda onde a nova concentração de etanol na calda presente no bioreator foi de 2% (v/v). Após trocas sucessivas e a estabilização do processo, o conteúdo do fermentador foi tomado como inóculo (SPINOSA, 2002). As condições do processo foram 30 °C 0,5 L/min de vazão de ar, 800 rpm e contagem de bactérias igual ou superior a 10⁸ UFC/mL, após a estabilização.

2.4. Fermentação alcoólica

2.4.1. Efeito da concentração inicial de melão de soja na fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica com diferentes teores de sólidos solúveis (20, 25 e 30 °Brix) foi inicialmente realizada em frascos erlenmeyer em incubadora rotatória a 150 rpm ou estática em estufa incubadora (TECNAL[®], Brasil, B.O.D. TE-391). A concentração inicial de inóculo foi de 10% (10^7 células/mL), a temperatura foi mantida em 30°C e pH 5.5. O tempo de fermentação foi o necessário para a estabilização do valor de °Brix ou ausência de bolhas provenientes da liberação de gás carbônico. Os meios para fermentação foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

2.4.2. Cinética da fermentação alcoólica

Os dados cinéticos foram obtidos da fermentação em reator experimental (Biofoco[®], Brasil. Rubia *basic*) nas condições de 30 °Brix inicial, conforme o resultado do efeito da concentração inicial de melaço, 30 °C, 10% de inóculo, pH 5,5 e 250 rpm para a fermentação sob agitação. As mesmas condições de concentração inicial de melaço, temperatura e concentração de inóculo foram adotadas para a cinética sem agitação.

2.5. Fermentação Acética

A partir do biorreator estabilizado com vinagre e álcool de cereais, foi adicionado 0,680 L de fermentado alcoólico de melaço de soja (60 mL/L de etanol) centrifugado ($12000 \times g/15\text{min}$ a 4 °C), de modo que a concentração inicial de etanol foi de 15,20 g/L

Os ciclos fermentativos foram acompanhados e a retirada de produto era feita quando a concentração de etanol, na calda, atingia o teor igual ou menor a 0.5% (v/v). O volume de reposição com fermentado alcoólico de melaço foi a necessária para manutenção da CT. Foram acompanhados oito ciclos fermentativos sendo os dados de rendimento e produtividade calculados a partir de cada ciclo. O produto foi caracterizado quanto ao extrato seco, cinzas, acidez acética, etanol, açúcares remanescentes e densidade a 20 °C.

2.6. Determinação de açúcares totais, etanol, acidez acética total e contagem de células

A quantificação de açúcares totais se deu pela metodologia espectrofotométrica de fenol-sulfúrico tendo glicose como padrão (Douboiset al., 1956).

O fermentado acético ou o fermentado alcoólico foi previamente destilado em micro-destilador de álcool (TECNAL[®], Brasil, TE-012) e a determinação por densidade em densímetro digital (Rudolph Research Analytical[®], EUA, DDM 2909).

A acidez total foi determinada por titulação com NaOH 0,1 M tendo fenolftaleína (1%) como indicador de pH.

A contagem de leveduras foi realizada em câmara de Neubauer com leitura em microscópio ótico, (Olympus[®], Japão, CH30) tendo azul de metileno (1%) como corante diferenciador. Expresso em log do número de células por mL (log cel/mL) (Spinosa, 2002).

As bactérias acéticas foram quantificadas por contagem em placas, com meio *MYP* (*manitol, yeast and peptone*) em dupla camada (0,5% de Agar na camada inferior e 1% na superior) a 30 °C por 48 horas e expressas em unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) (Spinosa, 2002).

2.7. Determinação de isoflavonas

A extração de isoflavonas foi realizada pela diluição de 3,5 vezes do mosto para fermentação, vinho ou fermentado acético em solução extratora (água ultrapura, acetona e etanol, na proporção 1:1:1). Homogeneizadas em agitador de tubos a cada 15 minutos por 1 hora e depois em banho ultrassônico por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 794 x g em centrífuga previamente refrigerada a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) 0,22 µm e submetido à quantificação por UPLC (Waters[®], EUA, Acquity; detector de arranjo de diodos – DAD), em coluna de fase reversa BEH C18 (Waters, 2,1 mm x 50 mm, partículas de 1,7 µm), sistema de gradiente binário, não linear, com fase inicial de 90% de água acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e 10% de acetonitrila. O detector foi ajustado ao comprimento de onda de 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração foram daidzina, genistina, glicitina, malonil-daidzina, malonil-genistina, malonil-glicitina, acetildaidzina, acetilgenistina, acetilglicitina, gliciteína, genisteína e daidzeína.

2.8. Determinação de fenólicos totais

As amostras de mosto, fermentado alcoólico e fermentado acético foram diluídas em água destilada e submetidas à determinação de fenólicos totais pela oxidação destes compostos em meio alcalino pelo ácido fosfowolfrâmico e fosfomolibdico, resultando na coloração azul originada pelos azuis de wolfrâmio e molibidênio.

O ensaio se deu pelo método espectrofotométrico com reagente de Folin-Ciocalteu 10%. O resultado foi expresso em miligramas de ácido gálico por cem mililitros (mg GAE/100mL) (Maciel et al., 2011).

2.9. Cálculos Cinéticos

Os parâmetros cinéticos de taxa de formação de células de (rx), consumo de açúcares totais (rs) e formação de etanol (rp) foram obtidos do coeficiente angular da regressão linear da fase linear de crescimento celular, consumo de açúcares e formação de etanol, onde os dados melhor se ajustaram. Os rendimentos (Y1, Y2 e Yp/s) e a produtividade foram calculados na máxima produção de etanol.

Os cálculos de rendimento da fermentação alcoólica sobre os açúcares totais iniciais (Y1), açúcares consumidos (Y2) e sobre o teórico máximo (Yp/s) estão expressos nas equações 1, 2 e 3. Onde, Pf é etanol final (g/L), Pi é etanol inicial (g/L) e Si é açúcares totais iniciais (g/L) e Sf é açúcares totais finais (g/L).

$$Y1(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si) * 0,511} \quad (1)$$

$$Y2(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si - Sf) * 0,511} \quad (2)$$

$$Yp/s(\%) = \frac{(Pf - Pi) * 100}{(Si - Sf)} \quad (3)$$

Os rendimentos da fermentação acética em acidez (Y_{AA}) e em concentração total (Y_{CT}) e produtividade (P_{AA}) foram calculados pelas equações 4, 5 e 6. Sendo, AA₂ a acidez acética final (%), V_r volume do reator, CT₁ a concentração total inicial (%) e CT₂ a concentração total final (%)

$$Y_{AA} = \frac{AA_2 * 0,77 * 100}{V_r} \quad (4)$$

$$Y_{CT} = \frac{CT_2 * 100}{CT_1} \quad (5)$$

$$P_{AA} = \frac{V_f * AA_2}{t * V_r} * 10 \quad (6)$$

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização do melaço

A Tabela 1 apresenta os principais componentes do melaço de soja, visto que os açúcares são os componentes principais, totalizando 64,05 g/100g em base seca.

Tabela 1. Caracterização do melaço de soja em base seca.

Componente	g/100g
Extrato seco	72,61 ± 0,27
Cinzas	7,52 ± 0,05
Lipídios	9,46 ± 0,26
Proteínas	8,91 ± 0,08
Açúcares Totais	64,05 ± 0,24

3.2. Efeito da concentração inicial de melaço de soja na produção de etanol

A Tabela 2 mostra os valores de rendimentos (Y1 e Y2) para as fermentações com diferentes concentrações iniciais de melaço conduzidas sob agitação (A) e estática (E). Não houve diferença estatística para o rendimento sobre os açúcares totais iniciais (Y1) nas situações estudadas.

Quanto ao rendimento sobre os açúcares consumidos (Y2), no ensaio com agitação (A) e estático (E), as fermentações, com 30 °Brix inicial apresentaram valores de 80,32% e 86,03%, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si, mas diferente dos rendimentos em concentrações iniciais menores de melaço de soja.

O teor de etanol convertido para os ensaios com 30 °Brix inicial apresentaram valores superiores quando comparados aos ensaios de inferior concentração inicial de melaço. O ensaio com 30 °Brix inicial conduzido sob agitação

(30A) apresentou, aproximadamente, 3,7 g/L de etanol, em média, a mais quando comparado com o ensaio de mesmo °Brix inicial em condição estática (30E).

Tabela 2. Parâmetros fermentativos dos experimentos em diferentes sólidos solúveis totais (°Brix) em condição estática (E) ou sob agitação (A). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Amostra	Tempo (h)	AT Inicial (g/L)	AT final (g/L)	Etanol (g/L)	Média Y1 (%)	Média Y2 (%)	Produtividade Média (g/L/h)
20A	24	116,27	45,05	26,31	$42,17 \pm 2,97^a$	$69,51 \pm 3,93^b$	$1,089 \pm 0,10^a$
	24	126,93	50,71	25,99			
25A	28	141,78	62,49	26,62	$36,28 \pm 0,66^a$	$66,34 \pm 0,89^b$	$0,915 \pm 0,05^b$
	28	134,68	62,66	24,65			
30A	72	192,01	92,21	41,87	$42,48 \pm 0,28^a$	$80,32 \pm 2,52^a$	$0,586 \pm 0,01^c$
	72	197,01	90,92	42,58			
20E	48	126,93	56,68	22,83	$35,64 \pm 0,63^a$	$65,10 \pm 2,12^b$	$0,474 \pm 0,00^d$
	48	123,38	56,52	22,75			
25E	72	143,88	54,26	30,82	$43,09 \pm 1,63^a$	$68,65 \pm 1,92^b$	$0,0439 \pm 0,01^d$
	72	143,72	52,81	32,53			
30E	96	190,23	95,28	40,79	$39,51 \pm 3,46^a$	$86,03 \pm 2,79^a$	$0,401 \pm 0,03^d$
	96	191,36	110,78	36,24			

Siqueira et al. (2008) realizaram um estudo com melão de soja para verificar o efeito da concentração inicial sobre o rendimento, onde variou a concentração inicial de 20 a 35 e verificou que a 35 °Brix a concentração de etanol foi superior em relação aos outros estudos. Entretanto, o rendimento (Y1) foi prejudicado, enquanto os ensaios com 20 e 25 °Brix obtiveram valores superiores neste parâmetro. Seu estudo observou que o ensaio com 30 °Brix teve o rendimento (Y1) de 40,97% e concentração de etanol de 56 g/L, julgando ponderado para seguir com os demais estudos.

O tempo estimado de fermentação foi superior quando houve o aumento da concentração inicial de melão e nos casos onde não houve agitação.

Devido ao maior rendimento sobre os açúcares consumidos e valor superior de etanol obtido, os ensaios com 30 °Brix inicial foram escolhidos para os estudos cinéticos em biorreator experimental.

3.3. Cinética da fermentação alcoólica em biorreator

As cinéticas das fermentações sob agitação e em condição estática estão demonstradas na figura 1.

As maiores concentrações de etanol foram observadas após 36 e 44 horas de fermentação, obtendo-se 52,06 g/L e 46,70 g/L para os ensaios com e sem agitação, respectivamente. A agitação provoca a redução do tempo de fermentação e consequentemente o aumento da produtividade como observado na Tabela 3. Apesar da concentração de etanol ser superior no ensaio com agitação, os dados de rendimentos demonstraram que a fermentação estática possui a mesma ordem de rendimento em relação aos açúcares totais (Y_1), aos açúcares consumidos (Y_2) e ao rendimento teórico máximo ($Y_{p/s}$). O valor reduzido de etanol é justificado pela diferença de aproximadamente 16 g/L de açúcares no início das fermentações.

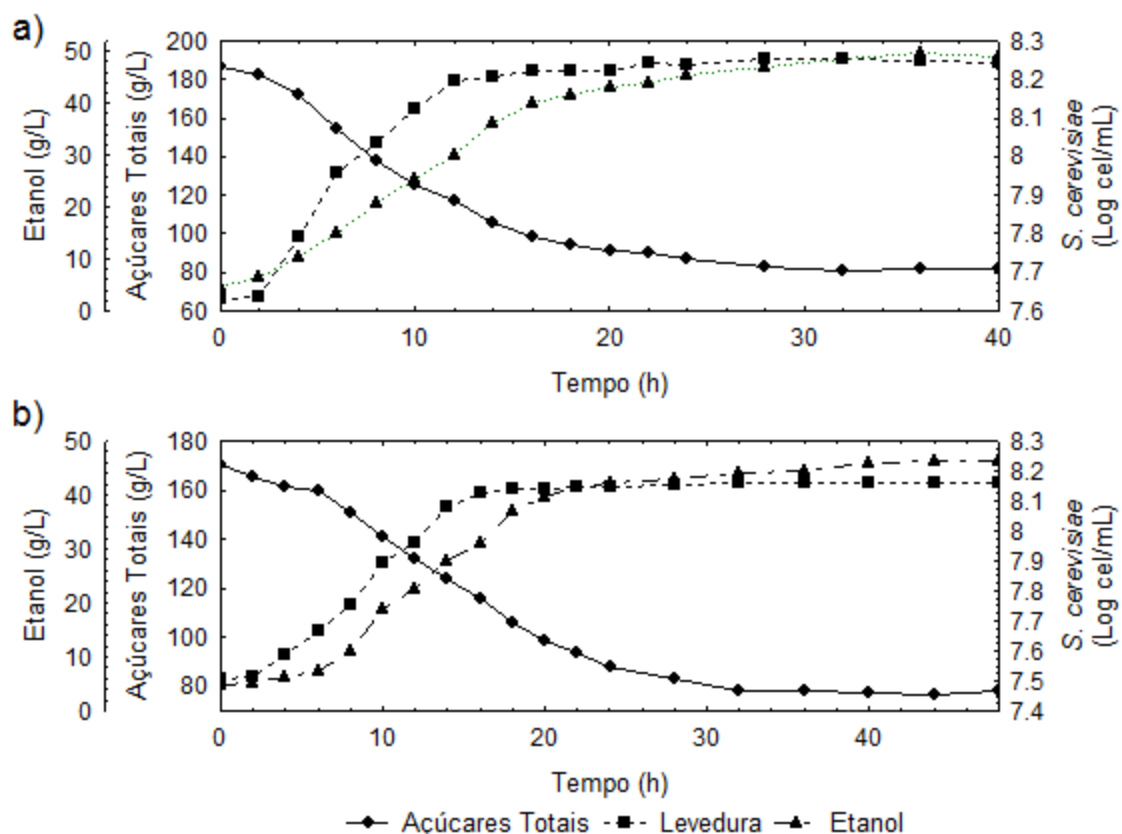


Figura 1. Consumo de açúcares totais, formação de etanol e desenvolvimento microbiano em relação ao tempo de fermentação sob agitação (a) e estática (b).

O rendimento de produto em relação ao substrato ($Y_{p/s}$) encontrado neste estudo foi de 89,39% e 88,08% do rendimento teórico máximo para o ensaio com e

sem agitação. Siqueira et al. (2008) obtiveram os rendimentos de 45,4% (Yp/s) e 45,8% (Y1) em escala laboratorial. Romão et al. (2012) realizaram a hidrólise com ácido nítrico e obtiveram rendimentos de 78% (Y2) e 60% (Y1) em condições otimizadas. Silva et al. (2012) obtiveram valores de 67,5% (Y1) e 80,8 (Y2) em condições otimizadas de hidrólise enzimática e fermentação.

Tabela 3. Tempo de fermentação, variação de açúcares totais (dS) e etanol (dP), rendimentos (Y1, Y2 e Yp/s) e produtividade para as fermentações sob agitação e estática.

	Tempo (h)	dS ^a (g/L)	dP ^b (g/L)	Yp/s ^c (%)	Y1 ^d (%)	Y2 ^e (%)	Produtividade (g/L/h)
Agitação	36	104,12	47,56	45,68	49,94	89,39	1,321
Estática	44	92,49	41,63	45,01	47,87	88,08	0,946

a – variação de açúcares totais, b – variação de etanol; c – rendimento em etanol sobre o teórico máximo; d – rendimento em etanol sobre os açúcares totais iniciais; e – rendimento em etanol sobre os açúcares totais consumidos.

As taxas de formação de células (rx), consumo de substrato (rs), formação de produto (rp) e o tempo de geração celular (tg) foram superiores no ensaio onde houve agitação (Tabela 4). Como discutido anteriormente, a agitação promove maior contato entre as leveduras e o substrato, por isso diminui o tempo de fermentação e melhora os parâmetros cinéticos. Entretanto, a taxa de formação de produto (rp) durante a fase *log* de crescimento é muito próxima entre os ensaios, apesar da diferença de 2,898 g/L/h na taxa de consumo de açúcares totais (rs). A taxa elevada de consumo de açúcares (rs) para o ensaio com agitação pode estar relacionada ao desenvolvimento de células, observado pelo elevado valor de rx.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para as fermentações estática e sob agitação.

	rx ^a (log cel/mL/h)	rs ^b (g/L/h)	rp ^c (g/L/h)	μx ^d (h)	tg ^e (h)
Agitação	0,061	6,585	2,445	0,007	4,801
Estática	0,046	3,960	2,367	0,006	6,850

a – taxa específica de desenvolvimento celular; b – taxa específica de consumo de açúcares totais; taxa específica de formação de etanol; d – taxa instantânea de desenvolvimento celular; e – tempo de geração celular.

A taxa específica de desenvolvimento de células (μx) pode ser explicada pela alta concentração de substrato (30°Brix) e baixa pressão de oxigênio dissolvido. É

sabido que em situações adversas de seleção (temperatura, pressão osmótica, meio incomum), o microrganismo se desenvolve de maneira mais lenta (Ochoa-Estopieret al., 2011). Siqueira et al. (2008) também observaram um valor reduzido de μ_x (0,0180h) para fermentação de melação por *S. cerevisiae*, previamente estudada como a de melhor rendimento (Y1) na produção de etanol.

3.4. Produção do fermentado acético

Os ciclos fermentativos são apresentados na Tabela 5, onde os cinco primeiros são adaptação e os três últimos do reator contendo apenas fermentado acético e alcoólico de melação de soja. O vinho utilizado na fermentação acética continha a 60,00mL/L de etanol (47,40 g/L) e 7,40 g/L de acidez expressa em ácido acético.

Tabela 5. Ciclos e parâmetros fermentativos para a produção de fermentado acético.

Ciclo	t ^a (h)	V ₁ ^b (L)	ET ₁ ^c (mL/L)	AA ₁ ^d (g/L)	CT ₁ ^e (%)	V ₂ ^f (L)	V ₃ ^g (L)	AA ₂ ^h (g/L)	ET ₃ ⁱ (mL/L)	CT ₂ ^j (%)	Y _{AA} ^k (%)	Y _{CT} ^l (%)	P _{AA} ^m (g/L/h)
1	49	4,30	15,20	56,20	7,14	0,68	0,50	62,40	3,00	6,54	80,08	91,60	0,106
2	48	4,18	14,80	53,10	6,79	0,50	0,50	58,00	5,00	6,30	74,43	92,78	0,101
3	48	3,98	15,00	55,60	7,06	0,50	0,50	59,00	5,00	6,40	74,72	90,65	0,102
4	54	3,88	14,10	50,60	6,47	0,50	0,50	58,00	2,00	6,00	73,43	92,74	0,090
5	110	4,43	11,60	50,00	6,16	0,80	0,80	55,00	3,00	5,80	70,58	94,16	0,067
6	50	4,40	17,40	42,60	6,00	0,60	0,30	51,00	7,00	5,80	65,45	96,67	0,051
7	91	4,30	18,60	45,00	6,36	0,50	0,30	49,00	4,08	5,38	62,88	84,59	0,027
8	77	3,80	11,80	43,50	5,53	-	0,20	52,00	5,00	5,70	66,73	97,92	0,023
Médiaⁿ	73	4,17	15,90	43,70	5,96	-	-	50,70	5,60	5,63	65,02	92,76	0,033

a – Tempo de fermentação; b – Volume no biorreator; c – Etanol no inicial; d - Acidez inicial; e – Concentração total no inicial; f – Fermentado alcoólico adicionado; g – Fermentado acético retirado; h – Acidez final; i – Etanol final; j – Concentração total final; k – Rendimento em ácido acético; l – Rendimento em concentração total; m – Produtividade; n – média para 4 últimos ciclos.

A taxa de conversão de ácido acético foi decrescendo com a adição de fermentado alcoólico de melação de soja ao fermentador. Esse comportamento foi observado também para a produtividade (P_{AA}), quando houve um aumento considerável no tempo de fermentação após o quarto ciclo. Apenas o rendimento em CT permaneceu estável durante os ciclos fermentativos.

Spinosa et al.,(2015) produziu fermentado acético a partir de fermentado alcoólico de arroz por método submerso em Acetador[®], onde avaliou dez ciclos fermentativos. O fermentado alcoólico para a produção do fermentado acético partiu de 62,80 g/L de etanol, o qual produziu vinagre com 65,80 g/L de acidez acética, resultando em rendimento em acidez (Y_{AA}) de 86% e produtividade de 0,7 g/L/h, muito superior a este trabalho, que teve em média 50,07 g/L de acidez no produto, rendimento ácido acético (Y_{AA}) de 65,02% e 0,033 g/L/h de produtividade.

A eficiência da fermentação acética está relacionada com a aeração e a dispersão do ar dentro do reator e a baixa produtividade (P_{AA}), neste trabalho, pode ser estar relacionada com a distribuição não homogênea de ar no fermentador (Hitschmann; Stockinger, 1985; Spinosa et al., 2015).

3.5. Caracterização do Fermentado Acético

O fermentado acético de melão de soja, em valor médio de acidez obtido durante o processo, conteve 5,07% (m/v) de acidez acética, 0,17 % (m/v) de etanol residual, 7,86% de açúcares (m/v), 14,67% (m/v) de extrato seco, 2,27% (m/v) de cinzas e densidade de 1,023 g/cm³ (Tabela 6).

Para diversas legislações, a quantidade mínima de acidez é de 40 g/L, sendo assim, este fermentado enquadra-se neste aspecto.

Tabela 6. Caracterização físico-química do fermentado acético de melão de soja.

Componente	g/100mL
Acidez	5,07 ± 0,06
Etanol residual	0,34 ± 0,02
Açúcar residual	7,86 ± 0,12
Extrato seco	14,67 ± 0,07
Cinzas	2,27 ± 0,10
Densidade relativa ^a	1,023 ± 0,00

a – g/cm³

Avaliando a utilização deste fermentado como condimento, foram realizadas análises de fenólicos totais e isoflavonas (Tabela 7). É possível observar que a concentração de isoflavonas no mosto é de cerca de 66% dos fenólicos totais. Após a fermentação alcoólica a concentração de isoflavonas diminui para apenas 10,59

mg/100mL, representando 1,64 % dos fenólicos totais. Passada a fermentação acética tanto a concentração de fenólicos totais quanto a de isoflavonas reduziram em relação ao fermentado alcoólico. No fermentado acético a concentração de isoflavonas foi de 1,85 % em relação ao total de compostos fenólicos.

Tabela 7. Fenólicos totais (mg GAE/100mL) e isoflavonas (mg/100mL) presentes no mosto para fermentação alcoólica, fermentado alcoólico e fermentado acético de melação de soja, em base úmida.

	Mosto para fermentação	Fermentado alcoólico	Fermentado Acético
Fenólicos totais	625,51 ± 59,29	647,39 ± 10,63	402,24 ± 4,88
Malonildaidzina	11,95 ± 0,55	nd	nd
Malonilgenistina	10,43 ± 0,29	nd	nd
Daidzina	125,83 ± 2,05	nd	nd
Genistina	186,24 ± 9,31	3,77 ± 0,43	2,98 ± 0,18
Glicitina	29,76 ± 0,97	4,59 ± 1,02	3,18 ± 0,22
Daidzeína	22,37 ± 1,11	2,17 ± 0,40	1,29 ± 0,06
Genisteína	25,19 ± 0,63	nd	nd
Isoflavonas totais	411,77 ± 14,02	10,59 ± 1,84	7,46 ± 0,47

nd – não detectado.

Razmkhab et al., (2002) observaram que as leveduras podem adsorver determinados fenólicos em sua parede celular, o que pode explicar a redução do teor de isoflavonas no fermentado alcoólico em relação ao mosto fermentativo. Diversos estudos relacionam a presença de fenólicos totais em fermentado alcoólicos e vinagres com a matéria-prima de origem, onde, durante os processos fermentativos, alguns desses compostos permanecem presentes e novos são gerados pelos microrganismos envolvidos nas fermentações, sobretudo na fermentação alcoólica (Lee et al., 2013; Qiu et al., 2010; Cerezo, et al., 2008; Xu, Tao e Ao, 2007).

Quanto ao perfil de isoflavonas presentes no fermentado acético, apenas três formas estiveram presentes, das quais a daidzeína foi a forma de menor concentração, entretanto esta merece atenção por ser mais biologicamente ativa em relação às isoflavonas glicosídicas.

3.6. Balanço de massa

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se estimar que para cada tonelada de melaço de soja são produzidos 3460 L de fermentado com concentração acética de 40 g/L, mínimo exigido para legislação de vinagre, o que representa 139 kg de ácido acético.

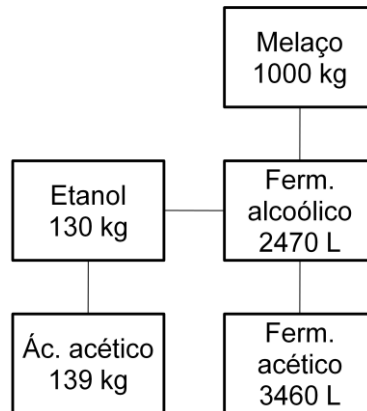


Figura 2. Balanço de massa para a produção de fermentado acético (40 g/L) e ácido acético.

4. Conclusão

O aumento da concentração de melaço de soja inicial de 30 °Brix contribuiu positivamente para os rendimentos em etanol, entretanto, diminuiu a produtividade, visto que a produtividade para os experimentos conduzidos sob agitação foram mais produtivos que aqueles conduzidos de maneira estática, da mesma maneira os parâmetros cinéticos foram maiores para os experimentos conduzidos sob agitação.

O melaço de soja pode ser utilizado para a produção de fermentado acético, visto que os quatro últimos ciclos de produção de fermentado acético permaneceram estáveis. Estudos futuros deverão ser realizados a fim de melhorar as condições fermentativas e, assim, aumentar a produtividade e diminuir o tempo da fermentação acética. A investigação de fatores antinutricionais, estudos *in vivo* e mesmo sensoriais necessitam ser realizados antes de se efetuar proposição da utilização do melaço de soja como alimento.

5. Referências

Bligh, E.G.; Dyer, W.J.; 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification Can. J. Biochem. Physiol.37, 911-917.

- Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2005. Instrução Normativa N° 24, de 8 de Setembro de 2005. Brazil
- Cerezo, A., Tesfaye, W., Torija, M.K., Mateo, E., García-Parrilla, M.C.; Troncoso, A.M., 2008. The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food. chem.* 109, 606-615
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, R.F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- FAO/WHO, Food Standards Programme., 2000. Proposed Draft Revised Regional Standard for Vinegar. Rome, Italy.
- Handa, C.L., Couto, U.R., Vicensoti, A.H., Georgetti, S.R, Ida, E.I., 2014. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food chem.* 152, 56-65.
- Hitschmann, A., Stockinger, H., 1985. Oxygen deficiency and its effect on the adenylate system in *Acetobacter* in the submerge acetic fermentation 22, 46-49.
- Hosny, M., Rosazza, J. P. N., 1999. Novel Isoflavone, Cinnamic Acid, and Triterpenoid Glycosides in Soybean Molasses. *J. Nat. Prod.* 62, 853-858.
- IAL, Instituto Adolfo Lutz. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Brazil.
- Lee, J., Cho, H., Jeong, J., Lee, M., Jeong, Y., Shim, K., Seo, K. K. 2013. New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model. *FoodChem*, 141, 3241-3249.
- Machado, R.P., 1999. Produção de etanol a partir do melaço de soja. Master Dissertation. Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.
- Maciel, L.F., Oliveira, C.S., Bispo, E.S., Miranda, M.P.S. , 2011 Antioxidant activity, total phenolic compounds and flavonoids of mangoes coming from biodynamic, organic and conventional cultivations in three maturation stages. *Brit. Food J.* 113, 1103-1113.
- Ochoa-Estopier, A., Lesaje, J., Gorret, N., Guilouet, S.E., 2011. Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocesses on glycerol. *Bioresour .Technol.* 102, 1521-1527.
- Qiu, J., Ren, C., Fan, J., Li, Z. 2010. Antioxidant activities of aged oat vinegar *in vitro* and in mouse serum and liver. *J. Sci. of Food and Agr.* 90, 1851-1958.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J.M., Mayen, M., Merida, J., Medina, M., 2002. Adsorption of Phenolic Compounds and Browning Products in White Wines by Yeasts and Their Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7432-7437.
- Romão, B.B., Silva, F.B., Resende, M.M., Cardoso, V.L., 2012. Ethanol Production from Hydrolyzed Soybean Molasses. *Energy Fuels* 26, 2310-2316.

Silva, F.B., Romão, B.B. Cardoso, V.L., Filho, U.C., Ribeiro, E.J. 2012. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. *Biochem. Eng. J.* 69, 61-68.

Siqueira, P.F., Karp, S.G., Carvalho, J.C., Sturm, W., Rodríguez-León, J.A., Tholozan, J.L., Singhanía, R.R., Pandey, A., Soccol, C.R., 2008. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresour. Technol.* 99, 8156–8163.

Spinosa, W. A., Santos Júnior, V. dos, Galvan, D., Fiorio, J. L., Gomez, R. J. H. C.. (2015). Vinegar rice (*Oryza sativa* L.) produced by a submerged fermentation process from alcoholic fermented rice. **Food Science and Technology (Campinas)**, 35(1), 196-201. Retrieved May 29, 2015, from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000100196&lng=en&tlng=en. 10.1590/1678-457X.6605.

Spinosa, W.A. 2002. Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre. 2002. Doctoral thesis. State University of Campinas. Brazil.

Spinosa, W.A. 1996. Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre. 1996. Master Dissertation. State University of Londrina, Brazil.

Valera, M.J., Torija, M.J., Mas, A. Mateo, E., 2015. Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiol* 46, 452-462.

Xu, Q., Tao, W., Ao, Z. 2007. Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food-Chem* 102, 841-849, 2007.