

Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de vinagre a partir de suco de laranja

Dinéia Tessaro^{1*}, Andrea Christina Larsen¹, Rose Cristina Dallago¹, Simone Gomes Damasceno², Luciane Sene³ e Silvia Renata Machado Coelho³

¹Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil. ²Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil. ³Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: ditessaro@gmail.com; ditessaro@yahoo.com.br

RESUMO. O Brasil, em virtude de suas condições climáticas, destaca-se como grande produtor de frutas. No entanto, parcela considerável desta produção acaba sendo perdida, em face da degradação natural, maceração durante manuseio, ou ainda, por imperfeições que inviabilizam a comercialização. Neste trabalho, laranjas não-comercializáveis foram empregadas na produção de vinagre, utilizando-se três tratamentos com diferentes teores de açúcar (T1: suco *in natura*; T2: 18 °Brix e T3: 22 °Brix). Com base em análises, foi verificada maior produção de álcool e vinagre nos tratamentos T2 e T3 em detrimento de T1, provavelmente pela maior disponibilidade de substrato para os processos de conversão realizados pelos microorganismos. Entre T2 e T3, os resultados para o último tratamento foram mais satisfatórios, embora quantidades consideráveis de açúcares remanescentes tenham sido verificadas após o processo de fermentação alcoólica.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, produção de ácido acético, *Acetobacter spp.*

ABSTRACT. Alcohol and acetic fermentation appraisal for vinegar production from orange juice. Because of its climatic conditions, Brazil stands out as a great fruit producer. However, a considerable amount of this production is wasted, due to natural degradation, hurt during handling, or because of imperfections that make marketing impracticable. In this paper, unmarketable oranges were used in vinegar production, employing three treatments with different sugar contents (T1: natural juice; T2: 18 °Brix; and T3: 22 °Brix). Based upon chemical analysis, it was verified that most alcohol and vinegar production occurred with T2 and T3 treatments, probably due to the higher sugar content available to the conversion procedures carried out by microorganisms. Comparing the results obtained with T2 and T3 treatments, the latter treatment was more satisfactory, although a considerable amount of remaining sugar was verified after the alcohol fermentation process.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, acetic acid production, *Acetobacter spp.*

Introdução

O Brasil é um importante produtor mundial de frutas, incluindo a fruticultura tropical. No entanto, o país apresenta altos índices de desperdício, principalmente durante o processo de comercialização, por se tratar de matéria-prima facilmente suscetível à degradação. Por esse motivo, são descartadas diariamente grandes quantidades de frutas que não apresentam qualidade para o consumo *in natura*, pois apresentam defeitos nas cascas, tamanhos, coloração, consistência, entre outros fatores.

A fabricação de vinagre proporciona um meio de utilização de matéria-prima inaproveitável da comercialização de frutas (EVANGELISTA, 1989).

Vinagres de frutas são considerados superiores em qualidades sensoriais e nutritivas, quando comparados a outros tipos de vinagres, apresentando características como sabor e aroma próprios (LU et al., 1999). Em relação ao aspecto nutricional, têm vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos provenientes do fruto e da fermentação alcoólica (AQUARONE; ZACANARO JÚNIOR, 1983).

Segundo Fukaya et al. (1992), o vinagre é utilizado no mundo inteiro como condimento e conservante de alimentos. Além disso, é considerado um complemento indispensável à alimentação humana, pela ação nutritiva e biorregulatória (MECCA et al., 1979). O vinagre é produzido por dois processos bioquímicos distintos, ambos resultantes da ação de micro-organismos: i) a

fermentação alcoólica pela ação de leveduras sobre matérias-primas açucaradas e amiláceas e ii) a fermentação acética pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* (LU et al., 1999; SOKOLLEK et al., 1998; TAKAOMI et al., 1991).

A legislação brasileira define que vinagre ou vinagre de vinho é o produto obtido da fermentação acética do vinho e deve conter acidez volátil mínima de 40 g por litro, expressa em ácido acético (4%). Sua graduação alcoólica não pode exceder 1°GL e deve ser obrigatoriamente pasteurizado. Um vinagre com mais de 80 g por litro de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição. Estabelece também valor mínimo de 7 g L⁻¹ de extrato seco para vinagres de vinho tinto e rosados e 6 g L⁻¹ para vinagres de vinho branco; para o teor de cinzas, preconiza um valor mínimo de 1 g L⁻¹ (COSTA et al., 2006).

Este trabalho teve por objetivo, avaliar a fabricação caseira do vinagre de laranja, utilizando-se três tratamentos com diferentes correções nos teores de açúcares do suco obtido de frutas que não encontram demanda comercial por defeitos nas cascas e pelos tamanhos, como alternativa de utilização das mesmas.

Material e métodos

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada neste estudo foi a laranja-pêra (*Citrus sinensis*), adquirida no Ceasa, que seria descartada por não apresentar qualidade para a comercialização *in natura*.

Microorganismos

Para a fermentação alcoólica foi utilizado um cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae*, obtido a partir de fermento biológico comercial seco (fermento da marca Fleischmann).

A fermentação acética foi conduzida pela inoculação de bactérias ácido-acéticas provenientes de vinagre de uva não-pasteurizado (vinagre forte), obtido a partir de uma produção artesanal de vinagre.

Fermentação alcoólica

Preparo do mosto (suco)

As frutas foram previamente selecionadas e, em seguida, foram lavadas com água clorada para eliminar as sujeiras mais grosseiras e os microorganismos. Depois, o suco foi extraído com auxílio de um espremedor elétrico e, a seguir, tamizado em tamiz manual, obtendo-se assim o suco integral.

O suco obtido e os frascos (erlenmeyer) usados na etapa de fermentação alcoólica e acética foram autoclavados, por 20 min., à temperatura de 121°C e pressão de 1 atm.

Tratamentos utilizados

Foram preparados os seguintes tratamentos:

T1: suco natural com °Brix 12,5 (testemunha);

T2: suco com correção do °Brix (18%);

T3: suco com correção do °Brix (22%).

Os tratamentos acima foram realizados em quadruplicata, com a finalidade de garantir maior confiabilidade dos resultados. Em cada repetição foram utilizados 500 mL de suco, perfazendo um total de 6 L.

Análises físico-químicas

Após a obtenção do suco, esta etapa seguinte foi preparada para a fermentação, verificando-se antes, por meio de análises físico-químicas, o teor de açúcar total (grau Brix), pH e acidez total.

Determinação do grau Brix e correção do açúcar

A análise do açúcar foi realizada utilizando-se refratômetro, o qual mede o °Brix. Este indica o teor aproximado de açúcar no mosto. Assim, um mosto com 10 °Brix contém aproximadamente 10% de açúcar, e cada °Brix representa aproximadamente 15 g de açúcar dissolvido para cada litro de mosto (CORAZZA et al., 2001).

A partir do teor inicial de açúcar, em °Brix, os sucos dos tratamentos T2 e T3 foram corrigidos até atingir o °Brix desejado (18 e 22%, respectivamente), adicionando-se açúcar (sacarose). No final da fermentação alcoólica também foi determinado o °Brix, para avaliar a eficiência da conversão do açúcar em álcool pelo *Saccharomyces cerevisiae*.

Determinação da acidez total

A acidez total dos mostos foi determinada pelo método da titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, utilizando-se como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Para cada titulação, utilizou-se 1 mL do mosto diluído com 5 mL de água destilada. A partir do volume gasto de NaOH determinou-se a acidez total. Não foram feitas correções na acidez.

Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado pelo método de leitura direta por meio do aparelho digital Tecnal TEC-3MP provido de eletródo duplo combinado.

Determinação do grau alcoólico (°GL)

Com o término da fermentação, determinou-se o grau alcoólico dos vinhos da seguinte maneira: foram

transferidos 200 mL de amostra, à temperatura ambiente (27°C), para um balão de destilação contendo 10 mL de água. Este foi acoplado a uma coluna de destilação e esta a um condensador. Recolheram-se 3/4 (50 mL) do volume inicial de amostra e completou-se o volume (até 200 mL) com água destilada. Em seguida, determinou-se a densidade com base na massa e no volume da mistura.

Preparo do inóculo

Para a preparação do inóculo, utilizou-se uma suspensão de fermento biológico comercial seco Fleischmann, na proporção de 1,5% (p v⁻¹) em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de suco de laranja, previamente esterilizado em autoclave. Os frascos foram mantidos em agitação de 150 rpm em agitador rotativo a 30°C, por 24h. Após este período, o inóculo foi adicionado aos mostos na proporção de 10% (v v⁻¹) do volume total do mosto a ser fermentado.

Acompanhamento da fermentação alcoólica

Terminada a preparação do mosto e inoculação da levedura, iniciou-se a fermentação alcoólica (1^a etapa), utilizando-se erlenmeyer de 1.000 mL. O processo da fermentação alcoólica foi realizado em estufa (BOD), mantendo-se a temperatura em torno de 28°C. Visando impedir a entrada de O₂ nos frascos e, consequentemente, comprometer o processo anaeróbio da fermentação, foi utilizado um sistema de batoque hidráulico, o qual garantia as condições de anaerobiose e a eliminação do CO₂ produzido no processo.

A fermentação alcoólica foi conduzida por um período de 48h, pois de acordo com dados da literatura, esse é o tempo necessário para que praticamente todo o açúcar seja convertido pelo *Saccharomyces cerevisiae* em etanol (BORTOLINI et al., 2001).

Com o término da fermentação alcoólica, o mosto fermentado foi pasteurizado (65°C por 30 min.), em banho de água.

No final do processo de fermentação alcoólica (48h), foram determinadas as concentrações de açúcar total (°Brix), concentração de etanol, acidez total e pH.

Cálculo do rendimento, eficiência da fermentação alcoólica e produtividade da fermentação

Rendimento da fermentação:

Etanol produzido (%p v⁻¹) x 100
Açúcares consumidos (% p v⁻¹)

Produtividade da fermentação:

Etanol produzido (p v⁻¹)
Tempo total de fermentação em horas (g L⁻¹ h)

Fermentação acética

Preparo do mosto e adição do inoculo

Para a produção do vinagre, foram utilizados os vinhos obtidos na fermentação alcoólica dos tratamentos T1, T2 e T3. Os teores alcoólicos obtidos em cada tratamento foram 6,51; 16,43 e 22,25%, respectivamente. A fermentação acética foi conduzida pela inoculação de bactérias ácido-acéticas provenientes de vinagre de uva não-pasteurizado (vinagre forte).

A fermentação acética foi conduzida em agitador rotativo (150 RPM) para garantir a necessária tensão de O₂ no meio de produção. Utilizaram-se frascos de erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de fermentado e 0,5 g de bactérias ácido-acéticas, por período de 48h.

No final do processo de fermentação acética, foram determinadas as concentrações de etanol, acidez total, pH e °Brix.

Resultados e discussão

Caracterização da matéria-prima

O suco *in natura* apresentou pH de 3,52, acidez total de 1,8% e concentração de açúcar total de 12,5 °Brix.

Fermentação alcoólica

Após o período de 48h da fermentação alcoólica, foram avaliados, em todos os tratamentos, os teores de açúcar residual, o pH e a acidez total, cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Analizando os dados apresentados na Tabela 1, verifica-se que, embora tenha ocorrido redução nos valores para o grau Brix, uma concentração bastante alta ainda pode ser verificada principalmente nos tratamentos T2 e T3, os quais apresentaram valores iniciais de 18 e 22 °Brix, respectivamente. Isto pode ter ocorrido pela presença de açúcares não-fermentescíveis no suco de laranja, ou ainda, pelo teor de álcool produzido atingir níveis superiores aos suportáveis pelas bactérias fermentativas, inativando-as ou levando-as à morte, coincidindo com a diminuição da intensidade de borbulhamento do dióxido de carbono, observada no batoque hidráulico do fermentador.

Tabela 1. Valores obtidos para os parâmetros de análise após a fase de fermentação alcoólica do suco de laranja.

Tratamento	Acidez (%)	°Brix inicial (%)	°Brix consumido (%)	pH	Etanol produzido (%p v ⁻¹)	Rendimento fermentação (%)	Produtividade (g L ⁻¹ h)
T1	1,67	12,5	8,25	3,55	4,83	39,02	0,10
T2	1,75	18	11,35	3,56	12,00	70,48	0,25
T3	2,00	22	12,50	3,58	13,45	71,75	0,28

Outra hipótese a ser considerada nesta situação para os valores de Brix observados após a fermentação poderia ser o tempo destinado ao processo, podendo estes valores sofrer alguma redução com o aumento do período de fermentação. Também, segundo Jackman (1991), tratamentos com maiores concentrações de açúcar no início do processo fermentativo podem promover a inibição e retardar o consumo por parte das leveduras.

Analizando os dados referentes ao rendimento da fermentação, verifica-se que os valores variaram entre 39,02 e 71,75%. O menor rendimento verificado em T1 pode estar relacionado às possibilidades acima descritas, as quais estão diretamente ligadas ao consumo dos açúcares para a produção de álcool. Quanto aos maiores índices de rendimento da fermentação, estes foram verificados em T3 e T2, com valores de 70,48 e 71,75 respectivamente. Com base nisso, é possível afirmar que a adição de grande quantidade de açúcar nos tratamentos, principalmente em T3, não afetou negativamente a fermentação. Contrariamente, isto demonstra que a adição de açúcares garante níveis de substrato capazes de suprir a necessidade metabólica dos micro-organismos, bem como níveis adequados para a produção de etanol.

O mesmo comportamento foi verificado quanto à produtividade. Em T1, o valor de 0,10 g L⁻¹ h foi consideravelmente inferior aos encontrados nos tratamentos T3 e T2, com valores de 0,28 e 0,25 g L⁻¹ h, respectivamente. No entanto, quando estes valores são comparados aos obtidos em estudos de Bortolini et al. (2001), utilizando kiwi para a produção de vinagre, verifica-se que são significativamente inferiores aos encontrados pelo autor. No estudo aqui apresentado, a maior produtividade encontrada, com correção para 22 °Brix, foi inferior àquela verificada para o suco *in natura* do estudo citado acima.

Na Tabela 2 estão os dados referentes ao processo de fermentação acética para produção de vinagre.

Tabela 2. Valores obtidos para os parâmetros de análise após a fase de fermentação acética do vinho de laranja.

Tratamento	Etanol consumido (g)	Ácido acético produzido (%)
T1	**	**
T2	4,03	5,26
T3	7,37	9,61

**indica que não foi possível determinar as concentrações de etanol consumido e ácido acético produzido.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que os valores reportados para a acidez, depois de transcorrido o período de fermentação acética, são valores baixos quando comparados aos resultados obtidos em outros estudos conduzidos para a

obtenção de vinagre de frutas. Além disso, a acidez final não apresentou grande incremento em relação à acidez verificada no suco natural e após o processo fermentativo nos diferentes tratamentos analisados. Isso foi ainda mais marcante em T1, pois os valores encontrados para a acidez foram extremamente baixos, não sendo possível determiná-los. Além disso, a transferência das bactérias diretamente do vinagre forte de uva para o vinho de laranja pode ter inibido a ação destas por encontrarem um meio com características diferenciadas, demandando provavelmente maior tempo na fase lag necessária para que as bactérias pudessem se adaptar às novas condições. Este problema pode ser sanado em estudos futuros, tomando-se o cuidado de produzir um inóculo semelhante ao utilizado na fase de fermentação acética, garantindo, desta forma, um tempo de adaptação menor para os micro-organismos, resultando possivelmente em maior produção de vinagre.

Segundo Aquarone e Zaganaro Júnior (1983), o rendimento teórico para a conversão do etanol a ácido acético baseia-se na premissa de que 1 g de etanol produz 1,304 g de ácido acético. Com base nisso, houve maior produção de vinagre em T3, em virtude da maior quantidade de etanol disponível para ser utilizado como substrato. No entanto, estes são dados teóricos, não significando que todo o etanol quantificado na etapa anterior tenha sido convertido em ácido acético, podendo ocorrer algumas variações dos valores.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que frutas não-comercializáveis, como a laranja, por exemplo, podem ser empregadas nos processos de produção de vinho e vinagre, pois o suco desta fruta demonstrou ser um substrato adequado para o desenvolvimento dos microorganismos utilizados.

Entre os tratamentos empregados, o T3 apresentou as melhores condições tanto para a produção de vinho quanto para a produção de vinagre, porém apresentou significativa concentração residual de açúcares adicionados. Para que o processo seja realizado em grande escala, são necessários estudos adicionais que estabeleçam as condições ideais de permanência durante o processo de fermentação alcoólica, visando maior aproveitamento dos açúcares e, consequentemente, maior produtividade de álcool, o qual pode ser convertido em maiores taxas de ácido acético, tornando o processo mais rentável.

Referências

- AQUARONE, E.; ZACANARO JÚNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Coord.). **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação: biotecnologia**. São Paulo: E. Blücher, 1983. v. 5, p. 104- 122.
- BORTOLINI, F.; SANT'ANNA, E. S.; TORRES, R. C. Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composição dos mostos e métodos de fermentação acética. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 236-243, 2001.
- CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, R. J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.
- COSTA, C. M.; TAKAHASHI, J. S.; VILLAMONTE, M. R. **Produção de vinagre**. Florianópolis: UFSC, 2006.
- EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.
- FUKAYA, M.; PARK, T. S.; TODA, K. Improvement of acetic acid fermentation by molecular breeding and process development. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 6, p. 447-454, 1992.
- JACKMAN, E. A. Alcohol industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. (Ed.). **Biotecnologia básica**. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 320-321.
- LU, S. F.; LEE, F. L.; CHEN, H. K. A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 55-62, 1999.
- MECCA, F.; ANDREOTTI, R.; VERONELLI, L. **L'aceto: tecnologia industriale e tradizionale emprego nell industria conserveira utilizzazione in cucina**. 1. ed. Brescia, 1979.
- SOKOLLEK, S. J.; HERTEL, C.; HAMMES, W. P. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. Nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 48, p. 935-940, 1998.
- TAKAOMI, I.; HIROYUKI, S.; HIROYUKI, H.; KAZUYUKI, S.; TAKESHI, K. Efficient acetic acid production by repeated fed-batch fermentation using two fermentors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 295-299, 1991.

Received on July 7, 2008.

Accepted on February 25, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.