



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA
FEDERAL DO PARANÁ**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos**

**ESTUDO PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE VINAGRE
DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO POR
PROCESSO SUBMERSO**

Francieli Begnini Siepmann

Medianeira
2014

Francieli Begnini Siepmann

**ESTUDO PRELIMINAR PARA PRODUÇÃO DE
VINAGRE DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO
POR PROCESSO SUBMERSO**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Medianeira
2014

Orientadora:

Professora Dra. Eliane Colla

Co-Orientadora:

Professora Dra. Cristiane Canan

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S572e Siepmann, Francieli Begnini
Estudo preliminar para produção de vinagre de farelo de arroz
desengordurado por processo submerso / Francieli Begnini Siepmann
– 2014.
89 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Eliane Colla
Co-orientadora: Cristiane Canan
Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.
Medianeira, 2014.
Inclui bibliografias.

1. Fermentação. 2. Enzimas 3. Alimentos – Dissertações. I.Colla,
Eliane, orient. II.Canan, Cristiane, co-orient. III. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO PRELIMINAR PARA A PRODUÇÃO DE VINAGRE DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO POR PROCESSO SUBMERSO

POR

FRANCIELI BEGNINI SIEPMANN

Essa dissertação foi apresentada às quatorze horas e trinta minutos, do dia seis de junho de dois mil e quatorze, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa: Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Eliane Colla (Orientadora)

Prof. Dr. Éder Lisandro de Moraes Flores (Membro Externo)

Profa. Dra. Mônica Lady Fiorese (Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho.

Ao meu esposo Davi Daniel Siepmann pelo amor, carinho e sua incansável dedicação em auxiliar-me no desenvolvimento deste trabalho, obrigada de coração.

Aos meus familiares, pelo carinho, paciência e dedicação durante todo o mestrado.

As minhas orientadoras Eliane Colla e Cristiane Canan, pela confiança, dedicação, paciência e conhecimentos. Com certeza, sairei deste mestrado uma pessoa melhor do que entrei e parte disso devo a vocês, que além de professoras são companheiras, amigas, exemplos de professoras que nos estimulam a dar o melhor de nós mesmos e desta forma descobrir a nossa capacidade. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Éder Flores pelo auxílio no desenvolvimento das análises no UPLC.

As alunas de iniciação científica Manoella Moura e Caroline Zabotti, que não mediram esforços em contribuir no desenvolvimento das análises.

As colegas Catiussa M. Pazuch, Catiucia Giraldi, Rosana A. S. Buzanello, e Daneysa Laís Kalschne pelos auxílios prestados.

À empresa Irgovel, pela doação do farelo de arroz desengordurado. À empresa LNF pela doação das enzimas, e ao Eduardo pelas informações sobre a utilização das mesmas. À empresa Chemim pela doação do vinagre forte de etanol.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, pois como dizia Bob Marley “Unidos venceremos mas sozinhos cairemos”.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: According to estimates of the National Supply Company (CONAB), in the period March 2013/14, Brazil produced approximately 12.8 million tons of rice, an increase of 8 % compared to the period of 2012/13. The grain processing results in by-products such as rice bran, which has B vitamins, proteins, tocopherols and over 40% carbohydrates, justifying their use in fermentation processes such as vinegar production. Vinegar is composed of 80% (v/v) water and 20% of a wide variety of other compounds such as organic acids, alcohols, minerals, polyphenols, amino acids, among others. The substrates used in vinegar production must provide fermentable carbohydrates to alcoholic fermentation, which is followed by acetic fermentation. The aims of this study were to investigate the hydrolysis process of defatted rice bran by enzymatic way, assess the stage of alcoholic fermentation to optimize ethanol production, and carry out production of vinegar by submerged fermentation and characterizing the final product.

METHODS: Optimization of enzymatic hydrolysis was achieved using a sequential strategy of experimental design. Firstly, a Fractional Factorial Design including 2^{5-1} trials plus 3 center points (19 runs) was applied to evaluate the effects of concentration of amyolytic enzymes, action time and the dilution rate of defatted rice bran (DRB) on response of reducing sugars (RS) released, followed by two CCRDs (Central Composite Rotatable Design); after the analysis of the effects of Fractional Design, the optimum values of enzymes concentration was reached by the two sequential CCRD. Validation of the optimal conditions for the enzymatic hydrolysis was performed in triplicate in two tests, in the vicinity of the optimized conditions. In the step of alcoholic fermentation, initially was developed a test to evaluate the effect of inoculum size and agitation for application of a CCRD 2^3 that evaluated the effects of inoculum concentration, pH and temperature on the response of ethanol yield (%). After the analysis the first CCRD, aiming to increase the ethanol yield, the second test was performed to evaluate the effects of protease addition and exposure of the suspension of defatted rice bran to ultrasonic bath treatment, prior to enzymatic hydrolysis with amylases, since several studies indicate that the ethanol production can be increased under these conditions, because of increased exposure of the starch granules to amyolytic enzymes in the saccharification, after the action of proteases. The results allowed to determine the sequence of the study in the second CCRD was used to evaluate the effect of inoculum concentration and temperature, with adjusted tracks to achieve the optimization of fermentation, performing the addition of protease hydrolysis previously enzyme. Once the alcoholic fermentation step was optimized, a batch of vinegar production (acetic fermentation). The characterization of vinegar was performed by determination the parameters required by Brazilian legislation (residual alcohol content, total acidity and acetic acid, pH, total and reduced dry extract, ash and total and reducing sugars).

MAIN RESULTS: The optimization of enzymatic hydrolysis was achieved with concentration of 200 g•L⁻¹ FAD, 30 g•L⁻¹ α - amylase and 40 g•L⁻¹ amyloglucosidase, with action times of 2 and 3 hours, respectively. In the first preliminary test performed on the alcoholic fermentation step, it was observed that shaking positively influenced only in the tests with 2.0 and 5.0% of inoculums, and the higher yield of ethanol obtained was 1.90 % with the use of 0.5% inoculums, under stationary conditions. with the results obtained in the first test, the tracks of the variables were defined for the first CCRD, where the maximum ethanol content was obtained 2.10%, with the temperature at 30 °C, 2.8% of inoculums and pH 5.0. By applying the second test it

was found that under the conditions applied, the ultrasonic treatment had no significant effect on the response of ethanol concentration; however, with the use of protease the yield was increased to 3.6% ethanol, after 72 hours of alcoholic fermentation. A new CCRD was performed, in order to achieve the optimization of the alcoholic fermentation; in this step, the concentration of protease was fixed at 15 μLg^{-1} , before the enzymatic hydrolysis of polysaccharides with the amylases and the ranges studied for the significant variables in the first CCRD was adjusted (temperature: 28 - 35 °C; inoculum concentration: 1 - 7%), being achieved yield of 4.00% ethanol. The acetic fermentation was completed after eight days of inoculation of acetic bacteria (strong ethanol vinegar), and the vinegar produced answered current Brazilian legislation in all parameters, except for ash, which can be adjusted by applying a filtration step. These results may generate technological innovation for the industrial sector, as the results obtained in this work demonstrate the possibility of performing the use of rice bran as raw material for the production of vinegar.

Keywords: Enzymatic Hydrolysis, Experimental Design, Alcoholic Fermentation and Acetic Fermentation.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS: Segundo as estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de março de 2013/14 o Brasil produziu aproximadamente 12,8 milhões de toneladas de arroz, apresentando um acréscimo de 8% em relação à safra de 2012/13. O processamento deste grão resulta em subprodutos como o farelo de arroz, que apresenta vitaminas do complexo B, proteínas, tocoferóis e mais de 40% de carboidratos, justificando sua utilização em processos fermentativos, como a produção de vinagre. O vinagre é composto por 80% (v/v) de água e 20% de uma grande variedade de outros compostos, como ácidos orgânicos, álcoois, sais minerais, polifenóis, aminoácidos, entre outros. Os substratos utilizados na sua produção devem apresentar carboidratos fermentescíveis para que seja possível realizar as etapas de produção: fermentações alcoólica e acética. Tendo em vista estas considerações, os principais objetivos deste trabalho foram investigar o processo de hidrólise do farelo de arroz desengordurado por via enzimática, avaliar a etapa de fermentação alcoólica para otimizar a produção de etanol, e realizar a produção do vinagre por meio de fermentação submersa, bem como a caracterização do produto final.

MÉTODOS: Para a otimização da etapa de sacarificação dos açúcares complexos do farelo de arroz desengordurado (FAD), realizou-se uma estratégia sequencial de planejamento experimental. Inicialmente aplicou-se um planejamento Fracionário 2^{5-1} com as variáveis concentração de (FAD) (razão farelo/água (g.L^{-1})), concentração e tempo de atuação da α -amilase e da amiloglicosidade (AMG), tendo-se como resposta, a concentração de açúcares redutores (AR); após análise do Planejamento Fracionário, foram aplicados dois Delineamentos Compostos Central Rotacional (DCCR) 2^2 , onde avaliou-se os efeitos das concentrações de ambas enzimas. A validação das condições otimizadas para a hidrólise enzimática foi realizada por meio de dois testes em triplicata, nas vizinhanças das condições otimizadas. Na etapa subsequente de fermentação alcoólica, inicialmente desenvolveu-se um teste objetivando avaliar o efeito do tamanho do inóculo e da agitação para posterior aplicação de um DCCR 2^3 , onde foram avaliados os efeitos da concentração de inóculo, pH e temperatura sobre a resposta de rendimento em etanol (%). Após a análise dos resultados do primeiro DCCR, objetivando-se aumentar o rendimento em etanol, realizou-se um segundo teste preliminar, para avaliar os efeitos da adição de protease e da exposição da suspensão de farelo de arroz desengordurado ao tratamento ultrassônico, anteriormente a etapa de hidrólise enzimática, visto que diversos estudos indicam que a produção de etanol pode ser aumentada nestas condições, devido a maior exposição dos grânulos de amido às enzimas amilolíticas do processo de sacarificação, após a ação de proteases. Os resultados obtidos permitiram definir a sequência do estudo, na qual um segundo DCCR foi aplicado para a avaliação dos efeitos da concentração de inóculo e temperatura em faixas ajustadas, visando alcançar a otimização da fermentação alcoólica, realizando-se a adição de protease anteriormente a hidrólise enzimática. Uma vez otimizada a etapa de fermentação alcoólica, foi realizada uma batelada de produção do vinagre (fermentação acética) com os parâmetros otimizados nas etapas anteriores. A caracterização do vinagre foi realizada por meio da determinação dos parâmetros exigidos na legislação vigente (teor alcoólico residual, acidez total e ácido acético, pH, extrato seco total e reduzido, cinzas e açúcares redutores e totais).

PRINCIPAIS RESULTADOS: A otimização da hidrólise enzimática foi alcançada nos ensaios com concentração de 200 g.L^{-1} de FAD, $30 \mu\text{L.g}^{-1}$ de α -amilase e $40 \mu\text{L.g}^{-1}$ de amiloglicosidade, com os tempos de atuação das mesmas em 2 e 3 horas,

respectivamente. No primeiro teste preliminar, realizado na etapa de fermentação alcoólica, observou-se que a agitação influenciou de forma positiva apenas nos ensaios com 2,0 e 5,0% de inóculo, sendo que o maior rendimento de etanol obtido foi de 1,90% com a utilização de 0,5% de inóculo, em condições estacionárias. Com os resultados obtidos no primeiro teste, ajustou-se as faixas das variáveis do primeiro DCCR onde o teor máximo de etanol obtido foi de 2,10%, com a temperatura em 30°C, 2,8% de inóculo e pH 5,0. Por meio da aplicação do segundo teste verificou-se que, nas condições aplicadas, o tratamento ultrassônico não apresentou efeito significativo na resposta de concentração de etanol, entretanto com a utilização da protease, foi possível aumentar para 3,6% o rendimento de etanol, após as 72h de fermentação alcoólica. Visando alcançar a otimização da fermentação alcoólica, realizou-se um novo DCCR, sendo fixada a concentração de 15 $\mu\text{L.g}^{-1}$ de protease para atuação anteriormente ao processo de hidrólise enzimática dos polissacarídeos e sendo ajustadas as faixas das variáveis significativas no primeiro DCCR (temperatura: 28 a 35 °C; concentração de inóculo: 1 a 7%), onde foi possível alcançar rendimento de 4,10% de etanol. A fermentação acética foi concluída após oito dias da inoculação das bactérias acéticas, por meio do vinagre forte de etanol, sendo que o produto gerado, vinagre a base de farelo de arroz, não atendeu a legislação em vigor, apenas no parâmetro de cinzas, o qual pode ser ajustado com a aplicação de uma etapa de filtração.

Palavras- Chave: Hidrólise Enzimática, Planejamento Experimental, Fermentação Alcoólica e Fermentação Acética.

APRESENTAÇÃO

Esta Dissertação é composta por quatro (04) capítulos, a citar:

1. SIEPMANN, B. Francieli; CANAN, Cristiane; COLLA, Eliane. Vinagre: Produção, Propriedades Medicinaias E Antimicrobrianas. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos.
2. SIEPMANN, B. Francieli; CANAN, Cristiane; JESUS, M. M.M; COLLA, Eliane. Otimização da hidrólise enzimática de farelo de arroz desengordurado para uso em processos fermentativos.
3. Estudo da etapa de fermentação alcoólica da produção de vinagre de farelo de arroz desengordurado
4. Produção e caracterização do vinagre a base de farelo de arroz desengordurado.

CAPÍTULO 1

VINAGRE: PRODUÇÃO, PROPRIEDADES MEDICINAIS E ANTIMICROBIANAS

FRANCIELI BEGNINI SIEPMANN*

CRISTIANE CANAN**

ELIANE COLLA***

RESUMO

Há aproximadamente 5000 anos, os egípcios, babilônios, indianos, persas e gregos já conheciam a arte de fabricação e a versatilidade do vinagre: além de tempero, era a única maneira de preservar carnes, peixes e vegetais, e muito apreciado por seu efeito de resfriamento. Na indústria é utilizado como acidulante, aromatizante e conservante. É um alimento produzido por duas fermentações sucessivas, alcoólica e acética, sendo necessário utilizar apenas matérias-primas com amidos e/ou açúcares, sendo que os polissacarídeos primeiramente devem ser hidrolisados para convertê-los em açúcares fermentescíveis antes de iniciar os processos de fermentações. Os processos utilizados na fabricação de vinagres são: *Fielding process*, processo lento ou *Orleans*, rápido ou alemão ou submerso, sendo o último o mais utilizado devido à alta produtividade. O vinagre é um alimento que tem sido muito utilizado como agente medicinal e antimicrobiano. Estudos evidenciaram efeitos positivos na sua utilização em tratamentos contra doenças inflamatórias no intestino, contra o câncer de cólon, como agente antiglicêmico, além de auxiliar no controle da *Antracnose Podridão* em tomates. Seu poder antioxidante está intimamente correlacionado com o teor de polifenóis totais do substrato e do tipo de madeira utilizada nos barris de envelhecimento. Os antioxidantes auxiliam na prevenção de doença como o câncer, diabetes, envelhecimento, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e doenças degenerativas em humanos. Devido à versatilidade do vinagre, é possível ampliar os estudos nesta área, visando utilizar subprodutos como substrato ou aperfeiçoando o processo além de difundir os seus benefícios aos consumidores.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação alcoólica, fermentação acética, efeito antioxidante.

1.INTRODUÇÃO

Na antiga China, o vinagre era um símbolo de vida. Há 5000 anos atrás, os egípcios, babilônios, indianos, persas e gregos já conheciam a arte de fabricação e versatilidade do vinagre: além de tempero, era a única maneira de preservar carnes, peixes, vegetais e muito apreciado por seu efeito refrescante.

Relatos remetem que os legionários romanos, soldados, fazendeiros e viajantes da Idade Média, bebiam água com vinagre para matar a sede e para a saúde (KERSTERS *et al.*, 2006).

A composição do vinagre é de 80% (v/v) de água e 20% de uma grande variedade de outros compostos, como ácidos orgânicos, álcoois, sais minerais, polifenóis, aminoácidos, entre outros (CASALE *et al.*, 2006).

A fermentação em produtos amiláceos pode ocorrer de forma espontânea, onde as leveduras e bactérias necessárias para a fermentação são carregados pelo pó e /ou insetos ou presentes na própria matéria-prima, (LLAGUNO e POLO, 1991) ou pela adição de inóculo de fermento que contém um elevado número de microrganismos viáveis. Sendo adaptada para o substrato, tais culturas aceleram o processo de fermentação, além de permitir um controle mais rigoroso do processo fermentativo. No vinagre, essa cultura é conhecida como vinagre mãe (HOLZAPFEL, 1997; HOLZAPFEL, 2002).

As leveduras são capazes de metabolizar os açúcares e outros compostos para o etanol, dióxido de carbono e centenas de subprodutos secundários que determinam as propriedades do mosto fermentado que será utilizado nas fases seguintes de fermentação acética e envelhecimento. As propriedades químicas e sensoriais dos vinagres são derivadas da matéria-prima, do método utilizado e dos produtos originados na fermentação (SOLIERI e GIUDICI, 2008; JOHNSTON e GAAS, 2006).

Na indústria alimentícia, o vinagre é utilizado principalmente como acidulante, agente aromatizante e conservante, mas também possui muitas outras aplicações no processamento dos alimentos. É encontrado em centenas de alimentos processados, incluindo saladas, maionese, mostarda, ketchup, produtos de panificação, alimentos em conserva, enlatados, marinadas e molhos. Embora muitos dos vinagres produzidos em todo o mundo sejam obtidos a partir de substratos comuns e muitas vezes com propriedades sensoriais limitadas, outros são produzidos a partir de vinhos *premium*, cuidadosamente envelhecidos e valorizados (HUTKINS, 2006).

Este trabalho visou salientar as recentes investigações sobre as matérias primas e processamentos do vinagre, assim como as propriedades medicinais e antimicrobianas do mesmo.

2. PROCESSO PRODUTIVO

2.1 MATÉRIAS PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE VINAGRE

Os vinagres são produzidos a partir de uma ampla variedade de frutas e cereais sendo classificado conforme a matéria-prima utilizada em sua fabricação. Vinagres de ervas consistem de vinagres de vinho ou destilados brancos, que podem ser temperados com alho, manjericão, estragão, canela, cravo, noz-moscada. Vinagres de fruta são fabricados a partir de vinho adoçado com fruta ou suco de fruta para produzir um sabor agridoce característico. Vinagres tradicionais são produzidos a partir de alimentos regionais de acordo com costumes bem estabelecidos. O vinagre balsâmico de Modena, Itália, é produzido a partir de suco de uva tipo *Trebbiano*, colhidas o mais tarde possível, fermentado lentamente e envelhecido em pipas de madeiras diversas. Vinagres tradicionais de vinho de arroz são mais produzidos

na Ásia, vinagres de coco e cana são comuns na Índia e nas Filipinas (RAJI *et al.*, 2012; JOHNSTON e GAAS, 2006).

Ao longo das últimas décadas, houve uma tendência crescente em agregar valor aos subprodutos de matérias-primas agrícolas (RAJI *et al.*, 2012), por meio da produção de vinagres.

Nas matérias-primas que apresentam polissacarídeos é necessário primeiramente a conversão dos amidos em açúcares fermentescíveis por meio de hidrólise ácida, fúngica, utilização de temperaturas e pressões ou por enzimas. A hidrólise ácida oferece um meio eficaz, porém a recuperação do ácido não é eficiente, além de ocorrer à produção de hidróxido-metil furfural, que inibe o crescimento e a fermentação alcoólica por leveduras. A extrusão por alta pressão pode prejudicar o efeito catalítico da alfa-amilase, causando uma desaceleração da taxa de conversão, portanto a hidrólise enzimática torna-se mais eficiente para produtos alimentícios (FARONE e CUZENS, 1996; KIME HAMDY, 1985; BUCKOW *et al.*, 2007).

Diversos autores tem realizado a hidrólise enzimática de carboidratos de matérias primas complexas, tais como no bagaço de maçã (PARMAR e RUPASINGHE, 2013), farelo de arroz (JIEUN *et al.*, 2009), bagaço de babaçu, (LÓPEZ *et al.*, 2013), batata-doce, (DUVERNAY, CHINN e YENCHO, 2013), casca de limão, (BOLUDA-AGUILAR e LÓPEZ-GÓMEZ, 2013), sabugo de milho, (MING, XIA E XUE, 2007), entre outros.

A fabricação de um vinagre de boa qualidade é uma alternativa para a utilização de frutas de baixo padrão para o consumo *in natura* (GREWAL, TEWARI e KALRA, 1988), e tem sido relatada desde o início do século XX, a citar os trabalhos de Poore (1920), que estudou a produção e composição de vinagre de laranja, Loesecke (1929), com a produção de vinagre de banana, Khattak *et al.* (1965), por meio da fermentação acética a partir de suco de melancia. Maldonado *et al.* (1975), avaliou a produção de vinho e vinagre de frutas tropicais tais como banana, caju, amora preta, abacaxi e tamarindo. Desde então, vários alimentos vem sendo estudados e utilizados como substrato para a produção de vinagres diferenciados.

Os autores Sossou *et al.* (2009), realizaram a fabricação de vinagre a partir da casca de abacaxi e Raji *et al.* (2012), relataram a produção de vinagre de abacaxi descascado; em ambos estudos os produtos obtidos apresentaram características físico-químicas similares aos vinagres comerciais. Com estes produtos seria possível minimizar as perdas pós-colheita do fruto em países tropicais da África, onde a produção é excessiva.

Ubeda *et al.* (2013), utilizaram 3 safras de morangos de segunda qualidade como matéria-prima na produção de vinagre, onde foram avaliadas as alterações na atividade antioxidante, índice de fenóis totais e o total de antocianinas monoméricas durante o processo de produção de vinagre de morango; como resultados, obtiveram um produto de boa qualidade comercial e rico em compostos fenólicos.

As propriedades físico-químicas de diferentes vinagres de concentrados de frutas foram estudadas por Chang *et al.* (2005), já os vinagres de frutas subtropicais foram analisadas pelos autores Ma *et al.* (2007) e Su e Chien (2007). Os autores Wu *et al.* (2007), desenvolveram um novo tipo de vinagre aromático usando arroz como matéria-prima principal, misturado com várias substâncias, tais como gengibre e raiz de alcaçuz.

Estudos com a utilização de outros tipos de vinho foram desenvolvidos pelos autores Cejudo-Bastante *et al.* (2010). Neste trabalho foi avaliada a relação entre a composição de polifenóis com a quantidade de casca de uvas utilizada na fabricação de vinagres de vinho xerez com frutas maceradas em dois tempos diferentes. Esses mesmos autores realizaram avaliações sensoriais e a composição volátil dos vinagres de vinho xerez com frutas maceradas (CEJUDO-BASTANTE *et al.*, 2013).

O sabor e aroma dos vinagres são influenciados pelas matérias-primas utilizadas; os compostos são formados durante a fermentação e são remanescentes das matérias-primas e do tipo de processo utilizado (MORALES *et al.*, 2002). A fim de produzir um bom vinagre, a escolha de matérias-primas e do processo de acetificação são fatores que precisam ser avaliados cautelosamente.

2.2 PROCESSO

O vinagre é um alimento para consumo humano produzido por duas fermentações sucessivas, alcoólica e acética, contendo apenas matérias-primas com amidos e/ou açúcares (SOLIERI e GIUDICI, 2009).

A fermentação alcoólica é a transformação anaeróbia de açúcares, principalmente glicose e frutose, em etanol e dióxido de carbono, produzindo líquidos ligeiramente alcoólicos, o vinho. Este processo é realizado por leveduras e também por algumas bactérias (ZAMOR, 2009). A mais utilizada é *Saccharomyces cerevisiae*, pois são cepas tolerantes ao álcool (PRETORIUS, 2000).

A fermentação alcoólica pode ser resumida na reação global expressa pela equação 1 (ZAMOR, 2009), onde ocorre a formação de etanol e dióxido de carbono a partir de hexoses:



Trata-se de um processo muito complexo, ao mesmo tempo em que esta reação prossegue, uma grande quantidade de outros processos bioquímicos e físico-químicos são realizados, produzindo além do etanol, vários outros compostos tais como álcoois superiores, ésteres, glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína (ZAMOR, 2009).

Ao terminar a fermentação alcoólica inicia-se a fermentação acética, onde ocorre a transformação do etanol em ácido acético pelo metabolismo das bactérias acéticas. Nesta etapa, outros processos químicos e bioquímicos são realizados, que caracterizam o produto final, entre eles a formação e ruptura de ligações tipo éster, a geração de furfural, entre outros. Todos estes componentes contribuem para as características finais dos vinagres produzidos e, portanto, a sua produção ou a eliminação devem ser controladas (DURÁN *et al.*, 2010).

A produção glicolítica do etanol a partir de glicose e frutose afeta a subsequente oxidação acética de diferentes maneiras. Níveis baixos de etanol podem inibir a produção de ácido acético e aumentar a oxidação incompleta de outros polióis e açúcares, principalmente a síntese de ácido glucónico por meio da oxidação direta da glicose (SOLIERI e GIUDICI, 2008).

Outro fator a ser controlado é o aporte de oxigênio, que possui um papel positivo na fermentação acética, uma vez que aumenta a biossíntese de ácidos

graxos e ésteres de esterois e, conseqüentemente, a viabilidade das bactérias (SOLIERI e GIUDICI, 2008).

Na fermentação acética, as espécies de bactérias *Acetobacter* e *Gluconobacter* são as mais utilizadas para a produção de vinagre, em função das suas altas capacidades de oxidar o etanol em ácido acético e sua forte resistência aos mesmos (IIDA, OHNISHI e HORINOUCI, 2008). Massaguer (2005) também indica que as espécies, *Acetobacter schuetzenbachii* ou *Acetobacter curvum* ou *Acetobacter orleanense* são próprias para a fabricação do vinagre

Convém considerar que o uso de culturas puras não é comum na prática industrial, empregando-se geralmente uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada mais eficiente (AQUARONE *et al.*, 2001).

O processamento do vinagre pode ser realizado pelo método artesanal ou pelos processos industriais, tais como *Fielding process*, processo lento ou *Orleans*, rápido ou alemão, ou submerso (LLAGUNO e POLO, 1991).

Um exemplo de produção artesanal é a do vinagre branco a base de arroz (*Kome* ou *Kurôzu* em japonês), o qual é produzido em um vaso de cerâmica; todo o processo (sacarificação, fermentação alcoólica e acética) prossegue espontaneamente dentro do mesmo recipiente, o qual é colocado ao ar livre, sem qualquer controle de temperatura e aeração. As matéria-primas utilizadas são arroz *Koji* cozido e água. O arroz usado para este tipo de vinagre deve ter sido suavemente polido, a fim de reter a maior parte das camadas de farelo, que contêm minerais, vitaminas e proteínas. O processo de fermentação leva em torno de três meses e deve ser realizado durante a primavera ou outono; em seguida o vinagre é envelhecido mais de 1 ano, para então poder ser consumido (HARUTA *et al.*, 2006).

O processo *Orleans* também é chamado de método contínuo, em que o vinagre é obtido a partir de uma fermentação lenta de vinho em barris de madeira. Para iniciar a fermentação em um barril novo, uma pequena quantidade de "vinagre mãe" ou "vinagre forte" é adicionado à massa do vinho. Quando o produto atinge a acidez e sabor desejado é removido da parte superior, enquanto que, um vinho novo e fresco é adicionado periodicamente, desta forma a fermentação não é paralisada; entretanto, este método requer meses até que os vinagres fiquem prontos (SOLIERI e GIUDICI, 2009).

Neste método, as bactérias do ácido acético são colocadas sobre a interface ar-líquido em um contato direto com o ar atmosférico (oxigênio). A presença da bactéria é limitada a superfície do líquido de acidificação e, portanto, é também considerado como um método estático. Hoje em dia, este método é utilizado para a produção de vinagres tradicionais e selecionados devido ao longo período de obtenção requerido e como conseqüência, os custos mais altos (TESFAYE *et al.*, 2002a).

Visando diminuir o tempo do processo de acetificação no método *Orleans* tradicional, Hidalgo *et al.* (2010), estudaram duas modificações nas pipas utilizadas: tipos diferentes de madeiras e construção de dois protótipos, com aumento na interface líquido-ar. Aliada a essas alterações, realizou-se a inoculação de uma cultura pura de *Acetobacter pasteurianus*. O tipo de madeira não teve nenhum efeito na diminuição do tempo de acetificação, entretanto, ao aumentar a interface líquido-ar, aumentava-se a acetificação das bactérias acéticas e conseqüentemente diminuía o tempo envolvido no

processo de acetificação. Com a adição da cultura pura, não foi observado nenhuma alteração no tempo do processo, pois ao final da acetificação as bactérias acéticas encontradas foram *Gluconacetobacter* (espécies *Geórgia intermedius* e/ou *Ga europaeus*), que são as responsáveis pelo término desse processo.

O método mais utilizado industrialmente é o submerso, onde as bactérias acéticas, produtoras de ácido ficam suspensas no líquido, sendo aplicada aeração forte para assegurar a demanda de oxigênio. Este método foi introduzido para a produção de vinagre no início do século XX (TESFAYE *et al.*, 2002a).

Este processo permite que a oxidação do álcool seja realizada 30 vezes mais rápida, com uma maior eficiência e com a utilização de um reator menor. Neste processo, os rendimentos são de 5 - 8% e mais de 90% do rendimento teórico é obtido, além de ser possível automatizar todo o processo (FREGAPANE *et al.*, 1999).

Entretanto, devido à alta taxa de produção há uma elevação na temperatura, sendo que um aumento de 2-3 °C acima da temperatura ótima da fermentação (30 °C) gera uma redução acentuada na velocidade de produção, por isso torna-se necessário um sistema de arrefecimento eficiente no processo submerso (OHMORI *et al.*, 1980).

Os autores Lopez, Johnson e Wood (1961), mostraram que os fatores como potencial oxidação/redução, teor alcoólico do mosto, teor de oxigênio, temperatura e composição qualitativa do meio, interferem significativamente na taxa fermentativa do processo submerso, esses resultados também foram confirmados pelos autores Tesfaye *et al.* (2002a), que afirmam que o sucesso do processo depende da manutenção da cultura bacteriana na fase exponencial de crescimento. Deste modo, o meio fornece os nutrientes e o oxigênio necessário para a sobrevivência das bactérias.

Para aumentar a eficiência do processo de acetificação do processo submerso, Qi *et al.* (2013), estudaram diferentes faixas de acidez inicial (30, 40 e 50 g/L); no primeiro caso, as bactérias acéticas *Acetobacter pasteurianus* se desenvolveram rapidamente, entretanto ao aumentar a acidez para 40 g/L houve um aumento menos acentuado na biomassa; já com o valor máximo de acidez, as bactérias permaneceram vivas no meio durante 5 dias, mas sem proliferarem. Mesmo não tendo a quantidade máxima de bactérias acéticas, o ensaio com 40 g/L de acidez inicial apresentou um aumento de 20% na taxa de acetificação e consumo de oxigênio 40% inferior, quando comparado com os métodos tradicionais.

Os autores García *et al.* (2007), desenvolveram um método *on-line*, que permite o carregamento, descarregamento e o cálculo rápido da taxa média de acetificação, durante um ciclo típico de produção semi-contínua de vinagre. Para a estimativa da taxa de acetificação, o *software* utiliza a variação da concentração de etanol, durante um ciclo, que pode ser prontamente determinado em linha e permite que a taxa de oxidação biológica média, em cada passo do processo seja convenientemente estimada. Através destes dados é possível quantificar com precisão a atividade bacteriana durante um ciclo de acetificação e a forma como ela é influenciada pelas condições de funcionamento, com vista a identificar as medidas específicas que mais são afetadas por alterações durante o processo.

Os autores Cerezo *et al.* (2010), verificaram que os tipos de madeira utilizadas nas pipas de madeiras, durante o processo de envelhecimento, interferem nas características físico-químicas e sensoriais do produto final. Sensorialmente, observou-se que os vinagres envelhecidos em pipas de carvalho apresentavam maiores pontuações para a presença de compostos doces, como a baunilha.

Após a fermentação acética, o vinagre passa pelos processos de clarificação e filtração. Uma prática comum na indústria de vinagre é misturar uma fração de vinagre clarificado com vinagre não clarificado, dessa forma é possível manter as características e a qualidade do produto final. Um dos métodos utilizados para a clarificação consiste em misturar o carvão ativado no vinagre sob agitação e em seguida separar do carvão ativado por filtração ou decantação, entretanto esse processo é semi-contínuo, além de ocorrer perdas consideráveis de vinagre, há geração de resíduos sólidos (ACHAERANDIO *et al.*, 2002).

Na tentativa de diminuir o tempo envolvido na clarificação e pasteurização, os autores López *et al.* (2005), avaliaram a clarificação com a utilização de microfiltração de fluxo cruzado em escala industrial, através da redução da turbidez, de sólidos totais em suspensão e do teor de polifenóis; com essa técnica, seria possível realizar a pasteurização à frio. Outra técnica foi estudada por Achaerandio *et al.* (2002), que utilizaram a adsorção em resinas de permuta para a clarificação contínua do vinagre.

A qualidade final do vinagre é determinada pela matéria-prima, acetificação do sistema e, eventualmente, o tipo de madeira utilizada no processo de envelhecimento (MORALES *et al.*, 2001).

A qualidade de um determinado alimento pode ser avaliada levando-se em conta diferentes perspectivas, como valor nutricional, segurança alimentar e propriedades sensoriais. No caso do vinagre, a qualidade é fortemente determinada pelas propriedades sensoriais, uma vez que podem modificar a apreciação global (TESFAYE *et al.*, 2002a).

O vinagre pode ser armazenado sob refrigeração o que auxilia a minimizar a velocidade das reações de oxidação, que causam modificações enzimáticas no produto e diminuem a qualidade do mesmo. Isto foi observado em 95 amostras de vinagre que foram analisadas ao abrir a garrafa e após um período de armazenamento. O oxigênio, ao entrar em contato com o vinagre, provocou um decréscimo no conteúdo de dois principais conservantes, ácido cítrico e dióxido de enxofre. Em vinagres com um alto teor de carboidratos, tais como o vinagre balsâmico, ou vinagre Sherry Pedro Ximenez, a reação de *Maillard* induz a condensação dos hidratos de carbono redutores (glucose, frutose) e aminoácidos livres (prolina, lisina) presentes no vinagre, produzindo uma série de reações que culminam na polimerização e aparecimento de pigmentos escuros ou melanoidinas. As pectinas, gomas e mucilagens também foram afetadas pelas enzimas responsáveis pela hidrólise pectolítica, que produz a perda da consistência do vinagre (CASALE *et al.*, 2006).

3. PROPRIEDADES MEDICINAIS E ANTIMICROBRIANA

Na Idade Média e na Renascença, o vinagre era utilizado como medicamento de uso interno e tópico. Era indicado como digestivo, profilático contra distúrbios do fígado, anti-helmíntico, dor de garganta, e para esfregar

nos pulsos contra a febre e também contra a queda de cabelo e tinea (PLESSI, 2003).

Segundo Du *et al.* (2011), o vinagre é um alimento que tem sido muito utilizado como agente medicinal. Na época de 79 D.C. recomendava-se tomar vinagre para o tratamento de náusea, soluço, lepra, sardas, úlceras, mordida de cão, ferroadada de escorpião e picadas de insetos venenosos (KERSTERS *et al.*, 2006).

Os autores Johnston e Gaas (2006), realizaram uma revisão que examina a evidência científica para usos medicinais de vinagre, com destaque para as investigações a respeito das funções do vinagre como agente antiglicêmico.

Outros têm relatado que a administração de vinagre (cerca de 0,57 mmol de ácido acético, por via oral) inibiu o sistema renina-angiotensina, em ratos *Sprague-Dawley* não hipertensos (HONSHO *et al.*, 2005); já o Kurôsu, um tipo de vinagre preto que é produzido com arroz integral, tradicional do Japão, teve seus benefícios *in vitro* e *in vivo*, contra o câncer de colón, identificados pelos autores (SHIZUMA *et al.*, 2011).

Visando o tratamento contra colite, WAKUDA *et al.* (2013), desenvolveram o vinagre de pera japonesa, compararam-no com o vinagre comercial de maçã, em relação a atuação do ácido galacturônico, principal constituinte da pectina e altamente presente nas cascas dos frutos, no tratamento em ratos com colite aguda induzida. Os resultados mostraram que o vinagre de maçã não apresentou nenhum efeito protetor nos ratos, já o vinagre de pera japonesa diminuiu a inflamação e poderia ser utilizado como um alimento funcional em tratamentos contra doenças inflamatórias no intestino.

Tendo em vista que o vinagre é muitas vezes tratado como um agente antimicrobiano, Sholberg *et al.* (2000), verificaram a eficiência de oito tipos de vinagres, com concentrações de 4,5 a 6,0% de ácido acético, aplicados na forma de vapor, sobre frutas contaminadas com conídios de diversos tipos de mofos, como da podridão parda (*Monilinia fructicola* - G.Wint.), mofo cinzento (*Botrytis cinerea* Pers.: Fr), mofo azul (*Penicillium expansum* Link), mofo causador da deterioração de frutas de caroço (*Prunus* sp), mofos do morangos (*Fragaria x ananassa* Duchesne) e mofos da maçã (*Malus x domestic* Borkh). Com resultados positivos no controle desses fungos, os autores salientaram que o vinagre pode ser utilizado como alternativa eficaz na esterilização de superfícies contaminadas por conídios de fungos patogênicos.

O autor Tzortzakis (2010), demonstrou a eficiência da utilização do vinagre no controle da Antracnose podridão (*Colletotrichum coccodes*) em tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) *in vitro*. Os estudos desenvolvidos por Costa *et al.* (2009) e Sengün e Karapinar, (2004) evidenciaram que o vinagre também pode ser utilizado como forma de inativar os cistos de *Giardia duodenalis* em alimentos, e ao ser combinado com suco de limão reduz a contagem de *Salmonella typhimurium* à níveis não detectáveis em cenouras (COSTA *et al.*, 2009 e SENGÜN e KARAPINAR, 2004). Além disso, o vapor de ácido acético auxiliou a reduzir perdas pós-colheita causadas pela podridão parda, em damasco e ameixa (LIU *et al.*, 2002).

Apesar de terem sido observados bons resultados na utilização do vinagre como agente antimicrobiano, deve-se salientar que o baixo teor de

ácido acético, que o torna seguro para o consumo, também limita a sua eficácia nesta utilização (TZORTZAKIS, 2010).

3.1 PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES

O efeito protetor sobre a saúde obtido com o consumo moderado de vinhos tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Isto foi atribuído ao teor de polifenóis e a atividade antioxidante destes compostos. Os produtos derivados do vinho, como o vinagre e aguardente, também contém polifenóis e podem possuir uma determinada atividade antioxidante, contribuindo com o efeito protetor para a saúde (VERZELLONI *et al.*, 2007).

O poder antioxidante está intimamente correlacionado com o teor de polifenóis totais das amostras. Cada polifenol tem um poder antioxidante diferente, em função da sua estrutura química, entretanto nem sempre os compostos que estão presentes em maiores concentrações são necessariamente os com maior atividade antioxidante. (ALONSO *et al.*, 2004).

Alguns tipos de vinagre são envelhecidos objetivando o desenvolvimento de substâncias que modificam as características sensoriais do produto final. Visando avaliar se durante esse processo o vinagre absorvia substâncias fenólicas da madeira utilizada nos barris, os autores Tesfaye *et al.* (2002b) estudaram a evolução desses compostos no envelhecimento do vinagre xerez e observaram que houve um aumento na concentração de compostos fenólicos, sendo que no período de 6 meses essa mudança já era significativa e ao final do processo de envelhecimento (2 anos), as concentrações iniciais de todos os compostos fenólicos haviam duplicado.

Os autores Cerezo *et al.* (2010), analisaram a atuação das diferentes madeiras no processo de envelhecimento. Os vinagres balsâmicos e de vinho tinto foram envelhecidos em pipas de madeira acácia, cereja, castanha e carvalho, e foram avaliados através de análises de índice fenol total, total de antocianinas monoméricas em extrato seco, e compostos fenólicos e furânico. Neste estudo, os autores identificaram que a taxifolina, encontra-se presente em vinagres envelhecidos em madeira de cerejeira, por outro lado, o ácido elágico, que possui propriedades antioxidantes, é um composto característico para as amostras envelhecidas em pipas de carvalho e castanha.

A presença de antioxidantes já foi determinada em vinagres tradicionais balsâmicos, vinagre balsâmico clássico e em vinagres de vinho tinto (VERZELLONI *et al.*, 2007). Também já foi caracterizada a atividade antioxidante do vinagre de caqui pelos autores Sakanaka e Ishihara (2008), que sugerem a utilização deste produto como antioxidante natural, já que o mesmo inibiu a oxidação lipídica em atum, auxiliando na preservação das características finais do produto.

Vinagres de cereais são ricos em polissacarídeos, proteína, além de compostos fenólicos e melanoidinas, que possuem atividade antioxidante, auxiliando na prevenção de doença como o câncer, diabetes, envelhecimento, aterosclerose, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e outras doenças degenerativas em humanos (XU *et al.*, 2006; ANI e NAIDU, 2011).

Durante o processo de acetificação a quantidade de compostos fenólicos presente na matéria-prima diminui; essa diminuição varia com o tipo de vinagre produzido, como mostra o estudo realizado por Andlauer, Stumpf e Fürst

(2000), que observaram uma queda de 40% nos vinagres de cidra e de 13 e 8% para os vinagres de vinho vermelho e branco, respectivamente. Entretanto em estudo realizado *in vitro*, com vinagre de cana-de-açúcar (*Kibizu*), observou-se que mesmo com essa diminuição, o vinagre induziu a apoptose em células humanas com leucemia (MIMURA *et al.*, 2004), e um vinagre de arroz japonês tradicional (*Kurôzu*) inibiu a proliferação de células humanas cancerosas, de maneira dose-dependente, mostrando que essa atividade antioxidante continua tendo papel importante no produto final (NANDA *et al.*, 2004).

Com base nas propriedades observadas no consumo do vinagre de arroz, torna-se interessante avaliar a potencialidade da utilização dos subprodutos provenientes da industrialização do arroz, tais como o farelo do arroz que apresenta altas concentrações de antioxidantes, como substrato para a produção de novos tipos de vinagre.

O farelo do arroz apresenta alta concentração de fitinas (9,5 a 14,5%), matéria-prima fundamental para a obtenção de ácido fítico e fitatos. O ácido fítico está distribuído no arroz em seus diferentes componentes (80% de fósforo fítico concentrado no pericarpo e aleurona, 7,6% no germe e 1,2% no endosperma) (O'DELL *et al.*, 1972), em concentrações que variam de 5,9 a 6,1% (KASIM e EDWARDS, 1998). Dentre as propriedades químicas do ácido fítico destaca-se o seu forte poder quelante de íons metálicos multivalentes, especialmente o ferro, zinco e cálcio (HURRELL, 2004), devido a sua estrutura química única com seis grupamentos fosfato que podem formar complexos fortes e insolúveis com cátions di e trivalentes (OBERLEAS, 1973). Por esta característica, durante muitos anos foi considerado como um composto antinutricional devido à capacidade de reduzir a biodisponibilidade de alguns minerais importantes na dieta. Entretanto, nos últimos anos, a capacidade antioxidante do ácido fítico tem sido estudada e descrita por vários pesquisadores (SOARES *et al.*, 2004; STODOLAK *et al.*, 2007; HARBACH *et al.*, 2007) por formar quelato com o íon Fe^{2+} tornando-o cataliticamente inativo e inibir a formação de radicais hidroxil ($\cdot HO$). Além disto, contém também inúmeros componentes minoritários, enquadrados na categoria de biofenóis. Esses não são encontrados no arroz branco polido e são relacionados com diversos benefícios à saúde, como a redução do nível de colesterol sanguíneo, na prevenção de diferentes disfunções como câncer, hiperlipidemia, hipercalcúria, cálculos renais em crianças e para doenças cardíacas (JARIWALLA, 2001).

4. CONCLUSÕES

Devido a crescente demanda na produção dos vinagres, houve a necessidade de transformação dos métodos de produção, evoluindo-se dos métodos tradicionais para os métodos industriais de produção em grande escala. Concomitantemente, o seu consumo aprimorou-se passando de um simples tempero para um alimento capaz de contribuir com manutenção da saúde, devido às propriedades nutricionais e antioxidantes presentes nos substratos, onde são utilizadas diversas frutas, vinhos e temperos, além de ser uma alternativa para a utilização de resíduos gerados em indústrias

alimentícias, mostrando ser um alimento que apresenta grande potencial a ser explorado.

ABSTRACT

VINEGAR: PRODUCTION, MEDICINAL PROPERTIES AND ANTIMICROBRIANA

About 5000 years ago, the Egyptians, Babylonians, Indians, Persians and Greeks already knew the manufacturing art and the versatility of vinegar: addition of spice, it was the only way to preserve meat, fish, vegetables and much appreciated for its cooling effect. In the industry, it is used as acidulant, flavor and preservative. It is a food produced by two successive fermentation, alcoholic and acetic, being necessary to use only raw materials with starches and/or sugars, and polysaccharides must first be hydrolyzed to convert them into fermentable sugars before starting the fermentation process. The processes used in the manufacture of vinegars are: Fielding process, slow or Orleans, fast or German or submerged, the latter being the most widely used due to high productivity. Vinegar is a food that has long been used as a medicinal agent and antimicrobial. Studies showed positive effects on their use in therapies for inflammatory bowel disease, colon cancer, as agent anti glyceemic, besides assisting in the control of anthracnose rot in tomatoes. Your antioxidant power is correlated with the total polyphenol content of the substrate and the type of wood used in the aging barrels. The antioxidants assist in the prevention of disease such as cancer, diabetes, aging, atherosclerosis, cardiovascular diseases, inflammatory and degenerative diseases in humans. Due to the versatility of vinegar, it is possible to extend the studies in this area, aiming to use by-products as substrate or perfecting the process in addition to spread its benefits to consumers.

KEY-WORDS: alcoholic fermentation, acetic fermentation, antioxidant activity.

REFERENCIAS

ACHAERANDIO, I; GÜELL, C; LÓPEZ,F. Continuous vinegar decolorization with exchange resins. **Journal of Food Engineering**, v. 51, n.4, p. 311–317, March.2002.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, 2001, 523p.

ALONSO, A. M.; CASTRO R.; RODRIGUEZ, M. C.; GUILLÉN, D. A; BARROSO, C. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research International**, v.37, n.7, p.715–721, Aug.2004.

ANDLAUER, W.; STUMPF, C. e FÜRST P. Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds. **Food and Feed Chemistry**, v.48, n.8,p.3533-3536, July, 2000.

ANI, V; NAIDU, K. A. Antioxidant potential of bitter cumin (*Centratherum anthelminticum* (L.) Kuntze) seeds in *in vitro* models. **Complementary & Alternative Medicine**, v. 11, n. 40, p. 2-8, Oct. 2001.

BOLUDA-AGUILAR, M.; LÓPEZ-GÓMEZ, A. Production of bioethanol by fermentation of lemon (*Citrus limon*L.) peel wastes pretreated with steam explosion. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n.1, p.188–197, Jan. 2013.

CASALE, M.; ABAJO, S. M.; SÁIZ, G. J.; PIZARRO, C.; FORINA, M. Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 557, n.1, p.360-366, Jan. 2006.

CEJUDO-BASTANTE, Maria J.; GUERRERO, Enrique. D; MEJÍAS, Remedios. C; MARÍN, Ramón N; DODERO, Carmen R.; BARROSO, Carmelo G. Study of the Polyphenolic Composition and Antioxidant Activity of New Sherry Vinegar-Derived Products by Maceration with Fruits. **Journal of Agricyultural and Food Chemistry**, v. 58, n.1, p. 11814-11820, Oct. 2010.

CEJUDO-BASTANTE, Maria J.; DURÁN Enrique; CASTRO, Remedios; DODERO, Ramón N.; BARROSO, Carmelo G. Study of the volatile composition and sensory characteristics of new Sherry vinegar-derived products by maceration with fruits. **LWT- Food Science and Technology**, v. 50, n.2, p.469-479, March. 2013.

CEREZO, A. B.; TESFAYE, W.; SORIA-DÍAZ, M.E.; TORIJA, M. J.; MATEO, E.; GARCIA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n.2,p.175–184, March. 2010.

CHANG, R. C.; LEE, H. C.; OU, A. S. Investigation of the physico-chemical properties of concentrated fruit vinegar. **Yaowu Shipin Fenxi**, v. 13, n.4, p.348-356, June. 2005.

COSTA, A. O.; THOMAZ-SOCCOL, V.; PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A. Effect of vinegar on the viability of *Giardia duodenalis* cysts. **International Journal of Food Microbiology** v.128, n.3, p. 510–512, Jan. 2009.

DU, X.; JIA, S.; YANG, Y.; WANG, S. Genome Sequence of *Gluconacetobacter* sp. Strain SXCC-1, Isolated from Chinese Vinegar Fermentation Starter. **Journal of Bacteriology**. v.13, n.19, p. 3395–3396, May. 2011.

DURÁN, E.; PALMA, M.; NATERA, R.; CASTRO, R.; BARROSO, C. G. New FT-IR method to control the evolution of the volatile constituents of vinegar during the acetic fermentation process. **Food Chemistry**, v.121, n.2, p.575-579, July.2010.

DUVERNAY, W. H.; CHINN, M. S.; YENCHO, G. C. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n.1,p. 527–537, 2013.

FREGAPANE,G.; RUBIO-FERNÁNDEZ, H.; NIETO, J.; SALVADOR, M.D. Wine Vinegar Production Using a Noncommercial 100-Litre Bubble Column Reactor Equipped with a Novel Type of Dynamic Sparger. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 2, p. 141-146, April.1999.

GARCÍA-GARCÍA, I.;CANTERO- MORENO, D.; JIMÉNEZ-OT, C.; BAENARUANO, S.; JIMÉNEZ-HORNERO, J.; SANTOS- DUEÑAS, I.; BONILLA-VENCESLADA, J.; BARJA, F. Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle. **Journal of Food Engineering**, v.80, n.2, p. 460-464, May.2007.

GREWAL, H. S; TEWARI, H. K; KALRA, K. L. Vinegar Production from Substandard Fruits. **Biological Wastes**, v.26, n.1 p.9-14, Febr.1988.

HARBACH, A. P. R.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L.; BRIDI, A. M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C. A.; IDA, E. I. Dietary Corn Germ Containing Phytic Acid Prevents Pork Meat Lipid Oxidation While Maintaining Normal Animal Growth Performance. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1630-1633, 2007.

HARUTA, S.; UENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUCHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v.109, n.1, p. 79-87, July. 2006.

HIDALGO, C.; VEGAS, C.; MATEO, E.; TESFAYE, W.; CEREZO, A.B.; CALLEJÓN, R.M.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; TORIJA, M.J. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n. 1, p. 56-62, June.2010.

HOLZAPFEL, W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. **Food Control**, v. 8, n. 5-6, p. 241-258, Oct.-Dec.1997.

HOLZAPFEL, W. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v.75, n.3, p.197-212, May.2002.

HONSHO, S.; SUGIYAMA, A.; TAKAHARA, A.; SATOH, Y.; NAKAMURA, Y.; HASHIMOTO K. A red wine vinegar beverage can inhibit the rennin-angiotensin system: experimental evidence in vivo. **Biol Pharm Bull**, v. 28, n.7, p. 1208-1210, April. 2005.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and Technology Of Fermented Foods**. Austrália: Blackwell Publishing, 2006. 457 p.

HURRELL, R. F. Phytic Acid Degradation As A Means Of Improving Iron Absorption. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.74, n.6, p.445-452, Nov.2004.

IIDA, Aya; YASUO, Ohnishi, E.; HORINOUCI, Sueharu. Control of Acetic Acid Fermentation by Quorum Sensing via *N*-Acylhomoserine Lactones. In *Gluconacetobacter intermedius*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.7, p.2546-2555, Feb.2008.

JARIWALLA, R.J. Rice-Bran Products: Phytonutrients With Potential Applications In Preventive And Clinical Medicine. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**.v.27, n1, p.17-26, Jan. 2001

JIEUN, L.; SEO, E.; KWEON, D.; PARK, K.; JIN, Y. Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n.5, p. 482–490, Febr.2009.

JOHNSTON, C. S.; GAAS, C. A. Vinegar: Medicinal Uses And Antiglycemic Effect. **MedGenMed**, v.8, n.2, p.61-67, May.2006.

KASIM, A. B.; EDWARDS JR, H. The Analysis For Inositol Phosphate Forms In Feed Ingredients. **Journal of Food Science and Agriculture**, v.76, n.1, p.1-9, Jan.1998.

KHATTAK, J.N.; HAMDY, M.K.; POWERS, J.J. Use of watermelon juice. II: acetic acid fermentation. **Food Technology**, n. 19, p. 998-1001, 1965.

KERSTERS, K.; LISDIYANTI, P.; KOMAGATA, K.; SWINGS, J. The family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. In. DWORKIN, Martin; FALKOW, Stanley; ROSENBERG, Eugene; SCHLEIFER, Karl-Heinz; STACKEBRANDT, Erko. **The Prokaryotes**, 3 ed, v5, Springer, 2006. 676 p.

LIU, W.T; CHU, C.L; ZHOU, T. Tymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. **HortScience**, v. 37, n.1, p.151-156, Feb.2002.

LLAGUNO, C. e POLO, M. C. **El Vinagre del Vino**. Ebcomp, S.A, Bergantin, 1, Madrid, Espanha, 1991. 238 p.

LOESECKE, Harry. Preparation of Banana Vinegar. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, n. 2, p.175-176, Febr.1929.

LOPEZ, A. L.; JOHNSON, W.; WOOD C. B. Observations on a Laboratory Method for Submerged Acetic Fermentation. **Department of Horticulture, Virginia Agricultural Experiment Station, Virginia Polytechnic Institute**, v.9, n.1, p.425-433, Jan.1961.

LÓPEZ, F.; PESCADOR, P.; GÜELL, C.; MORALES, M.L.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Industrial vinegar clarification by cross-flow microfiltration: effect on colour and polyphenol content. **Journal of Food Engineering**, v. 68, n.1, p. 133–136, May 2005.

LÓPEZ, Jimmy A; LÁZARO, Carolina da C.; FREIRE, Denise M. G.; CASTRO, Aline M de. Characterization of multienzyme solutions produced by solid-state fermentation of babassu cake, for use in cold hydrolysis of raw biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v.15, n.1, p.231-239, Aug. 2013

MA, Cheng-Jin; HUANG, Qun; ZHONG, Zhi-Cheng; LI, Yan-po; GAO, Yao-Fu. Study on Brewing Technology of water chestnuts healthy vinegar. **食品科学 工艺技术**, v. 28, n. 08, p.178-181, 2007.

MALDONADO, O.; ROLZ, C.; CABRERA, S. S. Wine and Vinegar production from tropical fruits. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 2, p. 262–265, March 1975.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. São Paulo: Livraria Varela, p. 69-75, 2005.

MIMURA, A.; SUZUKI Y.; TOSHIMA Y.; YAZAKI S.; OHTSUKI T.; UI, S.; HYODOH, F. Induction of apoptosis in human leukemia cells by naturally fermented sugar cane vinegar (kibizu) of Amami Ohshima Island. **Biofactors**, v.22, n.1-4, p.93–97, 2004.

MING, C.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.59, n.2, p. 85-89, March.2007.

MORALES, M.L., GONZÁLEZ, G.A., CASAS, J.A., TRONCOSO, A.M. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. **European Food Research Technology**, v.212, n.6, p. 676–682, April. 2001

MORALES, M.L., TEFAYE, W., GARCÍA-PARRILLA, M.C., CASAS, J.A., TRONCOSO, A.M. Evolution of the aroma profile of Sherry wine vinegars during an experimental aging in wood. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.22, n.50, p.3173–3178, May.2002.

NANDA, K.; MIYOSHI, N.; NAKAMURA, Y. Extract of vinegar “Kurosu” from unpolished rice inhibits the proliferation of human cancer cells. **Journal Experimental e Clinical Cancer Research**, v.23, n.1, p.69–75, March.2004.

OBERLEAS, D. Phytates. In: **Toxicants Occurring Naturally In Foods**. Washington: National Academy of Sciences, 1973.

O'DELL, B. L.; DeBOLAND, A.; KOIRTYOHANN, S. R. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, n.3, p.718-723, May.1972.

OHMORI, S.; MASAI, H.; ARIMA, K.; BEPPU, T. Isolation and Identification of Acetic Acid Bacteria for Submerged Acetic Acid Fermentation at High Tempera. **Agriculture Biology Chemistry**, v. 44, n.12, p. 2901-2906, July.1980.

PARMAR, I. e RUPASINGHE, H.P.V. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. **Bioresource Tecnologia**, v.130, n.1, p.613-620, Febr. 2013.

PLESSI, M. **Vinegar**. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2° ed., 2003, 6004p.

POORE, H. D. Orange Vinegar-Its Manufacture and Composition. **Industrial and Enginnering Chemistry**, v.12, n.12, p.1176-1178, July.1920.

PRETORIUS, Isak. Tailoring Wine Yeast For The New Millennium: Novel Approaches To The Ancient Art Of Winemaking. **Yeast**. v.16, n.8, p.675-729, June. 2000.

QI, Z.; YANG, H.; XIA, X.; XIN, Y.; ZHANG, L.; WANG, W.; YU, X. A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n.2, p.304–309, May.2013

RAJI, Y. O.; JIBRIL, M.; MISAU, M. I.; DANJUMA, Y. B. Vinegar from pineapple peel. **International Journal of Advanced Scientific Research and Technology**, v. 3, n.2, p.656-666, June.2012.

SAKANAKA, S.; ISHIHARA, Y. Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. **Food Chemistry**, v.107,n.2, p.739–744, March. 2008.

SENGÜN, I. Y.; KARAPINAR, M. Effective ness of lemon juice, vinegar and their mixture in the elimination of Salmonella typhimurium on carrots (Daucus

carota L.). **International Journal of Food Microbiology**, v.96, n.3, p. 301 – 305, Nov.2004.

SHIZUMA, T.; ISHIWATA, K.; NAGANO, M.; MORI, H.; FUKUYAMA, N. Protective Effects of Kurozu and Kurozu Moromimatsu on Dextra Sulfate Sodium-Induced Experimental Colitis. **Digestive Diseases and Science**, v. 56, n.2, p.1387–1392, May.2011.

SHOLBERG, Peter; HAAG, Paula; HOCKING, Rod; BEDFORD, Karen. The Use of Vinegar Vapor to Reduce Postharvest Decay of Harvested Fruit. **HortScience**, v.35, n.5, p.898-903, Aug.2000.

SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Synergism Between Dietary Vitamin E And Exogenous Phytic Acid In Prevention Of Warmed-Over Flavour Development In Chicken Breast Meat, Pectoralis Major M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.57–62, March.2004.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. Yeasts Associated To Traditional Balsamic Vinegar: Ecological And Technological Features. **International Journal of Food Microbiology**, n. 125, v.1, p.36–45, Sept. 2008.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. **Vinegars of the World**. Itália: Verlag, Springer, 2009. 244p.

SOSSOU, S. K.; AMEYAPOH, Y.; KAROU, S. D.; SOUZA, C. Study of Pineapple peellings processing into vinegar by biotechnology. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n.11, p. 859-865, 2009.

STODOLAK, B.; STARZÝNSKA, A.; CZYSZCZOŃ, M.; ŻYŁA, K. The Effect Of Phytic Acid On Antioxidant Stability Of Raw And Cooked Meat. **Food Chemistry**, v.101, v.4 p.1041-1045, Feb.2007.

SU, M.; CHIEN, P. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 104, n.1, p. 182-187, July.2007

TESFAYE, W; MORALES, M.L; GARCIA-PARRILLA, M.C, TRONCOSO, A.M. Wine Vinegar: Technology, Authenticity And Quality Evaluation. **Trends in Food Science e Technology** . v.13,n.1, p.12–21, Jan.2002a.

TESFAYE, W; MORALES, M.L; GARCIA-PARRILLA, M.C, TRONCOSO, A.M. Evolution of Phenolic Compounds during an Experimental Aging in Wood of Sherry Vinegar. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.24, p. 7053–7061, Jul.2002b.

TZORTZAKIS, N. G. Ethanol, vinegar and *Origanum vulgare* oil vapour suppress the development of anthracnose rot in tomato fruit. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n.1, p.14–18, Aug. 2010

UBEDA C.; CALLEJÓN, R.; HIDALGO, C.; TORIJA, M.J.; TRONCOSO, A.M.; MORALES, M.L. Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effect on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. **LWT- Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p.139-145, July. 2013.

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHI, D.; CONTE, A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. **Food Chemistry**, v.105, n.2 p.564–571,Nov. 2007.

XU, Q.; TAO, W., AO, Z. Antioxidant activity of vinegars melanoidins. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p.841-849, Aug.2007.

ZAMOR, Fernando. **Biochemistry of Alcoholic Fermentation in Wine Chemistry and Biochemistry**. Moreno-Arribas, Spain: M.C. Polo, 2009. 437p.

WAKUDA,T.; AZUMA, K.; SAIMOTO, H.; IFUKU, S.; MORIMOTO, M.; ARIFUKU, I.; ASAKA, M.; TSUKA, T.; IMAGAWA, T.; OKAMOTO, Y.; OSAKI, T.; MINAMI, S. A Protective effects of galacturonic acid-rich vinegar brewed from Japanese pear in a dextran sodium sulfate-induced acute colitis model. **Journal of functional foods**, v.5, n.1,p. 516 – 523, Jan. 2013.

WU Bin; WANG Rong-Rong; WANG Jia-Dong; JIA Zhi-Yong. Research on production of ginger-rice vinegar drink. **The Beverage Industry**, v.2, n.1, Jan. 2007.

CAPÍTULO 2

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO PARA USO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

F. BEGNINI ¹; C. CANAN ²; M.M.M JESUS ³; E. COLLA ⁴

^{1,2,3,4} Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Cursos de Tecnologia de Alimentos e Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: franbegnini@gmail.com

RESUMO: O farelo de arroz desengordurado (FAD) é produzido em larga escala e apresenta elevado potencial nutritivo. Uma das formas de otimizar sua utilização é a de valorizar a concentração elevada de carboidratos e proteínas aplicando-o como substrato em processos fermentativos. O objetivo deste trabalho foi realizar a otimização da hidrólise enzimática do farelo de arroz desengordurado para conversão dos açúcares complexos em fermentescíveis, visando sua utilização em processos fermentativos. A otimização do processo foi alcançada por meio de uma estratégia sequencial de planejamento experimental, realizando-se um planejamento fracionário para avaliação dos efeitos da concentração de enzimas amilolíticas, tempo de atuação das mesmas e diluição do farelo de arroz desengordurado - FAD sobre a resposta de açúcares redutores liberados, seguido de dois DCCRs (Delineamento Composto Central Rotacional). A otimização foi alcançada nos ensaios com concentração de 200 g·L⁻¹ de FAD, 30 µL·g⁻¹ de α -amilase e 40µL·g⁻¹ de amiloglucosidade, com os tempos de atuação das mesmas em 2 e 3 horas, respectivamente.

1. INTRODUÇÃO

O farelo de arroz desengordurado (FAD) é um importante subproduto obtido no processamento do arroz polido. Segundo as estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de março de 2013/14 o Brasil produziu aproximadamente 12,8 milhões de toneladas de arroz, apresentando um acréscimo de 8% em relação à safra de 2012/13. O processamento do arroz branco resulta em alguns subprodutos como a casca, o farelo e grãos quebrados, sendo que o farelo corresponde a 8,5 - 14,8% do arroz integral, sendo constituído pelo endosperma, casca e grãos quebrados que são separados por peneiramento (JULIANO, BECHTEL, 1985 e LUH, 1980).

A composição química e a qualidade nutricional dos grãos de arroz variam consideravelmente pelos fatores genéticos, influências ambientais, tratamento de fertilizante, o grau de moagem e condições de armazenamento (AMISSAH et al., 2003).

Em estudo realizado por Amissah et al. (2003) observou-se que a concentração de carboidratos presentes em 16 variedades de farelo de arroz variou de 26 a 46%, sendo que conforme analisado por Wang, et al. (2008) o consumo dos polissacarídeos e derivados modificados do farelo de arroz desengordurado apresenta diversos benefícios à saúde, entre eles, a estimulação da resposta imune das células, favorecendo a atividade antitumoral, melhorando a função imunitária (TZIANABOS, 2000) e aumentando os linfócitos do sangue periférico (TAKENAKA e ITOYAMA, 1993), além disso, tem sido relatado que os polissacarídeos do farelo de arroz apresentam propriedades antioxidantes (CHEN, et al., 2008 e TSENG, YANG e MAU, 2008), devido a alta concentração de fitinas (9,5 a 14,5%), matéria-prima fundamental para a obtenção de ácido fítico e fitatos (O'DELL et al., 1972). Entretanto a conservação do farelo de arroz "in natura" torna-se problemática, pois o mesmo contém a enzima lipase, responsável pelo processo de rancificação, tornando-o não comestível (KAHLON, 2009).

A alta concentração de carboidratos justifica a utilização do FAD em processos fermentativos, entretanto é necessário realizar a conversão dos amidos em açúcares redutores, por meio de hidrólise ácida, fúngica, pela utilização de altas temperaturas sob pressão ou por enzimas. A hidrólise ácida oferece um meio eficaz, porém a recuperação do ácido não é eficiente, além de ocorrer a produção de hidróxido-metil furfural, que inibe o crescimento de leveduras prejudicando a fermentação alcoólica. A utilização de alta pressão pode prejudicar o efeito catalítico da alfa-amilase, causando uma desaceleração da taxa de conversão, portanto a hidrólise enzimática torna-se mais eficiente para produtos alimentícios (FARONE e CUZENS, 1996; KIM e HAMDY, 1985; BUCKOW et al., 2007).

Jieun et al. (2009) avaliaram a produção de etanol e butanol a partir de hidrolisados dos polissacarídeos do farelo de arroz integral e desengordurado. Foram estudados os processos de hidrólise ácida e enzimática, sendo que para a hidrólise ácida, os autores relataram a produção de 9,68 e 11,11 g·L⁻¹ de butanol, e 0,19 e 0,29 g·L⁻¹ de etanol, para o farelo de arroz integral e desengordurado, respectivamente, mas também salientam a formação de compostos tóxicos, tais como furanos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos. Com a hidrólise enzimática foram obtidos 3,82 e 6,25 g·L⁻¹ de butanol, e 0,19 e 0,32 g·L⁻¹ de etanol para o farelo de arroz integral e farelo de arroz desengordurado, respectivamente. Apesar da hidrólise enzimática apresentar

inferior conversão de açúcares em álcool, é a mais adequada para a produção de alimentos, já que não há relatos de formação de compostos tóxicos.

O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de hidrólise enzimática dos açúcares complexos presentes no farelo de arroz desengordurado, possibilitando posterior utilização do hidrolisado em processos fermentativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O farelo de arroz desengordurado (FAD) foi fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais - (IRGOVEL - Pelotas/RS) na forma de pellets, sendo submetido a moagem em moinho de facas (Solab, SL31) para aumentar a área de contato entre o substrato e a enzima. Posteriormente foi determinada a granulometria média de 70 mesh em agitador de peneiras (Betel, Caieiras, São Paulo) utilizando-se peneiras de 16 a 230 mesh, procedendo-se o congelamento a $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização dos testes.

As enzimas utilizadas na hidrólise enzimática foram, a α -amilase termoestável (TERMAMYL 2X, Novozymes A/S) e a amiloglucosidase (AMG 300L - Amyloglucosidase from *Aspergillus Niger* – Novozymes), cedidas pela empresa LNF – Latino Americana. A água utilizada em todos os ensaios foi a destilada ou ultrapura, e todos os reagentes apresentavam pureza analítica.

2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho avaliou-se o efeito da concentração de farelo de arroz desengordurado (FAD) (razão farelo/água ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)), concentração e tempo de atuação da α -amilase e da amiloglucosidase (AMG) sob a resposta de açúcares redutores, por meio de uma estratégia sequencial de planejamento experimental. Inicialmente foi aplicado um Planejamento Fracionário 2^{5-1} (3 pontos centrais, totalizando 19 ensaios), seguido de dois Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (2^2 , com 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 ensaios) objetivando-se a otimização do processo de sacarificação enzimática. A definição dos níveis das variáveis foi fundamentada conforme descrição de Chen e Chen (2009), e em valores utilizados

industrialmente para a hidrólise do amido de arroz, informados por empresas fornecedoras das enzimas. Paralelamente aos ensaios do planejamento, um “Tratamento Controle” (ausência de atuação enzimática) foi conduzido para efeitos de comparação,

Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fracionário 2⁵⁻¹.

Variáveis / Níveis	Farelo/água (g·L ⁻¹)	α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo)	AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo)	Tempo de atuação da α -amilase (h)	Tempo de atuação da AMG (h)
-1	100	8,0	8,0	1,50	3,00
0	150	9,0	9,0	1,75	4,00
+1	200	10,0	10,0	2,00	5,00

Os ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL, sendo adicionado o farelo de arroz desengordurado moído em água destilada nas proporções definidas no planejamento experimental (Tabela 1). Em seguida, realizou-se a adição da enzima α -amilase, no meio com pH ajustado a 6,0, sob temperatura de 90 °C, a qual foi mantida durante o tempo de atuação da enzima. Para a adição da AMG, a temperatura e o pH foram ajustados para 55 °C e 4,7, respectivamente e o tempo de atuação de ambas as enzimas foi determinado pelo planejamento (Tabela 1).

Para a realização dos ajustes do pH do meio, foram utilizadas soluções de ácido cítrico 1,3 mol·L⁻¹ e hidróxido de sódio 5 mol·L⁻¹. Os tempos de atuação e concentrações de ambas enzimas para cada ensaio foram definidos pelo planejamento experimental (Tabela 2). Todos os planejamentos foram realizados em banho termostático (Dubnoff SL 157, Solab Científica, São Paulo) com agitação fixada em 100 rpm, sendo realizada a análise de açúcares redutores no tempo final da hidrólise.

Todos os experimentos do Planejamento Fracionário e dos DCCRs foram realizados de forma aleatória e os dados foram tratados com o auxílio do software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, US). O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação R², e a significância estatística foi determinada pelo teste *F* (análise de variância - ANOVA).

2.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

A concentração de açúcares redutores (AR) liberados após o processo de hidrólise enzimática foi determinada em triplicata pela técnica de Somogyi (1945) e Nelson (1944), análise onde os glicídeos redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz a reação arsênio-molibídico a óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional a concentração de açúcares redutores existentes na amostra. O teor de açúcares redutores foi calculado utilizando-se uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicose ($180 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) com intervalo de 0 a $180\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO FRACIONÁRIO

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e as respostas de açúcares redutores, assim como os resultados obtidos para o “Tratamento Controle” está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis a serem estudadas no processo de hidrólise do farelo de arroz desengordurado.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	x_4^d	x_5^e	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^f
1	-1 (100)	-1 (8,0)	-1 (8,0)	-1 (1,50)	+1 (5)	18,71 ± 0,18
2	+1 (200)	-1 (8,0)	-1 (8,0)	-1 (1,50)	-1 (3)	44,30 ± 1,43
3	-1 (100)	+1 (10,0)	-1 (8,0)	-1 (1,50)	-1 (3)	19,28 ± 0,73
4	+1 (200)	+1 (10,0)	-1 (8,0)	-1 (1,50)	+1 (5)	38,94 ± 5,18
5	-1 (100)	-1 (8,0)	+1 (10,0)	-1 (1,50)	-1 (3)	22,28 ± 0,42
6	+1 (200)	-1 (8,0)	+1 (10,0)	-1 (1,50)	+1 (5)	40,60 ± 0,85
7	-1 (100)	+1 (10,0)	+1 (10,0)	-1 (1,50)	+1 (5)	20,29 ± 0,92
8	+1 (200)	+1 (10,0)	+1 (10,0)	-1 (1,50)	-1 (3)	44,06 ± 0,45
9	-1 (100)	-1 (8,0)	-1 (8,0)	+1 (2,00)	-1 (3)	13,95 ± 0,50
10	+1 (200)	-1 (8,0)	-1 (8,0)	+1 (2,00)	+1 (5)	32,58 ± 0,30
11	-1 (100)	+1 (10,0)	-1 (8,0)	+1 (2,00)	+1 (5)	20,97 ± 0,31
12	+1 (200)	+1 (10,0)	-1 (8,0)	+1 (2,00)	-1 (3)	35,93 ± 0,22
13	-1 (100)	-1 (8,0)	+1 (10,0)	+1 (2,00)	+1 (5)	16,82 ± 0,63
14	+1 (200)	-1 (8,0)	+1 (10,0)	+1 (2,00)	-1 (3)	44,27 ± 0,99
15	-1 (100)	+1 (10,0)	+1 (10,0)	+1 (2,00)	-1 (3)	29,25 ± 0,18
16	+1 (200)	+1 (10,0)	+1 (10,0)	+1 (2,00)	+1 (5)	52,46 ± 0,29
17	0 (150)	0 (9,0)	0 (9,0)	0 (1,75)	0 (4)	30,88 ± 0,97
18	0 (150)	0 (9,0)	0 (9,0)	0 (1,75)	0 (4)	31,93 ± 0,23
19	0 (150)	0 (9,0)	0 (9,0)	0 (1,75)	0 (4)	33,77 ± 0,45
Controle ^g	-	-	-	-	-	0,00

^a Razão Farelo/água ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); ^b concentração de α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^c Concentração de AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^d Tempo de atuação da α -amilase (h); ^e Tempo de atuação da AMG (h); ^f Açúcares Redutores ± erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações; ^g Tratamento Controle – determinação de açúcares redutores no farelo de arroz não tratado enzimaticamente, diluído na proporção de $75\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

O menor valor observado entre as respostas do planejamento foi de $13,95\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de A.R, no ensaio 9, onde apenas o tempo de atuação da α -amilase encontrava-se no nível superior dentro da faixa estudada, já a maior resposta obtida foi de $52,46\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de A.R, no ensaio 16, quando todas as variáveis apresentavam-se no nível superior da faixa estudada. No tratamento controle não foram detectados açúcares redutores, mostrando a necessidade da realização da hidrólise, para a utilização do FAD em meios fermentativos.

Analisando-se os resultados da Tabela 2 foi possível calcular os efeitos das cinco variáveis estudadas, os quais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito dos fatores estudados no planejamento fracionário 2^{5-1} sobre a concentração de A.R ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) do FAD.

Fatores	Efeito ^a	Erro Padrão	t (13)	p - valor
Média	31,36122	0,375023	83,62485	<0,0001*
x1	21,68254	0,817343	26,52808	0,0001*
x2	3,72730	0,817343	4,56026	0,0197*
x3	5,42824	0,817343	6,64132	0,0069*
x4	0,24237	0,817343	0,29654	0,7862
x5	-1,76889	0,817343	-2,16419	0,1191

^a Os efeitos são apresentados em g/L; * $p \leq 0,05$.

Pode-se verificar na Tabela 3 que as variáveis razão FAD/Água e a concentração de ambas enzimas apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a resposta estudada. Apenas o tempo de atuação da AMG apresentou efeito negativo sobre a resposta de AR, indicando que maiores concentrações de AR foram observadas com o menor tempo de atuação desta enzima, dentro da faixa estudada. Segundo Srivastava e Chosdol (2007), a velocidade das reações enzimáticas aumenta desde que o substrato esteja em excesso, justificando a necessidade de diminuir o tempo de atuação da AMG, para a faixa de concentração de FAD avaliada. Assim, para a sequência do estudo (planejamento completo), visando a otimização do processo de hidrólise, as faixas de estudo para o tempo de atuação das enzimas α -amilase e AMG foram fixadas levando em consideração o efeito apresentado por esta variável. Para a α -amilase, o tempo de atuação teve efeito positivo, portanto foi fixado no nível +1 do planejamento fracionário (2 horas); para a AMG, o tempo de atuação teve efeito negativo, sendo fixado no nível inferior (-1) do planejamento fracionário (3 horas).

As variáveis, concentração de FAD e de ambas enzimas apresentaram efeitos estatisticamente significativos e positivos sobre a resposta avaliada, portanto, a faixa de concentração das enzimas foi ampliada, sendo que a menor concentração de estudo do DCCR foi o dobro do ponto máximo de estudo do planejamento Fracionário ($20 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$), visando alcançar a otimização da hidrólise enzimática. Não foi possível aumentar a concentração de FAD, pois o meio já se apresentava saturado, o que dificultaria a atuação enzimática, sendo esta variável fixada no nível superior da faixa estudada no planejamento fracionário ($200 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.2 PRIMEIRO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Em função das considerações expostas no item 3.1, um DCCR foi realizado para a otimização da hidrólise enzimática, considerando como variáveis as concentrações de α -amilase e de AMG.

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a concentração de açúcares redutores está apresentada na Tabela 4. Para efeito de comparação, novamente foi realizado o “Tratamento Controle”.

Tabela 4 – Matriz do primeiro DCCR com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de AR.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c
1	-1 (21,5)	-1 (21,5)	43,85 \pm 1,8
2	1 (28,5)	-1 (21,5)	46,93 \pm 4,66
3	-1 (21,5)	1 (28,5)	42,61 \pm 1,81
4	1 (28,5)	1(28,5)	57,64 \pm 3,67
5	-1,44 (20,0)	0 (25,0)	44,26 \pm 2,62
6	1,44 (30,0)	0 (25,0)	48,37 \pm 2,56
7	0 (25,0)	-1,44 (20,0)	42,82 \pm 1,99
8	0 (25,0)	1,44 (30,0)	46,52 \pm 1,88
9	0 (25,0)	0 (25,0)	45,08 \pm 1,45
10	0 (25,0)	0 (25,0)	43,33 \pm 1,91
11	0 (25,0)	0 (25,0)	42,72 \pm 1,95
Controle ^d	-	-	0,00

^a concentração de α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^b Concentração de AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^c Açúcares Redutores \pm erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações; ^d Tratamento Controle – determinação de açúcares redutores no farelo de arroz não tratado enzimaticamente, diluído na proporção de 75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Pode-se observar na Tabela 4 que a concentração de AR variou de 42,61 a 57,64 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ensaios 3 e 4 do primeiro DCCR). Comparando-se os resultados do planejamento fracionário com os do primeiro DCCR, verifica-se um pequeno acréscimo nas maiores respostas obtidas (52,46 para 57,46 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo que ambos resultados foram obtidos quando as concentrações das duas enzimas encontravam-se no nível máximo, mostrando a necessidade das duas enzimas atuarem em maiores concentrações.

Analisando-se os resultados da Tabela 4, foi possível determinar os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. - Coeficientes de regressão para a resposta de AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para o primeiro DCCR

	Coef. de Regressão	Erro Padrão	t (8)	p – valor
Média	43,77	1,58	27,73	<0,0001*
x1 (L)	5,75	1,92	3,00	0,0300*
x1 (Q)	1,99	2,24	0,89	0,4157
x2 (L)	3,78	1,92	1,97	0,1057*
x2 (Q)	3,58	2,24	1,59	0,1718
x1 x x2	5,97	2,73	2,18	0,0809*

* $p \leq 0,1$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Todos os parâmetros foram considerados para a Análise de Variância (ANOVA), cujos resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – ANOVA do modelo quadrático para predição de A.R ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para o primeiro DCCR.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	152,46	5	30,49	4,08	0,074
Resíduos	37,41	5	7,48		
Total	189,87	10			

% variação explicada (R^2) = 80,30% $F_{5;5;0,10} = 3,45$
^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p=0,074$) e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 80,30\%$), considerando a variabilidade inerente aos processos enzimáticos (HAALAND, 1989), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 1.

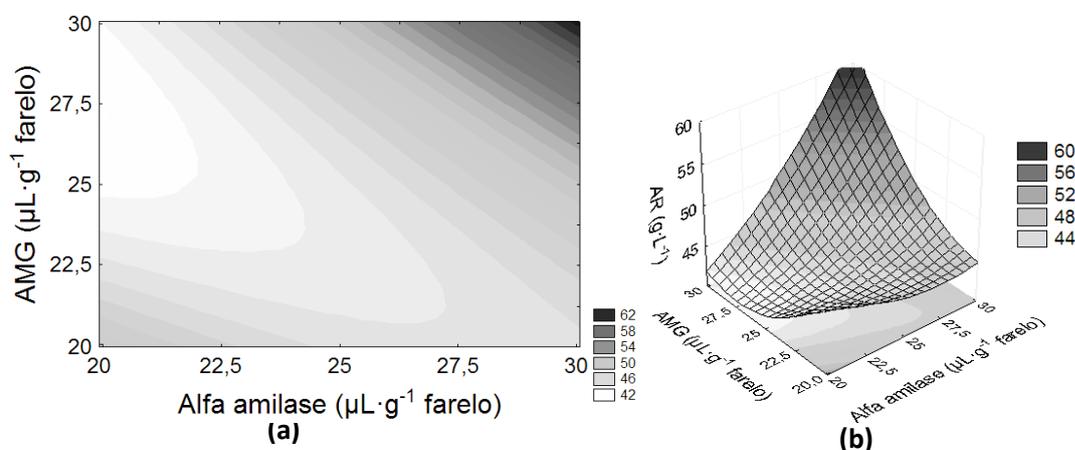


Figura 1 – Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a concentração de açúcares redutores (AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)) em função das concentrações de α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$) e de amiloglucosidade (AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$)).

Pode-se observar através da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 1) do primeiro DCCR, que nas faixas estudadas, as maiores concentrações de AR foram obtidas nos níveis superiores de concentração das enzimas, entretanto não foi possível alcançar a otimização da hidrólise.

Como o efeito das duas enzimas foi positivo e não foi possível obter a otimização da hidrólise enzimática, realizou-se o segundo DCCR sendo as faixas de ambas variáveis ajustadas para 30 a 50 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$.

3.3 SEGUNDO DCCR

Objetivando atingir a otimização da hidrólise enzimática do farelo de arroz desengordurado, realizou-se o segundo DCCR aumentando a faixa de estudo das concentrações das duas enzimas para 30 a 50 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$.

A matriz dos ensaios com os valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a concentração de açúcares redutores do segundo DCCR está apresentada na Tabela 7. Para efeito de comparação, novamente foi realizado o “Tratamento Controle”.

Tabela 7 – Matriz do segundo DCCR com níveis reais e codificados das variáveis e respostas de AR.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c
1	-1 (33)	-1 (33)	59,1±2,59
2	1 (47)	-1 (33)	32,9±0,96
3	-1 (33)	1 (47)	66,0±2,17
4	1 (47)	1 (47)	32,2±0,57
5	-1,44 (30)	0 (40)	59,9±0,77
6	1,44 (50)	0 (40)	34,4±0,54
7	0 (40)	-1,44 (30)	57,7±1,69
8	0 (40)	1,44 (50)	35,2±2,17
9	0 (40)	0 (40)	71,9±1,77
10	0 (40)	0 (40)	68,5±0,21
11	0 (40)	0 (40)	67,7±1,77
Controle ^d	-	-	0,00

^a concentração de α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^b Concentração de AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de farelo); ^c Açúcares Redutores \pm erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações; ^d Tratamento Controle – determinação de açúcares redutores no farelo de arroz não tratado enzimaticamente, diluído na proporção de 75 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Comparando-se os resultados obtidos no primeiro DCCR (Tabela 4) com os do segundo DCCR (Tabela 7), verifica-se um aumento na concentração de AR, sendo que as maiores respostas observadas no segundo DCCR, foram obtidas nas condições dos pontos centrais (67,7 a 71,9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e a menor resposta (32,2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi

encontrada no ensaio 4, onde as duas enzimas encontravam-se nos níveis +1, o que pode ser explicado pela necessidade da concentração de enzima e substrato para a determinação da taxa de uma reação enzimática, sendo que conforme a concentração de ambos é aumentada a taxa de reação aumenta, desde que o substrato encontra-se em excesso (SRIVASTAVA e CHOSDOL, 2007). Portanto, com o aumento das concentrações das enzimas o substrato deixou de estar em excesso e com isso a taxa da hidrólise diminuiu.

Os resultados obtidos na determinação dos coeficientes de regressão dos fatores avaliados encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. - Coeficientes de regressão para a resposta de AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) para o segundo DCCR

	Coef. de Regressão	Erro padrão	t (6)	P-valor
Média	69,80	4,71	14,83	< 0,0001*
x1 (L)	-11,50	2,89	-3,98	0,0105*
x1 (Q)	-11,52	3,44	-3,34	0,0205*
x2 (L)	-3,73	2,89	-1,29	0,2528
x2 (Q)	-11,17	3,44	-3,24	0,0229*
x1 x x2	-1,90	4,08	-0,46	0,6607

* $p \leq 0,05$; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Observa-se na Tabela 8, que as duas variáveis estudadas apresentaram efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) sobre a resposta de AR, sendo estes negativos, indicando que o acréscimo na concentração das enzimas dentro da faixa estudada ($30 - 50 \mu\text{L}\cdot\text{g farelo}^{-1}$), resultou na diminuição da concentração de AR, provavelmente devido a limitação na concentração de substrato.

Considerando-se os parâmetros significativos ($p \leq 0,05$) obteve-se a Equação 1, que representa o modelo quadrático da concentração de açúcares redutores em função das variáveis do segundo DCCR.

$$\text{A.R (g}\cdot\text{L}^{-1}) = 71,83 - 11,50 X_1 - 3,78 X_1^2 - 12,19 X_2^2 \quad [1]$$

Os resultados da análise de variância (ANOVA) estão apresentados na Tabela 9. Como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p=0,0268$), sendo maior que o F_{tabelado} , e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 87\%$), pode-se concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta (Figura 2).

Tabela 9 – ANOVA do modelo quadrático para predição de AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) do segundo DCCR

	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F cal	p-valor
Regressão	2297,17	5	459,43	6,91	0,0268
Resíduos	332,42	5	66,48		
Total	2629,59	10			

% variação explicada (R^2) = 87,36 $F_{5;5;0,05} = 5,05$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

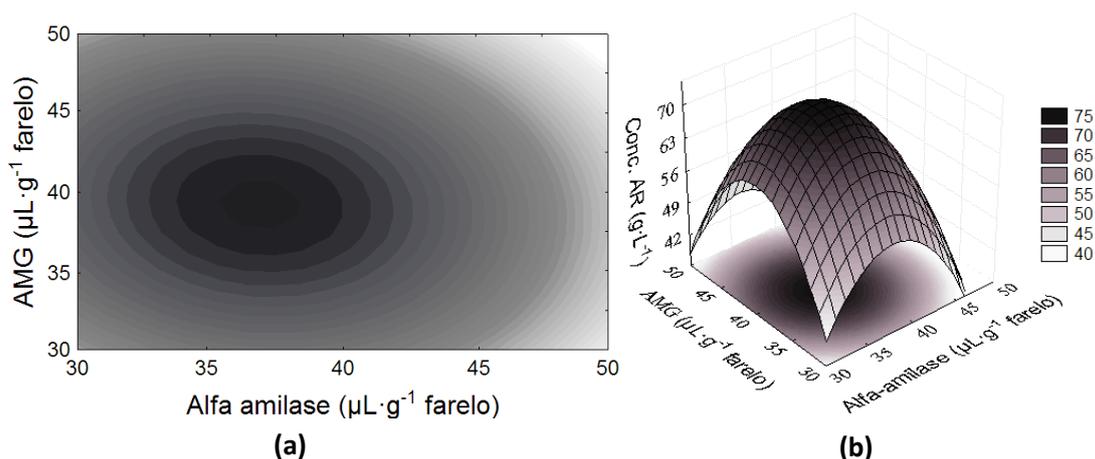


Figura 2 – Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a concentração de açúcares redutores (AR ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)) em função das concentrações de α -amilase ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$) e de amiloglucosidade (AMG ($\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$)).

Pode-se observar na Figura 2, que a região ótima para a hidrólise do farelo de arroz desengordurado encontra-se na faixa de concentração da α -amilase de 30 - 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ e no ponto central estudado para a concentração de AMG (40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$).

3.3.1 Validação das Condições otimizadas

A validação das condições otimizadas da hidrólise enzimática foi realizada em triplicata avaliando-se dois ensaios com diferentes concentrações de α -amilase (30 e 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo), sendo as demais variáveis fixadas em 200 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de FAD, 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo de AMG e tempo de atuação das enzimas em 2h para a α -amilase e 3h para a AMG. Os resultados obtidos foram de 68,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AR, no ensaio com 30 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo de α -amilase e 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ farelo de AMG e de 67,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de AR, no ensaio com 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ para ambas enzimas. Pelo teste de Tukey, esses dois tratamentos diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Portanto é possível afirmar que a otimização da

hidrólise foi obtida ao utilizar a concentração da α -amilase e da AMG em 30 e 40 $\mu\text{L}\cdot\text{g}$ farelo⁻¹, respectivamente.

Os resultados alcançados podem ser comparados com os obtidos no trabalho de Jieun et al. (2009) que avaliaram a produção de etanol e butanol a partir do farelo de arroz integral e desengordurado, sendo que primeiramente os substratos foram hidrolisados, pelos métodos químico, enzimático e a combinação entre eles. Na hidrólise enzimática as condições utilizadas foram 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de FAD, 15 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ de α -amilase com incubação a 30 °C durante 4 horas e após foram adicionadas 15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ β -amilase e 1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$ de amiloglicosidade, ambas com incubação a 37 °C durante 4 horas, sendo que os autores obtiveram como resultados de AR, no meio hidrolizado enzimaticamente, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Outra metodologia utilizada para hidrólise enzimática do farelo de arroz fresco foi a estudada por Devi, Vijayendra e Shamala (2012) que utilizaram 100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do substrato em água e α -amilase (5000 U, Anilozyme, Anil Indústrias amido, Ahmedabad, India) a 80 °C durante 30 min e amiloglicosidase (5000 U) a 50 °C e pH 5,5 durante 4 horas e arrefecida a 40 °C, sendo que o resultado obtido foi de 26,4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares redutores.

Tendo em vista os resultados obtidos nos estudos citados pode-se avaliar que os este trabalho apresenta um avanço na obtenção de açúcares redutores do farelo de arroz desengordurado por meio de hidrolise enzimática, sendo que mais de 34% do substrato foi convertido em AR, possibilitando a utilização desse substrato em processos fermentativos.

4. CONCLUSÕES

A otimização do processo de hidrólise enzimática do farelo de arroz desengordurado, empregando as enzimas α -amilase e AMG visando a obtenção de açúcares redutores, foi possível quando utilizada a concentração de $30 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de α -amilase e $40 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de amiloglucosidase.

Devido a concentração de açúcares redutores obtidos neste trabalho, torna-se possível potencializar a utilização do FAD em processos fermentativos como a produção de vinagres e/ou bioetanol.

5. REFERÊNCIAS

AMISSAH, N.G.J.; ELLIS, O.W.; ODURO, I.; MANFUL, T.J. Nutrient composition of bran from new ricevarieties under study in Ghana. **Food Control**, v.24,p. 21-24, 2003.

BUCKOW,R.; WEISS, U.; HEINZ,V.; KNORR, D. Stability and catalytic activity of alpha-amylase from barley malt at different pressure–temperature conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, n.1, p. 1-11, 2007.

CHEN, C.; CHEN, F. Study on the conditions to brew rice vinegar with high content of γ -amino butyric acid by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 334-340, 2009.

CHEN, H., ZHANG, M., QU, Z., XIE, B. Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide conjugates from green tea (*Camellia Sinensis*). **Food Chemistry**, v.106, p.559–563, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento**. Brasília, 2014, 30p.

DEVI, E.S.; VIJAYENDRA, S.V.N.; SHAMALA, T.R. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra- and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p.80-84, 2012.

FARONE, W., CUZENS, J. Method of producing sugars using strong acid hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic materials. **US Patent 5,562,777**. Arquivada March 26, 1993. Emitida October 8, 1996.

HAALAND, P.D. Experimental design in biotechnology. N. Y. **Marc. Dek. Inc.**, v. 1, p. 243, 1989.

JIEUN, L.; SEO, E.; KWEON, D.; PARK, K.; JIN, Y. Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n.5, p. 482–490, 2009.

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The Rice Grain And Its Gross Compos. In: JULIANO, B.O. (Ed.) **Rice: chemi. and tec.** Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985.

KAHLON, S.T. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Psysiological Benefits. In. CHO, S.S E SAMUEL, P. Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits , 1ed, **CRC Press Taylor& Francis Group**, 2009. cap.14. 305-307p

KIM,K.; HAMDY, M.K. Acid hydrolysis of sweet-potato for ethanol production. **Biotechnology and Bioengineering**,v. 27, n.3.p. 316–320, 1985.

LUH, Bor.S. **Rice Utilization**. 2 ed, v2,1980.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

O'DELL, B. L.; DeBOLAND, A.; KOIRTYOHANN, S. R. Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.20, n.3, p.718-723, 1972.

SOMOGYI, M.A.A New Reagent for the Determination of Sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SRIVASTAVA, T e CHOSDOL, K. Clinical Biochemistry: Clinical Enzymology And Its Applications. **Ansari Nagar**, p.1-5, 2007.

TAKENAKA, S., e ITOYAMA, Y. Rice bran hemicellulose increases the peripheral blood lymphocytes in rats. **Life Science**, v.52, p.9–12, 1993.

TSENG, Y. H., YANG, J. H., e MAU, J. L. Antioxidant properties of polysaccharides from Ganoderma tsugae. **Food Chemistry**, v.107, p.732–738, 2008.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Review**, v.13, p.523–533, 2000.

WANG,L; ZHANG, H; ZHANG, X; CHEN, Z. Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2a with anti-complementary activity from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v. 110, n.1, p.150-155, 2008.

CAPÍTULO 3

ESTUDO DA ETAPA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DA PRODUÇÃO DE VINAGRE DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

1. INTRODUÇÃO

O vinagre é um alimento para consumo humano produzido por duas fermentações sucessivas, alcoólica e acética, contendo apenas matérias-primas com amidos e/ou açúcares (SOLIERI e GIUDICI, 2009).

Na fermentação alcoólica é essencial que o substrato utilizado apresente açúcares fermentescíveis, principalmente glicose e frutose, para que seja possível a transformação anaeróbia de açúcares em etanol e dióxido de carbono, produzindo líquidos ligeiramente alcoólicos, denominados “vinho”. Este processo é realizado por leveduras e também por algumas bactérias (ZAMOR, 2009). A mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, pois são cepas tolerantes ao álcool (PRETORIUS, 2000).

Um dos importantes subprodutos obtidos no processamento do arroz é o farelo de arroz desengordurado (FAD). Segundo as estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de março de 2013/14 o Brasil produziu aproximadamente 12,8 milhões de toneladas de arroz, apresentando um acréscimo de 8% em relação à safra de 2012/13. O processamento do arroz branco resulta em alguns subprodutos como a casca, o farelo e grãos quebrados, sendo que o farelo corresponde a 8,5 - 14,8% do arroz integral, sendo constituído pelo endosperma, casca e grãos quebrados, que são separados por peneiramento (JULIANO, BECHTEL, 1985; LUH, 1980).

Em estudo realizado por Amissah et al. (2003) observou-se que a concentração de carboidratos presentes em 16 variedades de farelo de arroz variaram de 26 a 46%, sendo que conforme analisado por Wang, et al. (2008) o consumo dos polissacarídeos e derivados modificados do farelo de arroz desengordurado apresentam diversos benefícios à saúde, entre eles, a estimulação da resposta imune das células, favorecendo a atividade antitumoral, além disso trata-se de um substrato com altas concentração de fitinas (9,5 a 14,5%), matéria-prima fundamental para a obtenção de ácido fítico e fitatos que apresentam capacidade antioxidante (SOARES *et al.*, 2004;

STODOLAK *et al.*, 2007; HARBACH *et al.*, 2007). Entretanto a conservação do farelo de arroz “in natura” torna-se problemática, pois o mesmo contém a enzima lipase, responsável pelo processo de rancificação, tornando-o não comestível (KAHLON, 2009), por isso torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas para um melhor aproveitamento dos nutrientes presentes neste resíduo agroindustrial, sendo um deles a aplicação em processos fermentativos.

Neste âmbito, os autores Jieun *et al.* (2009) avaliaram a produção de etanol e butanol a partir de polissacarídeos do farelo de arroz integral e desengordurado, os quais foram primeiramente submetidos à hidrólise enzimática e posterior fermentação alcoólica, obtendo como resultados 3,82 e 6,25 g·L⁻¹ de butanol, e 0,19 e 0,29 g·L⁻¹ de etanol para o farelo de arroz integral e desengordurado, respectivamente.

Os autores Watanabe *et al.* (2009), avaliaram a produção de bioetanol a partir da fermentação alcoólica da água utilizada na lavagem do arroz e do farelo de arroz, sendo alcançado um rendimento de 1,2% de etanol. Conforme pesquisas realizadas pelos autores, a proteína e os lipídios formam uma capa ao redor dos grânulos de amido, o que pode diminuir a atuação da levedura, por isso estudaram a adição das enzimas proteases e lipases nas concentrações de 0 a 300 mg·100mL⁻¹ de meio. Desta forma o rendimento máximo de etanol foi de 3,0 - 3,4%, obtido pela adição de concentrações superiores a 30 mg·100 ml⁻¹ de protease e 3 mg·100 mL⁻¹ de lipase. Entretanto, neste trabalho observou-se que os grânulos de amido formam agregados e objetivando aumentar a área de exposição do amido, os autores avaliaram a ação do tratamento ultrassônico nos tempos de 1 a 4 min; os resultados obtidos indicaram que após 3 minutos de exposição o rendimento em etanol na fermentação alcoólica foi de 6,2% de etanol, concentração 5 vezes superior a obtida inicialmente.

O objetivo deste trabalho foi otimizar a etapa de fermentação alcóolica utilizando como substrato o farelo de arroz desengordurado hidrolisado, para posterior produção de vinagre.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O farelo de arroz desengordurado (FAD), fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais - (IRGOVEL - Pelotas/RS) foi moído em moinho de facas (Solab, SL31) e congelado a temperatura de -12 °C até a realização dos testes, onde foi submetido à hidrólise enzimática pela ação das enzimas α -amilase termoestável (TERMAMYL 2X, Novozymes A/S) e da amiloglicosidase (AMG 300L - Amyloglicosidase from *Aspergillus Niger* – Novozymes), cedidas pela empresa LNF – Latino Americana.

Após a hidrólise, o meio foi centrifugado a 6000 rpm durante 5 min em centrífuga refrigerada (CIENITEC, CT-5000R, Piracicaba, São Paulo). Em seguida, realizou-se a inoculação com *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial liofilizado) o qual foi adquirido no mercado local, por meio de uma suspensão do fermento comercial liofilizado em proporções definidas no item 2.2.

2.2 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Na etapa de estudo da fermentação alcoólica, foram aplicados dois Delineamentos Compostos Central Rotacional (DCCR) consecutivos, precedidos de testes preliminares que foram realizados para a definição das variáveis importantes e seus respectivos níveis de estudo.

2.2.1 Avaliação da Influência da concentração de inóculo, temperatura e pH no rendimento da fermentação alcoólica.

Para a definição da faixa de estudo da concentração de inóculo do primeiro DCCR, realizou-se um teste preliminar, avaliando-se a concentração de inóculo na faixa de 0,5 a 2,0%(p/v), sob agitação e em regime estacionário, a fim de avaliar se a agitação poderia auxiliar no rendimento em etanol com a homogeneização do meio, ou interferir negativamente, devido a difusão de oxigênio. Grande parte dos trabalhos

científicos, tais como os de Sossou et al. (2009); Plessi (2003); Raji et al. (2012) entre outros, utilizam o regime estacionário, entretanto Suman (2012) e Horiuchia et al. (1999) utilizaram a agitação de 100 rpm e 200 rpm, respectivamente, e relataram acréscimos no rendimento em etanol nestas condições.

Em todos os ensaios, deste estudo, utilizou-se um meio primeiramente hidrolisado conforme condições otimizadas em estudo anterior (200 g·L⁻¹ de FAD, 30 µL·g⁻¹ e α-amilase e 40µL·g⁻¹ de amiloglucosidade, com os tempos de atuação das mesmas em 2 e 3 horas, respectivamente), para posterior aplicação na etapa de fermentação alcoólica.

Os ensaios realizados neste teste e suas respectivas condições avaliadas encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Ensaios preliminares ao Primeiro DCCR

Ensaios ^a	Agitação	Inóculo (%) (p/v)
1	100 rpm	0,5
2	Sem agitação	0,5
3	100 rpm	2
4	Sem agitação	2
5	100 rpm	5
6	Sem agitação	5

^a Para todos os ensaios foram utilizados a temperatura: 25 °C e o pH:5,0

As respostas avaliadas foram a concentração de açúcares redutores (AR), massa seca (g.L⁻¹), etanol (%) (p/v) e pH, sendo todos os ensaios realizados em duplicata, em Erlenmeyers de 500 mL, com 250 mL de meio hidrolisado (centrifugado e com o pH ajustado em 5,0). A incubação foi realizada em Shaker de agitação orbital (B Braun Biotech Internacional, modelo Certomat Bs-1) sob temperatura de 25 °C. A determinação da concentração de células do inóculo foi realizada pela contagem em Câmara de Neubauer, para garantir a população mínima de 10⁶ células/mL.

Com os resultados obtidos neste teste optou-se em realizar um DCCR (2³ com 6 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 17 ensaios), em estado estacionário, a fim garantir condições microaerófilas no meio, para avaliar os efeitos da concentração de inóculo, pH e da temperatura do meio de cultivo (mosto obtido na etapa de hidrólise do farelo de arroz desengordurado), sobre a resposta de concentração de etanol (%) (p/v).

Os ensaios do DCCR foram conduzidos em Erlenmeyers de 500 mL, com 250 mL de meio, os quais foram incubados em Shaker de agitação orbital (SOLAB, Modelo SL 221, Piracicaba, São Paulo) sob condições estacionárias, durante 72 horas, sendo o meio primeiramente hidrolisado conforme condições otimizadas em estudo anterior

(200 g·L⁻¹ de FAD, 30 µL·g⁻¹ de α-amilase e 40µL·g⁻¹ de amiloglucosidade, com os tempos de atuação das mesmas em 2 e 3 horas, respectivamente). Amostras do meio fermentado foram coletadas a cada 12 horas para determinação de etanol; já para o acompanhamento da concentração de massa seca, açúcares redutores e pH, as amostras foram coletadas a cada 6 horas. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro DCCR estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no primeiro DCCR 2³.

Variáveis / Níveis	Inóculo (%) (p/v)	T (°C)	pH
-1,68	0,5	25,0	4,0
-1,0	1,4	26,0	4,4
0	2,8	27,5	5,0
+1	4,1	29,0	5,6
+1,68	5,0	30,0	6,0

2.2.2 Otimização da produção de etanol

Objetivando aumentar o rendimento de etanol na fermentação alcoólica, com base nos resultados observados no Primeiro DCCR, realizou-se um segundo teste para avaliar o efeito da exposição da suspensão de farelo de arroz a um tratamento ultrassônico e enzimático com protease (Alcalase). Watanabe et al. (2009) mostraram que as proteínas e os lipídios do farelo de arroz formam uma capa protetora ao redor dos grânulos de amido, o que dificulta a atuação das enzimas na etapa de hidrólise e das leveduras na fermentação alcoólica. Estudos realizados por diversos autores (Watanabe et al., 2009; Yao et al., 2012; Lei, Zhao e Zhao, 2013; Lei et al., 2013; Perez-Carillo et al., 2012 e Johnston e McAloon, 2014) demonstraram que a adição de protease aumenta a área de exposição dos grânulos do amido, resultando também na liberação de peptídeos que são utilizados como nutrientes pela levedura, auxiliando na tolerância da mesma ao etanol, além de diminuir o tempo de fermentação e aumentar a concentração final de massa seca e de etanol.

Neste sentido, avaliou-se o efeito da exposição da suspensão de farelo de arroz a um tratamento ultrassônico com posterior reação enzimática visando à remoção de proteínas. As variáveis avaliadas neste tratamento encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis avaliadas no segundo teste preliminar

Ensaio*		
1	tratamento ultrassônico	Alcalase
2	-	Alcalase

*Cada ensaio foi realizado em triplicata

Este tratamento foi realizado anteriormente ao processo de hidrólise enzimática dos carboidratos com o objetivo de primeiramente aumentar a área de exposição dos grânulos de amido, e dessa forma avaliar o possível acréscimo na liberação de açúcares redutores no processo de atuação das enzimas amilolíticas (sacarificação enzimática)

No tratamento ultrassônico, utilizou-se um banho ultrassônico (Ultra-Bohn, Elma, E 30H), sendo colocados 3 Erlenmeyers por vez de forma que todo o meio fosse coberto pela água do banho. Os parâmetros foram fixados em frequência de 37 kHz, potência de 100%, temperatura em 30 °C e tempo de 5 minutos. Após o tratamento ultrassônico, o pH da suspensão de farelo de arroz foi ajustado para 6,5 e a temperatura a 60 °C para adição de 15 $\mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ da enzima Alcalase (2.4 L Food Grade, cedida pela empresa LNF – Latino Americana), visando a remoção enzimática das proteínas. A atuação da enzima foi mantida por 2 h, seguindo o fluxograma apresentado na Figura 1.

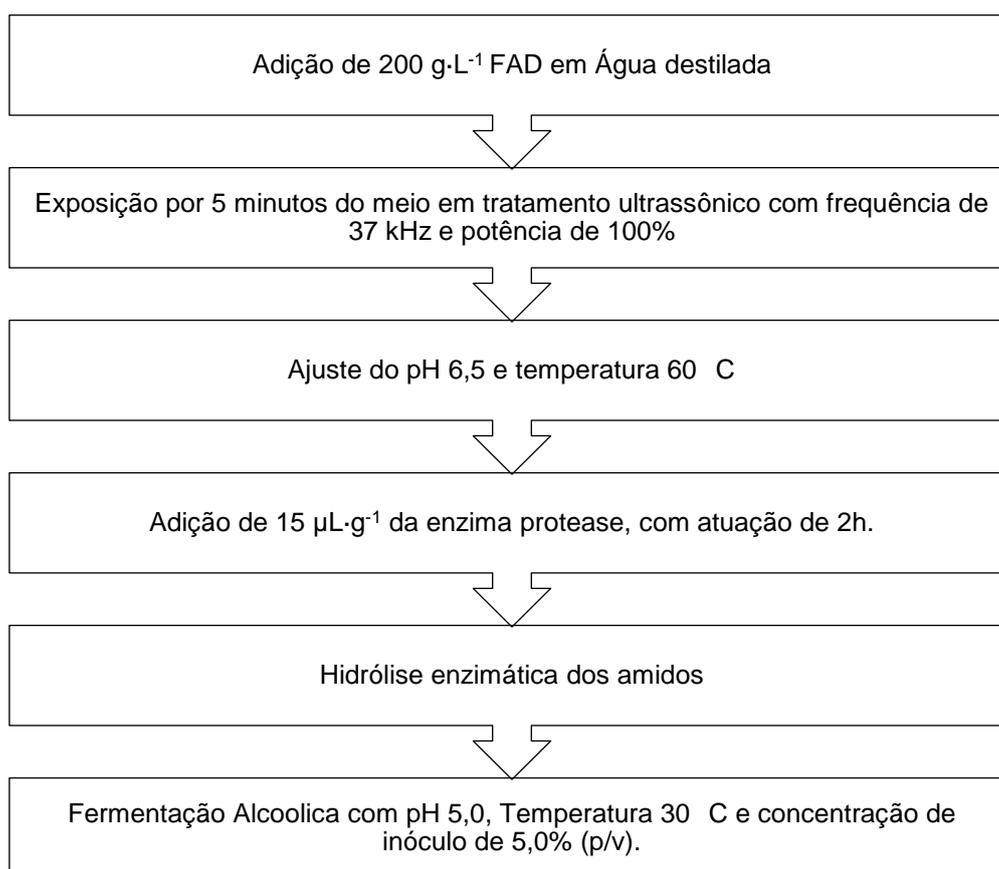


Figura 1 – Fluxograma do processo utilizado no segundo teste preliminar para o processo de hidrólise enzimática da suspensão de farelo de arroz e fermentação alcoólica.

Após a hidrólise enzimática realizou-se a fermentação alcoólica, onde a definição da temperatura, pH e concentração de inóculo baseou-se nos resultados obtidos no primeiro DCCR, sendo os mesmos fixados em 30 °C, 5,0 e 5,0%, respectivamente, esta etapa foi realizada em um Shaker de agitação orbital (B Braun Biotech Internacional, modelo Certomat Bs-1), sendo coletadas amostras de meio a cada 12 h para a determinação de etanol e a cada 6 h para acompanhamento do pH e da massa seca.

Uma vez avaliados os resultados do segundo teste preliminar, realizou-se a aplicação do segundo DCCR (2^2 , 4 pontos axiais e 3 centrais, total de 11 ensaios) com o ajuste nas faixas das variáveis significativas do primeiro DCCR (temperatura e inóculo), aplicando o tratamento enzimático com a protease sem a exposição ao tratamento ultrassônico. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo DCCR estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no segundo DCCR 2^2 .

Variáveis / Níveis	T (°C)	Inóculo (%) (p/v)
-1,41	28,0	1,00
-1,0	29,0	1,85
0	31,5	4,00
+1,0	34,0	6,15
+1,41	35,0	7,00

Da mesma forma que para o primeiro DCCR, os ensaios do segundo DCCR foram conduzidos em Erlenmeyers de 500 mL, com 250 mL de meio, os quais foram incubados em Shaker de agitação orbital sob condições estacionárias, durante 72 h. Amostras do meio fermentado foram coletadas a cada 12 h para determinação de etanol; e para o acompanhamento da concentração de massa seca, açúcares redutores e pH, as amostras foram coletadas a cada 6 h.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada em triplicata, baseando-se na quantidade de açúcares fermentescíveis liberados durante todo o processo de hidrólise enzimática, pela técnica de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Todos os resultados foram expressos em gramas de açúcares por litro de meio hidrolisado.

2.3.2 Determinação de etanol

A concentração de etanol foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Ultra-alta pressão (UPLC) (DIONEX, Modelo U3000) equipado com detectores de Índice de Refração, utilizando a metodologia proposta por Aguiar et al. (2005), com algumas modificações, sendo as amostras filtradas em membrana de nylon Millipore 0,45 μm e injetadas em coluna Rezex® ROA-Organic Acid H+ (8%). A fase móvel foi constituída de H_2SO_4 5 mmolL^{-1} mantida sob vazão de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Manteve-se a temperatura do sistema a 30 °C e a detecção foi realizada por índice de refração, sendo o volume de amostra injetado de 20 μL . Para cálculo das concentrações de etanol das amostras, foi realizada uma curva padrão com 8 pontos (diluições de 0 a 10%), utilizando um padrão de etanol 99,9% (Sigma).

2.3.3 Determinação de pH

O pH foi determinado em triplicata, pelo método potenciométrico de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (Adolfo Lutz, 1985), utilizando um pHmetro digital de bancada (Alphalab, modelo Pa-200).

2.3.4 Determinação da Massa Seca (biomassa celular)

A concentração da Massa Seca foi analisada em triplicata por meio da leitura da densidade ótica (DO) a 600 nm de uma alíquota do meio de cultivo, utilizando-se curvas de calibração de densidade ótica versus massa seca. Para a obtenção das curvas de calibração, coletou-se uma alíquota do meio de cultivo (10 mL), ao final do processo fermentativo, e as células foram lavadas três vezes com água destilada, por centrifugação (3000 \times g, 5 minutos) em centrífuga refrigerada (CIENITEC, CT-5000R, Piracicaba, São Paulo). O precipitado foi submetido à secagem em estufa a vácuo (50 °C) até peso constante. Através da relação com o volume de meio coletado, determinou-se a concentração total de massa seca. Paralelamente, diluições apropriadas do meio de cultivo foram realizadas e a densidade ótica medida a 600 nm. A partir da massa seca total foram determinadas indiretamente as concentrações de massa seca para cada diluição, construindo-se a curva de calibração.

2.3.5 Cálculos de rendimento e parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

O rendimento (R) da fermentação alcoólica, expresso em %, fornece em valores quantitativos a eficácia com que as leveduras convertem sacarose em etanol, sendo o mesmo calculado utilizando-se a Equação 1 (LOPES e SILVA, 2006):

$$R = \frac{P_{\text{TEO}}}{P_{\text{EXP}}} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

P_{EXP} = concentração (gL^{-1}) de etanol experimental,

P_{TEO} = concentração (gL^{-1}) de etanol máxima teórica (estequiométrica), e

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em biomassa ($Y_{X/S}$) e da biomassa em produto ($Y_{X/P}$) foram calculados por meio das Equações 2, 3 e 4 (ALMEIDA et al., 2006; STROPPIA et al., 2009):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação (2)}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{Equação (3)}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P_f - P_0}{X_f - X_0} \quad \text{Equação (4)}$$

Em que:

P_0 e P_f = concentrações (gL^{-1}) inicial e final do etanol;

X_0 e X_f = as concentrações (gL^{-1}) inicial e final de células, e

S_0 e S_f = as concentrações (gL^{-1}) inicial e final de sacarose, respectivamente.

2.3.6 Tratamento estatístico dos dados

Todos os ensaios dos planejamentos (DCCRs) foram conduzidos de forma aleatória e os dados tratados com auxílio do software Statistica® 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, US). O ajuste da equação do modelo de segunda ordem foi expresso pelo coeficiente de determinação R^2 , e a significância estatística foi determinada pelo teste F (análise de variância – ANOVA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO, TEMPERATURA E pH NO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

3.1.1 Teste Preliminar

A contagem da população de *Saccharomyces cerevisiae* foi de $6,25 \times 10^7$, $6,45 \times 10^8$ e $1,65 \times 10^9$ células/mL, para as concentrações de 0,5, 2,0 e 5 (%) (p/v) de inóculo, respectivamente, indicando que o uso destas concentrações seriam suficientes para garantir a população mínima de 10^6 células/mL no início do processo de fermentação alcoólico, concentração utilizada na produção de vinagre de morango, Ubeda et al. (2012) e de vinagre de kiwi, Bortollini, et al. (2001). Os resultados obtidos após 72 h de fermentação encontram-se na Tabela 5. Pode-se observar que a concentração mínima de etanol obtida foi de 1,54% (p/v) no ensaio 5 (5% de inóculo, com agitação) e a máxima foi de 1,89% (p/v) no ensaio 4 (2% de inóculo, sem agitação).

Tabela 5 – Resultados do primeiro teste preliminar após 72h de fermentação.

Ensaio	pH	Massa seca (g·L ⁻¹)	Etanol (%) p/v*	A.R residual (g·L ⁻¹)
1 ^a	4,94±0,007	13,99±1,24	1,59±0,14 ^a	2,55±0,48
2 ^b	4,88±0,014	5,78±0,38	1,84±0,02 ^a	1,66±0,47
3 ^c	4,89±0,007	20,07±1,52	1,72±0,45 ^a	2,09±0,26
4 ^d	4,89±0,007	20,22±1,80	1,89±0,48 ^a	1,88±0,51
5 ^e	4,80±0,021	25,60±1,39	1,54±0,07 ^a	2,03±0,59
6 ^f	4,89±0,014	20,50±4,19	1,38±0,17 ^a	1,91±0,90

^a(agitação de 100 rpm e 0,5% de inóculo); ^b(estado estacionário e 0,5% de inóculo); ^c(agitação de 100 rpm e 2,0% de inóculo); ^d(estado estacionário e 2,0% de inóculo); ^e(agitação de 100 rpm e 5,0% de inóculo); ^f(estado estacionário e 5,0% de inóculo) *Médias marcadas com letras semelhantes na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey;

Na Figura 2 é possível visualizar os resultados de etanol durante as 72h de fermentação alcóolica dos 6 ensaios. Analisando os resultados de etanol, apresentados na Tabela 5 e na Figura 2 é possível comparar o rendimento de etanol entre os ensaios com as mesmas concentrações de inóculo (1 com 2; 3 com 4 e 5 com 6), observando-se que a agitação apresentou efeito positivo apenas para 5% (p/v) de inóculo (ensaios 5 e 6), mostrando que com maiores concentrações de inóculo a

agitação pode contribuir na homogeneização do meio e conseqüentemente, melhorar a interação entre o substrato e as células de levedura, resultando em maiores rendimentos de etanol. Entretanto, por meio do Teste de Tukey (95% de confiança), verificou-se que as médias obtidas para o rendimento em etanol são estatisticamente semelhantes entre si (Tabela 5).

Pode-se observar na Figura 2, que a maior produção de etanol aconteceu até 36h, sendo que após 48h de fermentação alcoólica, apenas os ensaios 1 e 4, mantiveram um acréscimo na concentração de etanol, os demais ensaios apresentaram um pequeno declínio, com posterior aumento. Desta forma optou-se em realizar os ensaios do primeiro DCCR, mantendo a fermentação por 72h, com coletas a cada 12h para análise de etanol e o processo em regime estacionário, sendo avaliada a concentração de inóculo juntamente com as variáveis, temperatura e pH.

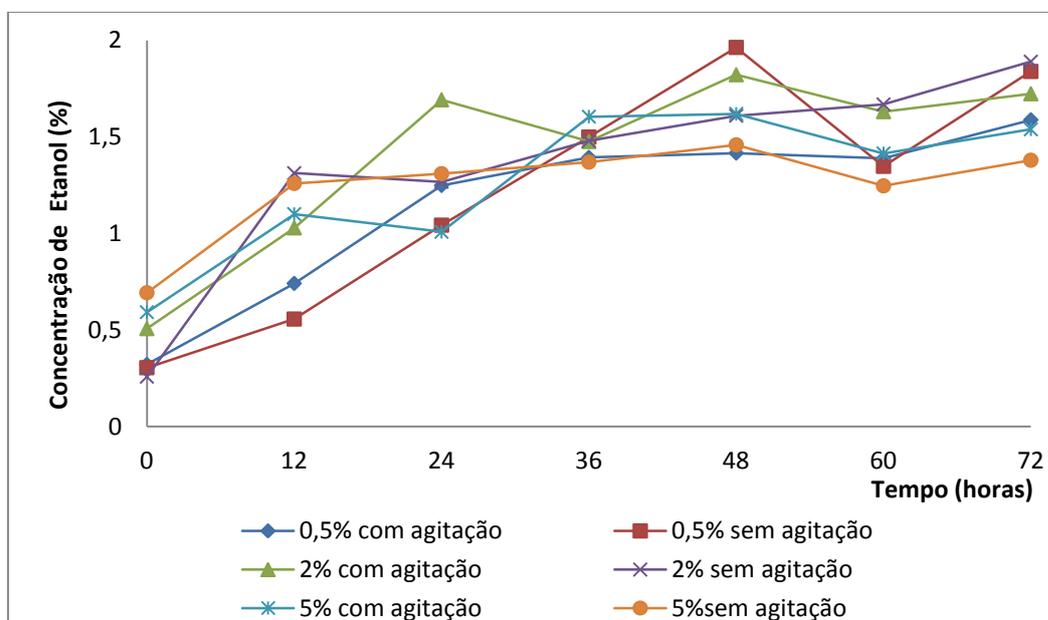


Figura 2 – Rendimento de Etanol em função do tempo para os ensaios do primeiro teste preliminar.

Para a resposta de concentração de massa seca (Figura 3), os resultados foram proporcionais ao inóculo inicial, sendo que a agitação influenciou de forma positiva na concentração final, variando de 19,0 a 75,6 g/L para 0,5 e 5% de inóculo, respectivamente, no processo conduzido sob agitação, e de 11,0 a 70,5 g/L para 0,5 e 5% de inóculo, no processo sem agitação.

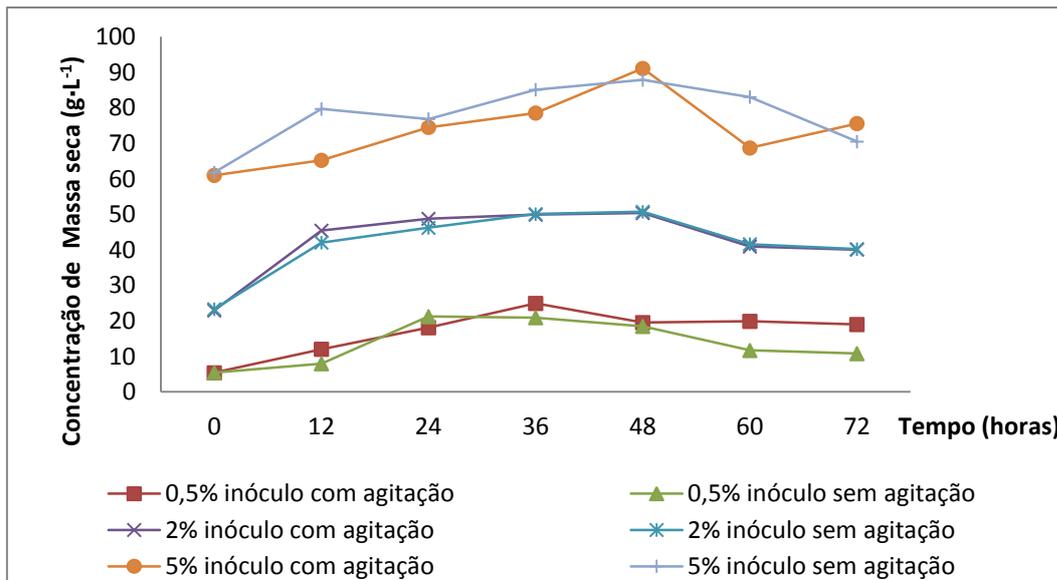


Figura 3 – Concentração da massa seca em função do tempo para os ensaios do primeiro teste preliminar

Na avaliação dos resultados de consumo de açúcares redutores (Figura 4), observou-se que somente o meio com 0,5% de inóculo teve uma queda inicial menos acentuada do substrato, entretanto, após 36h, se igualou aos demais testes avaliados. Verificou-se um rápido consumo dos açúcares redutores, em aproximadamente 24h, tempo que correspondeu com a estabilização da massa seca.

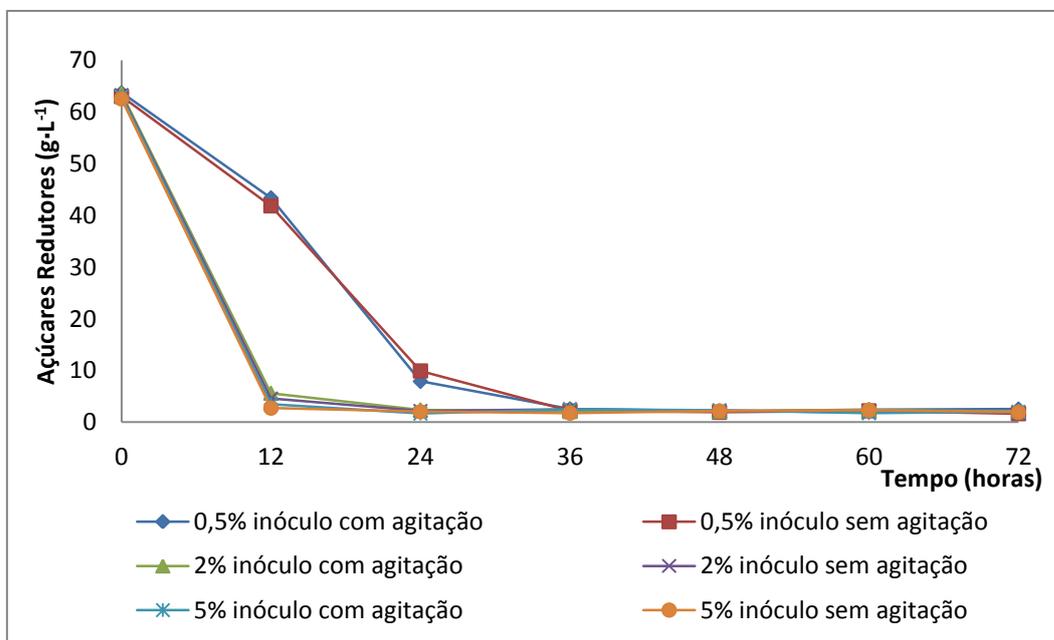


Figura 4 – Concentração de açúcares redutores em função do tempo de fermentação para os ensaios do primeiro teste preliminar

3.1.2 Primeiro Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Com os resultados obtidos no primeiro teste preliminar, decidiu-se realizar os ensaios do primeiro DCCR avaliando as variáveis concentração de inóculo, pH e temperatura. A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e as respostas de açúcares redutores, concentração de massa seca e de etanol, obtidas após 72h da fermentação, está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Matriz do planejamento DCCR com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no processo de fermentação alcoólica do farelo de arroz desengordurado.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	x_3^c	Massa seca ($g \cdot L^{-1}$) ^d	A.R ($g \cdot L^{-1}$) ^d	Etanol (%) p/v
1	-1 (26)	-1 (4,4)	-1 (1,4)	34,26 ± 2,09	0,46 ± 0,21	1,60
2	+1 (29)	-1 (4,4)	-1 (1,4)	32,90 ± 4,08	0,22 ± 0,08	1,86
3	-1 (26)	+1 (5,6)	-1 (1,4)	31,74 ± 4,33	0,31 ± 0,15	1,49
4	+1 (29)	+1 (5,6)	-1 (1,4)	35,18 ± 0,57	0,16 ± 0,12	1,55
5	-1 (26)	-1 (4,4)	+1 (4,1)	74,48 ± 6,87	0,53 ± 0,42	1,70
6	+1 (29)	-1 (4,4)	+1 (4,1)	50,45 ± 4,30	0,15 ± 0,08	1,75
7	-1 (26)	+1 (5,6)	+1 (4,1)	66,16 ± 10,27	0,27 ± 0,20	1,92
8	+1 (29)	+1 (5,6)	+1 (4,1)	56,45 ± 3,68	0,24 ± 0,11	1,95
9	-1,68 (25)	0 (5,0)	0 (2,8)	50,31 ± 2,87	0,23 ± 0,15	1,74
10	+1,68 (30)	0 (5,0)	0 (2,8)	53,03 ± 0,64	0,31 ± 0,23	2,10
11	0 (27,5)	-1,68 (4,0)	0 (2,8)	54,84 ± 1,05	0,55 ± 0,21	1,70
12	0 (27,5)	+1,68 (6,0)	0 (2,8)	62,00 ± 5,23	0,35 ± 0,23	1,71
13	0 (27,5)	0 (5,0)	-1,68 (0,5)	21,69 ± 0,96	0,33 ± 0,02	1,78
14	0 (27,5)	0 (5,0)	+1,68 (5,0)	92,45 ± 9,11	0,57 ± 0,08	1,74
15	0 (27,5)	0 (5,0)	0 (2,8)	51,32 ± 2,31	0,28 ± 0,16	1,64
16	0 (27,5)	0 (5,0)	0 (2,8)	46,98 ± 0,94	0,34 ± 0,18	1,64
17	0 (27,5)	0 (5,0)	0 (2,8)	55,53 ± 4,83	0,29 ± 0,03	1,62

^a Temperatura; ^b pH; ^c Concentração de inóculo (%)(p/v); ^d Resultado ± erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações.

Avaliando-se os resultados obtidos, observa-se que a concentração de massa seca variou conforme a adição inicial de inóculo, já o pH, apresentou resultados finais próximos a 5,0, variando de 4,77 a 4,97, exceto quando esta variável encontrava-se no menor nível estudado, onde o resultado obtido foi inferior a 4,0. Para a concentração de AR, todos os valores ficaram abaixo de 0,6 $g \cdot L^{-1}$, sendo que inicialmente esse valor era aproximadamente 70 $g \cdot L^{-1}$, mostrando que o consumo deste substrato foi superior a 99%.

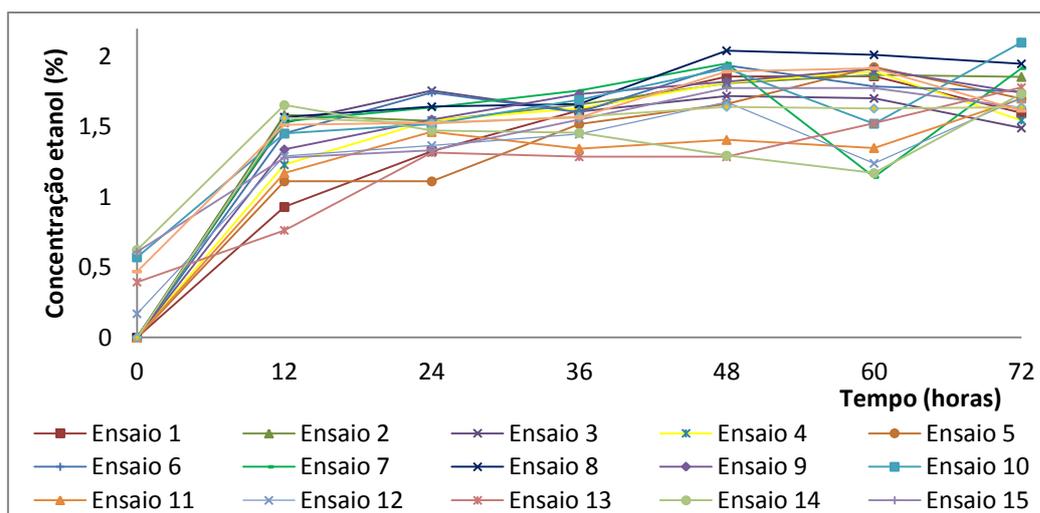


Figura 5 – Concentração de etanol em função do tempo do primeiro DCCR

Analisando-se a figura 5 e a Tabela 6, verifica-se que os maiores aumentos na concentração de etanol ocorreram nas primeiras 12h de fermentação alcoólica, sendo que o menor valor obtido para a produção de etanol, entre as respostas do planejamento, foi de 1,49% (p/v) no ensaio 3 e a maior resposta obtida foi de 2,10% (p/v), no ensaio 10, quando o inóculo apresentava-se na maior concentração dentro da faixa estudada e as demais variáveis estavam no ponto central.

Na Tabela 7, são apresentados os resultados obtidos para o rendimento da concentração de etanol, o fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$), e em biomassa ($Y_{X/S}$) e da biomassa em produto ($Y_{P/X}$) obtidos nos ensaios.

Tabela 7 - Rendimento da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em biomassa ($Y_{X/S}$) e da biomassa em produto ($Y_{P/X}$) obtidos no processo de fermentação alcoólica do farelo de arroz desengordurado.

Ensaios	Rendimento (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
1	46,94	0,24	0,37	0,65
2	55,15	0,28	0,36	0,79
3	45,35	0,23	0,36	0,64
4	47,35	0,24	0,41	0,59
5	50,26	0,26	0,49	0,52
6	53,98	0,28	0,19	1,47
7	56,80	0,29	0,32	0,90
8	58,96	0,30	0,17	1,80
9	51,61	0,26	0,31	0,85
10	62,42	0,23	0,09	2,63
11	50,66	0,26	0,12	2,12
12	49,16	0,23	0,16	1,42
13	52,27	0,21	0,21	1,00
14	51,88	0,17	0,34	0,50
15	48,19	0,15	0,35	0,44
16	48,10	0,25	0,31	0,80
17	48,14	0,17	0,35	0,50

Observando os resultados da Tabela 7 é possível analisar que a faixa de rendimento encontrada para a concentração de etanol foi de 46,94 a 62,42%, já o fator de conversão de substrato em produto variou de 0,17 a 0,30, sendo considerados valores baixos ao comparar com os resultados obtidos no estudo de Fontan et al. (2011) e de Almeida et al. (2006) que encontraram 0,65 e 0,46, respectivamente.

Os autores Parmar e Rupasinghe (2013), estudaram a bioconversão do bagaço da maçã em etanol, sendo que na caracterização deste substrato a quantificação de açúcares redutores foi de 18,2 g·L⁻¹, sendo estes fermentados pela *Saccharomyces cerevisiae* obtendo-se um fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) de 0,19, valor inferior aos obtidos neste trabalho que variaram de 0,44 (ensaio 15) a 2,63 (ensaio 10), mostrando que o FAD também apresenta potencial na produção de bioetanol.

As análises estatísticas do primeiro DCCR foram realizadas no tempo de 72h de fermentação alcóolica, que corresponde ao final do processo, onde obteve-se o melhor ajuste dos pontos centrais.

Na Tabela 8 são apresentados os coeficientes de regressão encontrados para a resposta da concentração de etanol.

Tabela 8 - Coeficientes de regressão para a resposta de concentração de etanol (%)(p/v) em 72h de fermentação, para o primeiro DCCR.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (7)	p - valor
Média	1,63	0,06	26,6	<0,0001*
x ₁ (L)	0,07	0,03	2,52	0,0396*
x ₁ (Q)	0,08	0,03	2,69	0,0394*
x ₂ (L)	<0,00	0,03	0,02	0,9842
x ₂ (Q)	<0,00	0,03	0,30	0,7952
x ₃ (L)	0,05	0,02	1,90	0,0986*
x ₃ (Q)	0,03	0,03	0,87	0,4123
x ₁ x x ₂	-0,03	0,04	-0,73	0,4884
x ₁ x x ₃	-0,03	0,04	-0,77	0,4680
x ₂ x x ₃	0,10	0,04	2,75	0,0283*

*p≤0,1; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Por meio da Tabela 8, verifica-se que as variáveis temperatura (L e Q), concentração de inóculo (L) e a interação entre o pH e a concentração de inóculo apresentaram efeitos significativos (p≤0,1) na resposta de concentração de etanol, sendo estes positivos, indicando que o aumento da temperatura e da concentração de inóculo, dentro da faixa estudada, resultou no aumento da concentração de etanol; a variável pH não apresentou efeito significativo sobre a resposta.

Os bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos apresentam grande variabilidade, portanto podem ser considerados valores de “p” menores que 10% ($p < 0,1$) (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 9, foram consideradas apenas as variáveis significativas ($p \leq 0,1$). Observa-se que $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p = 0,0042$) e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 78,75\%$), considerando a variabilidade inerente aos bioprocessos (HAALAND, 1989), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 6.

Tabela 9 – ANOVA do modelo quadrático para predição de etanol (%) (p/v) em 72h de fermentação.

Fonte de Variação	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	0,29	5	0,06	6,74	0,0042
Resíduos	0,09	11	0,01		
Total	0,38	16			

% variação explicada (R^2) = 78,75% $F_{5;5;0,05} = 3,20$

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Pode-se observar por meio da análise da superfície de resposta e curvas de contorno (Figura 6) que nas faixas estudadas, as maiores concentrações de etanol foram obtidas quando as variáveis, temperatura e concentração de inóculo encontravam-se no nível máximo de estudo, não sendo possível definir a região otimizada para a maximização do rendimento em etanol.

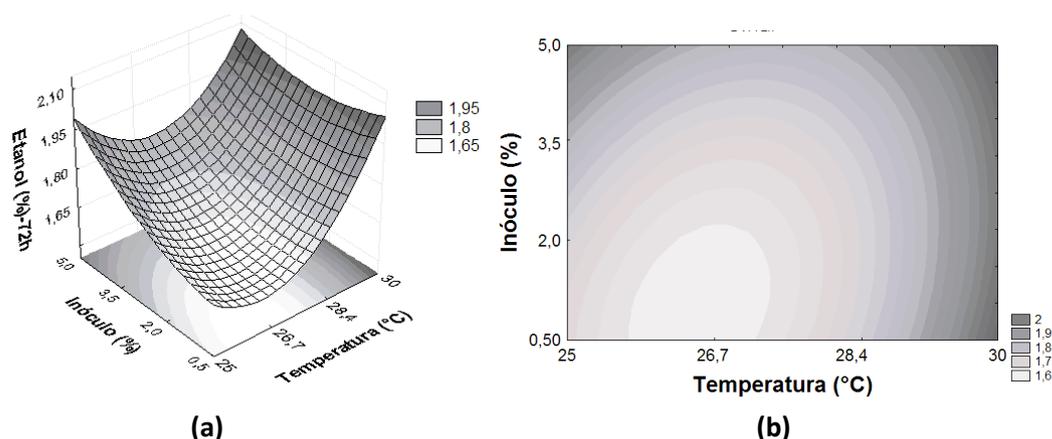


Figura 6 – Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a concentração de etanol (%) em função das concentrações da temperatura (°C) e da concentração de inóculo (%)

Na produção de vinagre a base de casca de abacaxi, os autores Singh e Singh (2007) observaram rendimentos de 2,0 a 2,5% de etanol após 8-10 h fermentação, havendo acréscimo desta concentração para 18% após 24 h. Os autores atribuíram

este resultado a alta concentração de açúcares presente no substrato (aproximadamente 35%). Este resultado é semelhante ao proposto por Adams (1985), que relatou que teoricamente 1,0 g de glicose produz 0,51 g de etanol e 0,67 g de ácido acético.

Comparando-se os resultados de Singh e Singh (2007) com os obtidos nesse trabalho, onde 1,0 g de glicose resultou em no máximo 0,33g de etanol, verificou-se uma baixo rendimento na produção de etanol, sendo que com o substrato estudado seria possível obter aproximadamente 3,5% de etanol. Entretanto, o farelo de arroz desengordurado contém importantes nutrientes que podem dificultar o processo de sacarificação enzimática pela diminuição da área de exposição dos grânulos de amido, entre eles as proteínas, nutriente presente em concentrações significativas, como observado no estudo realizado por Amissah et al. (2003), onde o farelo de arroz apresentou de 11,2 a 14,4% de proteína, conforme a variedade avaliada (WATANABE et al. 2009), além disso, os peptídeos liberados na hidrólise das proteínas são utilizados como nutrientes pelas leveduras, auxiliando na tolerância da mesma ao etanol.

Na produção de bioetanol, a partir da água de lavagem do arroz e do farelo de arroz, os autores Watanabe et al (2009), observaram que a utilização do tratamento ultrassônico com posterior adição de protease, antes da hidrólise dos açúcares, auxiliou na fermentação alcohólica, sendo obtido 6,2% de etanol, enquanto que no processo conduzido sem o tratamento ultrassônico e adição de protease, a concentração de etanol máxima alcançada foi de 1,2%.

Para verificar a influência da exposição da suspensão de farelo de arroz ao tratamento ultrassônico e ação de protease, realizou-se o segundo teste preliminar.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

3.2.1 Segundo teste preliminar

No segundo teste foram realizados 2 ensaios em triplicata, com o intuito de analisar a influência da exposição do substrato ao tratamento ultrassônico e à protease (Alcalase) sobre a produção de etanol. Todos os parâmetros aplicados na adição da protease, foram baseados no estudo desenvolvido por Watanabe et al (2009) e em valores utilizados industrialmente, informados pela empresa fornecedora da protease, sendo fixados em: concentração da Alcalase de $15 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, temperatura de 30°C , pH de 6,5 e tempo de atuação de 2h .

Após a atuação da Alcalase, realizou-se a hidrólise enzimática dos amidos, com posterior fermentação alcoólica, sendo os parâmetros baseados nos resultados obtidos no primeiro DCCR, como a temperatura e a concentração de inóculo, apresentaram efeito positivo, foram fixados no ponto máximo de estudo (30°C e 5,0%, respectivamente), já o pH, que apresentou efeito positivo, mas não significativo, foi mantido no ponto central (5,0).

Os resultados obtidos para a cinética da fermentação alcoólica do FAD são apresentados na Figura 7.

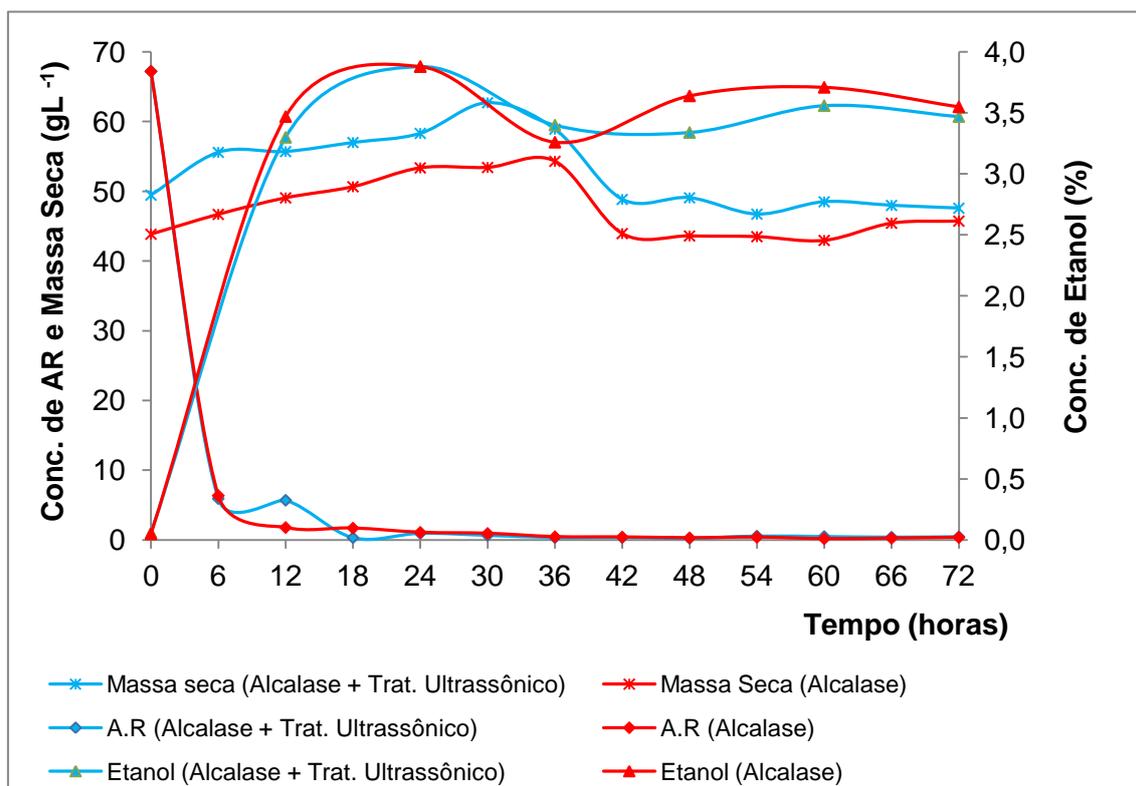


Figura 7: Perfil cinético da produção do fermentado de farelo de arroz desengorurado

De acordo com a Figura 7, os dois ensaios apresentaram cinética similares, mostrando que o tratamento ultrassônico nas condições avaliadas, não influenciou na fermentação alcoólica do FAD. Ambos ensaios, iniciaram com concentrações de AR similares (aproximadamente de 68 gL⁻¹), sendo que apresentam uma queda acentuada na concentração de substrato durante as primeiras 6 h, chegando a 18h com concentrações próximas a zero. Esses resultados mostram que a protease e o tratamento ultrassônico não influenciaram na hidrólise enzimática, porém verificou-se que o meio tornou-se mais escuro, como pode ser observado na Figura 8, característica que pode ter sido originada pela hidrólise da proteína e consequente liberação de aminoácidos, os quais podem ter reagido com os grupamentos carbonila

dos açúcares redutores, resultando na Reação de Maillard durante a atuação das amilases a 60 e 90 °C no processo de hidrólise (WANG, QIAN e YAO; 2011).

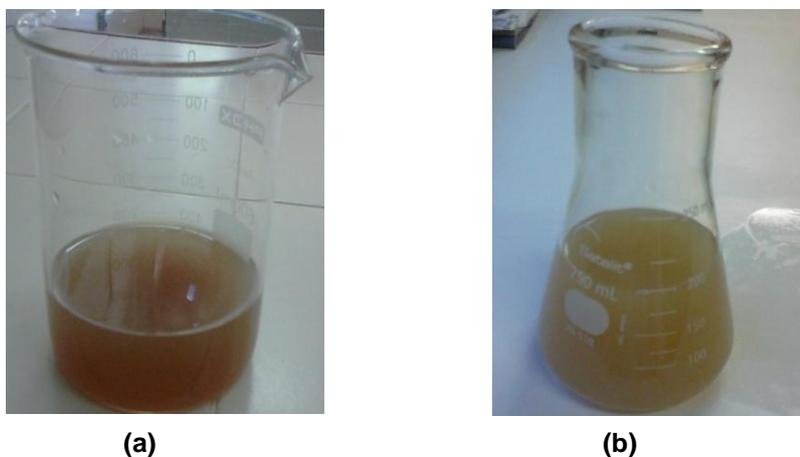


Figura 8 – a) Meio sem adição da Protease b) Meio com adição da Protease

Para a concentração de etanol, verifica-se um aumento significativo na velocidade de conversão de substrato em etanol, nas primeiras 24h, mesmo período onde a massa seca apresenta o maior crescimento, e que os AR chegam próximos a zero. A concentração de etanol não apresenta grandes variações, sendo que por meio do teste de Tukey a 95% de confiança, os ensaios não apresentaram diferença significativa entre si ($p > 0,05$) para esta resposta. Entretanto, ao comparar o resultado máximo de etanol obtido no primeiro DCCR (2,10%) (p/v), com o encontrado no segundo teste preliminar com a adição da protease (3,60%) (p/v), verifica-se um acréscimo de 71% na concentração final de etanol, sendo alcançado um rendimento de 105 %, valor superior ao teórico, assim como o observado pelos autores Singh e Singh (2007), que alcançaram um rendimento de 101%.

Com os resultados obtidos no primeiro DCCR e no segundo teste preliminar, realizou-se o segundo DCCR, mantendo a adição da protease, nas condições utilizadas no segundo teste preliminar. Para a realização da fermentação alcoólica, as variáveis significativas no primeiro DCCR (temperatura e inóculo) tiveram suas faixas de estudo ampliadas (28 a 35 °C e 1,0 a 7,0%, respectivamente); o pH foi fixado no ponto central de estudo (5,0), pois apresentou efeito não significativo e positivo.

3.2.2 Segundo DCCR

Objetivando alcançar a otimização da etapa de fermentação alcoólica do farelo de arroz desengordurado, realizou-se o segundo DCCR, fixando a adição da protease em $15 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ com atuação de 2 h na temperatura de 60 °C, conforme recomendações

do fornecedor da enzima, para posterior hidrólise com as enzimas amilolíticas, nas concentrações otimizadas em estudo anterior ($30 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de α -amilase e $40 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$ de amiloglicosidase), seguido da fermentação alcoólica.

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, e as respostas de açúcares redutores e concentração de massa seca obtidas após 72 h de fermentação, é apresentada na Tabela 9. As respostas para a concentração de etanol nos tempos de 36, 48, 60 e 72h são demonstradas na Tabela 10.

Tabela 9 - Matriz do planejamento do segundo DCCR com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no processo de fermentação alcóolica do farelo de arroz desengordurado e respostas de A.R e Massa Seca.

Tempo	x_1^a	x_2^b	A.R ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c	Massa Seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^c
Ensaio 1	-1 (29)	-1 (1,85)	$0,46\pm 0,21$	$31,53\pm 1,38$
Ensaio 2	+1 (34)	-1 (1,85)	$0,22\pm 0,08$	$34,11\pm 3,64$
Ensaio 3	-1 (29)	+1 (6,15)	$0,30\pm 0,15$	$104,19\pm 2,40$
Ensaio 4	+1 (34)	+1 (6,15)	$0,16\pm 0,12$	$97,52\pm 2,45$
Ensaio 5	-1,41 (28)	0 (4,0)	$0,53\pm 0,41$	$73,04\pm 0,21$
Ensaio 6	+1,41 (35)	0 (4,0)	$0,15\pm 0,08$	$70,45\pm 1,54$
Ensaio 7	0 (31,5)	-1,41 (1,0)	$0,27\pm 0,02$	$17,11\pm 1,73$
Ensaio 8	0 (31,5)	+1,41 (7,0)	$0,12\pm 0,01$	$170,91\pm 2,56$
Ensaio 9	0 (31,5)	0 (4,0)	$0,37\pm 0,23$	$85,24\pm 2,72$
Ensaio 10	0 (31,5)	0 (4,0)	$0,08\pm 0,21$	$77,11\pm 1,33$
Ensaio 11	0 (31,5)	0 (4,0)	$0,69\pm 0,11$	$89,22\pm 0,60$

^a Temperatura; ^b Concentração de inóculo (%); ^c Resultado \pm erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações.

Tabela 10 - Matriz do planejamento do segundo DCCR com valores reais (entre parênteses) e codificados das variáveis estudadas no processo de fermentação alcóolica do farelo de arroz desengordurado e respostas de etanol nos tempos de 36, 48, 60 e 72h.

Ensaio	x_1^a	x_2^b	Etanol (%) 36h ^c	Etanol (%) 48h ^c	Etanol (%) 60h ^c	Etanol (%) 72h ^c
Ensaio 1	-1 (29)	-1 (1,85)	$3,92\pm 0,10$	$3,97\pm 0,03$	$3,90\pm 0,01$	$3,98\pm 0,13$
Ensaio 2	+1 (34)	-1 (1,85)	$3,65\pm 0,03$	$3,65\pm 0,03$	$3,54\pm 0,10$	$3,21\pm 0,03$
Ensaio 3	-1 (29)	+1 (6,15)	$3,78\pm 0,23$	$3,71\pm 0,20$	$3,67\pm 0,11$	$3,62\pm 0,12$
Ensaio 4	+1 (34)	+1 (6,15)	$4,04\pm 0,13$	$3,90\pm 0,06$	$3,74\pm 0,09$	$3,71\pm 0,02$
Ensaio 5	-1,41 (28)	0 (4,0)	$3,59\pm 0,03$	$3,71\pm 0,09$	$3,49\pm 0,06$	$3,54\pm 0,11$
Ensaio 6	+1,41 (35)	0 (4,0)	$3,58\pm 0,62$	$3,56\pm 0,64$	$3,50\pm 0,64$	$3,50\pm 0,61$
Ensaio 7	0 (31,5)	-1,41 (1,0)	$3,84\pm 0,02$	$3,79\pm 0,00$	$3,84\pm 0,02$	$3,79\pm 0,05$
Ensaio 8	0 (31,5)	+1,41 (7,0)	$4,08\pm 0,02$	$4,04\pm 0,00$	$3,92\pm 0,11$	$4,09\pm 0,04$
Ensaio 9	0 (31,5)	0 (4,0)	$3,91\pm 0,12$	$3,94\pm 0,00$	$3,97\pm 0,07$	$3,99\pm 0,07$
Ensaio 10	0 (31,5)	0 (4,0)	$3,83\pm 0,00$	$3,91\pm 0,11$	$3,87\pm 0,04$	$3,94\pm 0,11$
Ensaio 11	0 (31,5)	0 (4,0)	$3,78\pm 0,13$	$3,94\pm 0,09$	$3,91\pm 0,06$	$3,98\pm 0,15$

^a Temperatura; ^b Concentração de inóculo (%); ^c Resultado \pm erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações.

Avaliando-se os resultados obtidos, observa-se que a concentração de massa seca variou conforme a adição inicial de inóculo, assim como observado no primeiro DCCR, já a variável pH apresentou resultados finais que variaram de 4,77 (ensaio 1) a

5,15 (ensaio 2). Para a concentração de AR observa-se que mais 99% do substrato inicial foi consumido, resultado semelhante ao encontrado no primeiro DCCR.

Analisando os resultados da Tabela 10, verifica-se que as menores concentrações de etanol encontradas entre 36 a 72h, (3,21 a 3,65%) foram encontradas nos ensaios 2 e 6, onde a temperatura encontrava-se nos maiores níveis de estudo e a concentração de inóculo no nível inferior (-1) e no ponto central; já as maiores respostas (4,04 a 4,09%) foram obtidas no ensaio 8, onde a temperatura encontrava-se no ponto central (31,5 °C) e a concentração de inóculo estava no ponto máximo de estudo (7%).

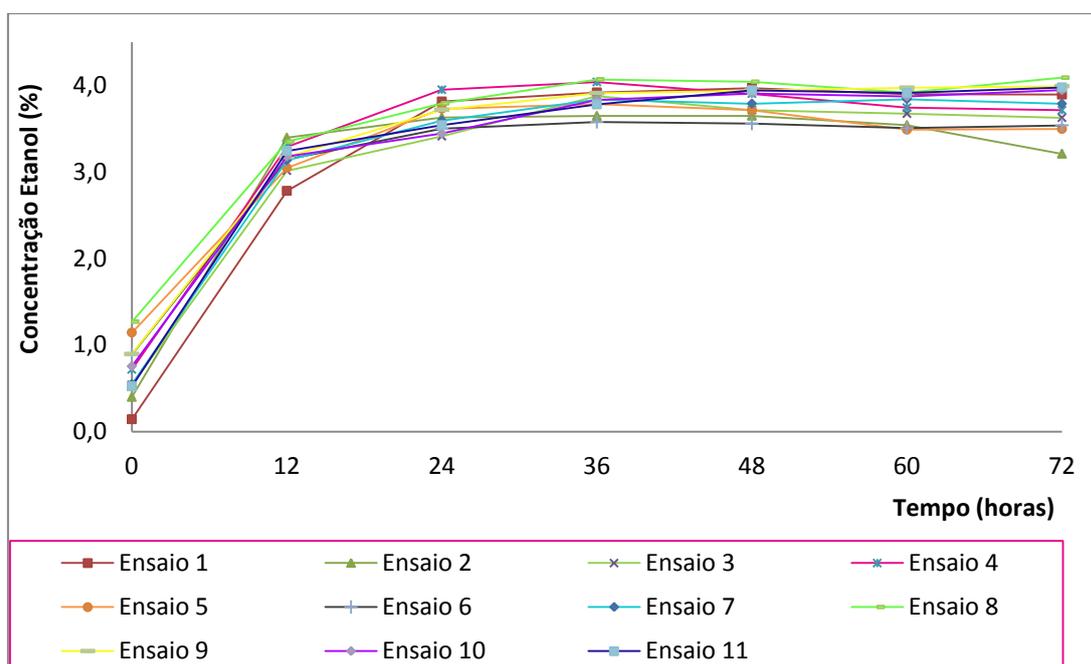


Figura 10 - Concentração de etanol em função do tempo no segundo DCCR

A Figura 10 permite uma melhor visualização da concentração de etanol ao longo das 72 h da fermentação alcoólica para os 11 ensaios do delineamento, na qual pode-se observar que os maiores acréscimos da concentração de etanol ocorreram até 24 h de fermentação alcoólica, sendo que após esse período houve uma baixa variação na resposta avaliada. Como na maioria dos ensaios o desvio padrão foi menor no tempo de 48 h, e nesse tempo também se obteve um bom ajuste dos pontos centrais (ensaios, 9, 10 e 11), esse foi utilizado para análise estatística. Na Tabela 11, são apresentados os rendimento de todos os ensaios do segundo DCCR da etapa fermentação alcoólica, assim como os fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em biomassa ($Y_{X/S}$) e da biomassa em produto ($Y_{P/X}$).

Tabela 11 - Rendimento da fermentação alcoólica e fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em biomassa ($Y_{X/S}$) e da biomassa em produto ($Y_{P/X}$) obtidos no processo de fermentação alcoólica do farelo de arroz desengordurado.

Ensaio	Rendimento (%)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$
1	111,83	0,57	0,12	4,80
2	95,03	0,43	0,19	2,22
3	101,81	0,44	0,61	0,72
4	106,66	0,44	0,50	0,89
5	99,50	0,49	0,41	1,21
6	102,36	0,39	0,26	1,53
7	106,82	0,47	0,06	7,07
8	116,30	0,56	1,38	0,40
9	114,66	0,46	0,48	0,96
10	114,29	0,47	0,27	1,72
11	115,18	0,52	0,50	1,02

Analisando a Tabela 11, verifica-se que o rendimento variou de 95,43 a 115,18%, mostrando que todo o AR foi convertido em etanol. Segundo Pepler (1970) as leveduras utilizadas em alimentação possuem de 22 a 34% de carboidratos, sendo que a *Saccharomyces cerevisiae* pode utilizar seus carboidratos de reserva para a produção de etanol, por meio de uma fermentação endógena. Já, os autores Nogueira e Oliva Neto (2000) avaliaram a atividade da *Saccharomyces cerevisiae* quando mantida na ausência de substrato, em pH de 4,5 -5,5, sob temperatura de 32 °C, com uma concentração de 20% (p/v) de levedura, durante o período de 72h e observaram a produção de 0,1% de etanol, o qual foi relacionado com o alto teor proteico, mostrando que esta levedura pode utilizar a proteína na produção de etanol (Amisshah et al. 2003), justificando rendimentos superiores a 100%, assim como observado no trabalho de Das et al. (2013), que avaliaram a fermentação do hidrolisado de palha de arroz por meio do inóculo de *S. cerevisiae* MTCC 173 e *Z. mobilis* MTCC 2428, sendo encontrado até 109% de rendimento em etanol, com concentrações de 1,4 a 4,1% de etanol, resultados semelhantes aos observados neste trabalho.

Ao analisar os fatores de conversão verifica-se que no ensaio 8, onde obteve-se a maior resposta de etanol, 4,04%, houve a maior transformação de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), aumentando dessa forma a população de leveduras e consequentemente aumentando o rendimento em etanol, sendo que ao comparar as maiores respostas obtidas nos fatores de conversão do segundo DCCR com as do primeiro DCCR, observa-se um aumento, mostrando uma melhora no processo da fermentação alcoólica, que resultou no acréscimo da concentração de etanol.

Tabela 12 - Coeficientes de regressão para a resposta de concentração de etanol (%) em 48h de fermentação alcoólica, para o segundo DCCR.

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t (5)	p - valor
Média	3,929002	0,036615	107,3051	<0,0001*
x ₁ (L)	-0,044354	0,022456	-1,9752	0,105228
x ₁ (Q)	-0,138769	0,026796	-5,1788	0,003529*
x ₂ (L)	0,044460	0,022456	1,9799	0,104592
x ₂ (Q)	0,001410	0,026796	0,0526	0,960062
x ₁ x x ₂	0,127610	0,031710	4,0243	0,010078*

*p≤0,05; L- termos lineares; Q- termos quadráticos.

Por meio dos coeficientes de regressão (Tabela 12) foi possível observar que apenas a variável temperatura (termo quadrático) e a interação entre as duas variáveis apresentaram-se significativas. A variável concentração de inóculo (termo linear e quadrático) não foi significativa na faixa estudada, entretanto apresentou efeito positivo (aumentando a concentração de inóculo houve acréscimo na resposta de etanol), já a variável Temperatura (termo linear e quadrático) apresentou efeito negativo, mostrando que ao aumentar a temperatura da fermentação alcoólica houve um decréscimo na resposta de etanol encontrada.

Considerando-se os parâmetros significativos (p≤0,05) obteve-se a Equação 5, que representa o modelo quadrático da concentração de etanol em função das variáveis estudadas.

$$\text{Etanol (\%)} = 3,93 - 0,14 x_1^2 + 0,13 x_1 x_2 \quad (\text{Equação 5})$$

Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 13.

Tabela 13 – ANOVA do modelo quadrático para predição de etanol (%) em 48h de fermentação.

Fonte de Variação	48h				
	SQ ^a	GL ^b	QM ^c	F _{calculado}	p-valor
Regressão	0,22	4,00	0,05	16,04	0,0023
Resíduos	0,02	6,00	0,00		
Total	0,24	10,00			

% variação explicada (R²) = 91,45% F_{5;5;0,05} = 4,53

^a = soma de quadrados; ^b = graus de liberdade; ^c = quadrados médios.

Como o F_{calculado} para a regressão foi significativo (p=0,0023) e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado (R² ≈ 91%), podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta da Figura 11.

Na Tabela 14 são apresentados os valores experimentais obtidos para a concentração de etanol, os valores previstos pelo modelo codificado e o desvio relativo

Tabela 14 – Valores experimentais e previstos pelo modelo e os erros relativos para a resposta de etanol (%) em 48h de fermentação alcoólica.

Ensaio	Etanol (%) ^a	Etanol Previsto ^b	Desvio Relativo (%) ^c
1	3,97±0,03	3,92	1,25
2	3,65±0,03	3,66	-0,32
3	3,71±0,20	3,66	1,45
4	3,90±0,06	3,92	-0,43
5	3,71±0,09	3,65	1,69
6	3,56±0,64	3,65	-2,65
7	3,79±0,00	3,93	-3,73
8	4,04±0,00	3,93	2,74
9	3,94±0,00	3,93	0,20
10	3,91±0,11	3,93	-0,59
11	3,94±0,09	3,93	0,32

^a Resultado ± erro padrão: os resultados representam a média de 2 determinações.

^b Valores de etanol (%) preditos pelo modelo.

^c Desvio Relativo= $((Y - \hat{Y})/Y) \cdot 100$; onde Y= resposta experimental e \hat{Y} = resposta prevista pelo modelo.

Analisando os resultados encontrados para a concentração de etanol em 48h de fermentação alcoólica, observa-se que as menores concentrações (3,56 e 3,65%) foram encontradas nos ensaios 6 e 2, onde a temperatura encontrava-se nos maiores níveis de estudo e a concentração de inóculo no nível -1 e no ponto central, já a maior resposta (4,04%) foi obtida no ensaio 8, onde a temperatura encontrava-se no ponto central (31,5°C) e a concentração de inóculo estava no ponto máximo de estudo (7%).

Esses valores são semelhantes ao encontrado pelos autores DAS et al. (2013) que obtiveram 4,1% de etanol a partir do substrato hidrolisado de palha de arroz, onde foi utilizado uma combinação de *S. cerevisiae* MTCC 173 e *Z. mobilis* MTCC 2428 (relação 1,53) como inóculo.

Visando a otimização da produção de bioetanol a partir de sub-resíduos industriais, Ruiz et al. (2012) avaliou a fermentação alcoólica da palha de trigo sendo a concentração de etanol após 24 h, de 1,3%. Já os autores Kim e Kim (2013), utilizaram como substrato a fibra da fruta palma e alcançaram 3,5% de etanol após 60h de fermentação, sendo essas concentrações inferiores às observadas neste trabalho, mostrando que o substrato avaliado possui potencial para produção de bioetanol.

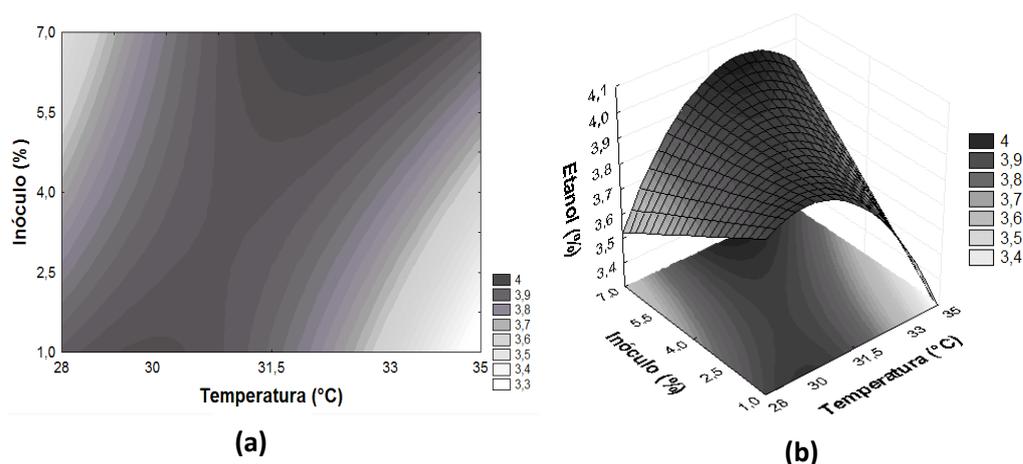


Figura 11 – Curvas de contorno (a) e superfície de resposta (b) para a concentração de etanol (%) em função da temperatura (°C) e da concentração de inóculo (%), no tempo de 48h.

Analisando as curvas de contorno e a superfície de resposta, podemos verificar que os valores máximos de etanol (%) correspondem a temperatura de 30 °C, enquanto que o aumento da concentração de inóculo indicou um aumento na resposta, entretanto ao aumentar o nível de estudo desta variável, verifica-se um aumento acentuado na viscosidade do meio, o que dificulta a homogeneização do mesmo.

3.3 VALIDAÇÃO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

A validação das condições otimizadas da fermentação alcóolica, foi realizada em um fermentador de bancada (TECNAL TEC-BIO 4,5 L Piracicaba – SP), utilizando-se 3,0 L de meio com a temperatura fixada em 30 °C, pH em 5,0 e a concentração de inóculo em 5%, sendo coletadas amostras a cada 12 h durante 72 h, para avaliação da concentração da massa seca, açúcares redutores, pH e etanol (%). Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados obtidos na validação da fermentação alcóolica

Tempo (h)	Etanol (%) ^a	A.R (g·L ⁻¹) ^a	Conc. Massa Seca (g·L ⁻¹) ^a	pH
0	0,91±0,02	71,28±4,47	51,52±1,09	5,00±0,00
12	2,76±0,04	3,45±0,33	101,14±6,11	4,84±0,02
24	2,74±0,08	1,31±2,02	102,78±1,26	4,83±0,02
36	2,81±0,02	1,17±1,86	106,38±0,03	4,85±0,01
48	3,61±0,01	0,94±0,58	91,98±0,09	5,20±0,01
60	3,67±0,02	0,50±0,46	77,26±0,18	5,28±0,02
72	4,00±0,01	0,43±0,71	74,57±0,78	5,32±0,01

^a Resultado ± erro padrão: os resultados representam a média de 3 determinações.

Observa-se que assim como nos DCCRs estudados, na validação, mais de 99% dos A.R foram consumidos. Por meio dos resultados de concentração de massa seca e pH, verifica-se que o crescimento microbiano e transformação de carboidratos em etanol, ocorreu de forma mais intensa nas primeiras 36 h, onde a concentração de massa seca aumentou e o pH diminuiu. Por meio do teste de Tukey, verifica-se que a maior concentração de etanol obtida no final da fermentação alcoólica do segundo DCCR (4,04% - ensaio 8), foi estatisticamente semelhante ao encontrado no final da validação (4,00%).

4 CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados na etapa de fermentação alcoólica do farelo de arroz desengordurado, observou-se que a maior concentração de etanol obtida foi de aproximadamente 4,00% com a temperatura fixada em 30 °C, pH em 5,0 e a concentração de inóculo em 5%, sendo que a agitação (avaliada no primeiro teste preliminar) e a faixa de pH inicial (estudado na primeiro DCCR) não apresentaram efeito significativo na produção de etanol. Além disso, observou-se que o substrato utilizado apresenta fatores nutricionais que podem influenciar o processo de transformação dos açúcares em etanol pelas leveduras. Visando a produção de vinagre, a concentração obtida de etanol foi satisfatória, não sendo necessário adicionar etanol comercial para a da ativação das bactérias acéticas, entretanto para a produção de bioetanol, utilização de alto potencial apresentada pelo substrato desse estudo, torna-se necessário o desenvolvimento de mais estudos nessa área, objetivando verificar se é possível aumentar a concentração de etanol, por meio do aumento da concentração de inóculo ou pelo controle de outras variáveis do processo.

5. REFERÊNCIAS

- Adams MR (1985) Vinegar. In **Microbiology of fermented foods**. Vol I (Wood, J.B.Brian Ed.). Elsevier Applied Science Pub. pp 1–47.
- ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Volume 1. **Métodos Químicos e Físicos para Análise dos Alimentos**. 3º Edição. São Paulo, 1985.
- Effects of fermentation substrate conditions on corn-soy co-fermentation for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*, v.120, p.140-148, 2012
- AGUIAR, André; NASCIMENTO, A.A. Rodrigo; FERRETTI, P. Lais; GONÇALVES, R. Adílson. Determination of Organic Acids and Ethanol in Commercial Vinegars. **Brazilian Journal of Food and Technology**, 5º SIPAL, 2005.
- ALMEIDA, M.M.; TAVARES, D.P.S.A.; ROCHA, A.S.; OLIVEIRA, L.S.C.; SILVA, F.L.H.; MOTA, J.C. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 8, n. 1, p. 35-42, 2006.
- AMISSAH, N.G.J.; ELLIS, O.W.; ODURO, I.; MANFUL, T.J. Nutrient composition of bran from new ricevarieties under study in Ghana. **Food Control**, v.24,p. 21-24, 2003.
- 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, p.236-243, 2001.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, nono levantamento**. Brasília, 2014, 30p.
- DAS, A; PAUL,T; JANA,Q; HALDER,S; GHOSH,K;MAITY,C; DAS MOHAPATRA K.P; PATI, R.B; MONDAL.C.K. Bioconversion of rice straw to sugar using multizyme complex of fungal origin and subsequent production of bioethanol by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 173 and *Zymomonas mobilis* MTCC 2428. **Industrial Crops and Products**, v.46, p.217-225, 2013.
- FONTAN, I. DA COSTA.Rafael; VERÍSSIMO, A.A.Lizzy; SILVA, S. Willian; BONÔMO, F.C.Renata; VELOSO, M. Cristiane. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. **Boletim Ceppa**, v.29, n.2, p.203-210, 2011.
- HAALAND, P.D. Experimental design in biotechnology. N. Y. **Marc. Dek. Inc.**, v. 1, p. 243, 1989.

HARBACH, A. P. R.; COSTA, M. C. R.; SOARES, A. L.; BRIDI, A. M.; SHIMOKOMAKI, M.; SILVA, C. A.; IDA, E. I. Dietary Corn Germ Containing Phytic Acid Prevents Pork Meat Lipid Oxidation While Maintaining Normal Animal Growth Performance. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1630-1633, 2007.

HORIUCHI, Jun-Ichi; KANNO, Tohru, KOBAYASHI, Masayoshi. New Vinegar Production from Onions. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v. 88, n. 1, p. 107-109. 1999

JIEUN, L.; SEO, E.; KWEON, D.; PARK, K.; JIN, Y. Fermentation of Rice Bran and Defatted Rice Bran for Butanol Production Using *Clostridium beijerinckii*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n.5, p. 482–490, 2009.

Johnston, B. David e McAloon, J. Andrew. Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 18-25, 2014

JULIANO, B.O.; BECHTEL, D.B. The Rice Grain And Its Gross Compos. In: JULIANO, B.O. (Ed.) **Rice: chemi. and tec.** Minnesota, USA: American Association of Cereal Chemists, 1985.

KAHLON, S.T. Rice Bran: Production, Composition, Functionality and Food Applications, Psysiological Benefits. In: CHO, S.S E SAMUEL, P. **Fiber Ingredients: Food Applications and Health Benefits**, 1ed, **CRC Press Taylor& Francis Group**, 2009. cap.14. 305-307p

KIM, Seonghun; KIM, Ho Chul. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. **Renewable Energy**, v.54, p. 150-155, 2013.

Lei, Hongjie; Zhao Haifeng e Zhao, Mouming. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast. **Biochemical Engineering**, v. 77, N.15, p. 1-6, 2013

Lei Hongjie; ZHENG, Liye; WANG, Chenxia; ZHAO, Haifeng. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n.2, p.76-83, 2013

LOPES, R. V. V.; SILVA, F. L. H.; **Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia. Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 305-315, 2006.

LUH, Bor.S. **Rice Utilization**. 2 ed, v2, 1980.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biol. Chem.*, v. 153, p. 375-380, 1944.

NOGUEIRA, I.F; OLIVA NETO P. de Efeito dos parâmetros físicos no metabolismo de carboidratos de reserva de *Saccharomyces cerevisiae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., Fortaleza 2000. **Alimentos para o terceiro milênio**. Resumos. Fortaleza: Expressão Gráfica Digital, 2000.1v.

PARMAR, I. e RUPASINGHE, H.P.V. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. **Bioresource Tecnologia**, v.130, n.1, p.613-620, Febr. 2013.

PEPPLER, H.J. Food yeasts. I: Rose A.H; HARRISON, J.S. **The yeasts**. London: Academic Press, 1970. Cap.8, p.421-463.

PLESSI, M. **Vinegar**. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition 2° ed., 2003, 6004p.

PRETORIUS, Isak. Tailoring Wine Yeast For The New Millennium: Novel Approaches To The Ancient Art Of Winemaking. **Yeast**. v.16, n.8, p.675-729, June. 2000.

RAJI, Y. O.; JIBRIL, M.; MISAU, M. I.; DANJUMA, Y. B. Vinegar from pineapple peel. **International Journal of Advanced Scientific Research and Technology**, v. 3, n.2, p.656-666, June.2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Uma Estratégia Sequencial de Planejamento**. 2ª Edição. Campinas: Editora Casa do Pão, 2009, 358p.

RUIZ, A. Héctor; SILVA, P.Daniel; LIMA, F. Luis; VICENTE, A. Antonio; TEIXEIRA, A. José. Bioethanol production from hydrothermal pretreated wheat straw by a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain – Effect of process conditions. **Fuel**, v.95, p.528-536, May, 2012.

SINGH, R; SINGH, S. Design and development of batch type acetifier for wine-vinegar production. **Indian Journal. Microbiology**, v. 47, p.153-159, June 2007.

SOMOGYI, M.A.A New Reagent for the Determination of Sugars. **Journal of Biological.Chemistry**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SOLIERI, L.; GIUDICI, P. **Vinegars of the World**. Itália: Verlag, Springers, 2009. 244p.

SOARES, A. L.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I. Synergism Between Dietary Vitamin E And Exogenous Phytic Acid In Prevention Of Warmed-Over Flavour Development In Chicken Breast Meat, Pectoralis Major M. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.1, p.57–62, March.2004.

SOSSOU, S. K.; AMEYAPOH, Y.; KAROU, S. D.; SOUZA, C. Study of Pineapple pellings processing into vinegar by biotechnology. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n.11, p. 859-865, 2009.

STODOLAK, B.; STARZÝNSKA, A.; CZYSZCZOŃ, M.; ŻYŁA, K. The Effect Of Phytic Acid On Antioxidant Stability Of Raw And Cooked Meat. **Food Chemistry**, v.101, p.1041-1045, 2007.

STROPPIA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

SUMAN, A. Priscila. **Proceso de Obtenção de vinagre de gengibre**. 2012. 92f. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Botucatu, SP

UBEDA C.; CALLEJÓN, R.; HIDALGO, C.; TORIJA, M.J.; TRONCOSO, A.M.; MORALES, M.L. Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effect on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. **LWT- Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p.139-145, July. 2013.

ZAMOR, Fernando. **Biochemistry of Alcoholic Fermentation in Wine Chemistry and Biochemistry**. Moreno-Arribas, Spain: M.C. Polo, 2009. 437p.

YAO, L; Lee, SL; Wang,T; MOURA, J.M; JOHNSON, L.A. Effects of fermentation substrate conditions on corn-soy co-fermentation for fuel ethanol production. **Bioresource Technology**, v.120, p.140-148, 2012

WANG, He-Ya; QIAN, He; YAO, Wei-Rong. Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. **Food Chemistry**, v.128,n3, p.573-584, Oct.,2011.

WANG,L; ZHANG, H; ZHANG, X; CHEN, Z. Purification and identification of a novel heteropolysaccharide RBPS2a with anti-complementary activity from defatted rice bran. **Food Chemistry**, v. 110, n.1, p.150-155, 2008.

WATANABE, Masanori; TAKAHASHI, Makoto; SASANO, Kazuo; KASHIWAMURA, Takashi; OZAKI, Yuich; TSUIKI, Tomohiro; HIDAKA, Harutaru; KANEMOTO, Shigeharu. Bioethanol production from rice washing drainage and rice bran. Note. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 108,n. 6, p.524–526, 2009

CAPÍTULO 4

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VINAGRE DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

1. INTRODUÇÃO

Segundo a legislação brasileira, Brasil (1990) vinagres ou vinagre de vinho são produtos obtidos da fermentação acética do vinho que possuam uma acidez volátil mínima de 40 g.L^{-1} expressa em ácido acético (4%), e que sua graduação alcoólica seja inferior a 1°GL , sendo obrigatoriamente pasteurizado.

Os vinagres são produzidos por meio de duas fermentações sucessivas, a alcoólica e a acética, as quais devem ocorrer de forma separada. No final da fermentação alcoólica, quando os açúcares são consumidos, condições aeróbias são restabelecidas, permitindo a ação de bactérias acéticas que converterão etanol em ácido acético, diminuindo ainda mais o pH, dando origem ao vinagre (BELLINI, 2006; ADAMS, 1985).

Embora mais de 100 espécies, subespécies e variedades do gênero *Acetobacter* tenham sido classificadas através dos anos, poucas são aquelas com qualidades industriais, isto é, capazes de produzir concentrações elevadas de ácido acético, não formar material viscoso, não ter capacidade para completar a oxidação até anidrido carbônico e água, ter tolerância a concentrações razoáveis de ácido acético e trabalhar em temperaturas entre 25°C e 30°C , por isso geralmente utiliza-se uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria (SACHS, 1990), proveniente de um vinagre não pasteurizado, denominado de vinagre forte.

No processo submerso de fabricação de vinagre, as bactérias acéticas encontram-se submersas no líquido a fermentar, multiplicando-se e retirando energia da reação de oxidação do álcool etílico a ácido acético. Para catalisar essa reação, que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque, pois um decréscimo da pressão parcial de oxigênio altera o metabolismo bacteriano, já a temperatura ótima para a fermentação depende da concentração do substrato, sendo a mesma por volta

de 28°C. Este processo destaca-se pela produtividade, sendo trinta vezes mais rápido que qualquer outro processo e, portanto, é o mais adequado aos moldes industriais modernos (BELLINI, 2006; AQUARONE et al., 2001).

Segundo Suman (2012), tanto a acidez como o teor alcoólico afetam muito o desenvolvimento das bactérias ou a qualidade do vinagre, sendo que concentrações acima de 13% de álcool dificultam a acetificação, além de não ser totalmente oxidado. Industrialmente a concentração utilizada é de 6% de álcool etílico. Já a concentração de acidez é regulada pela adição do vinagre forte o qual geralmente é adicionado na proporção de 1:3 a 1:4 do vinho.

Antes da comercialização o produto deve receber alguns tratamentos, que variam conforme o tipo de vinagre e que objetivam melhorar as características sensoriais e a estabilidade do produto final. Isto pode incluir o armazenamento após a fermentação, os processos de clarificação, filtração, envelhecimento, estabilização e envase (PEDROSO, 2003).

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver vinagre a partir de farelo de arroz desengordurado por meio do processo submerso e caracterizá-lo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

O farelo de arroz desengordurado (FAD), fornecido pela Indústria Riograndense de Óleos Vegetais - (IRGOVEL - Pelotas/RS) foi moído em moinho de facas (Solab, SL31) e congelado a -12 °C até a realização dos testes, onde foi submetido à hidrólise enzimática pela ação da protease (Alcalase) e das enzimas α -amilase termoestável (TERMAMYL 2X, Novozymes A/S) e da amiloglucosidase (AMG 300L - Amyloglucosidase from *Aspergillus Niger* – Novozymes), gentilmente cedidas pela empresa LNF – Latino Americana.

2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Após a hidrólise, o meio foi centrifugado a 6000 rpm durante 5 min em centrífuga refrigerada (CIENTEC, CT-5000R, Piracicaba, São Paulo). Em seguida realizou-se inoculação com 5,0% de *Saccharomyces cerevisiae* (fermento comercial liofilizado) adquirido no mercado local em Erlenmeyers de 3L com 1,5L de meio hidrolisado (centrifugado e com o pH ajustado em 5,0). A incubação foi realizada em Shaker (Certomat Bs-1, modelo, B Braun Biotech Internacional.), sob temperatura de 30°C, durante 48h. Posteriormente, o vinho (produto obtido da fermentação alcoólica) foi centrifugado a 6000 rpm durante 3min, para após ser utilizado na fermentação acética, etapa que ocorreu em um fermentador de bancada (Marca TECNAL, Modelo TEC-BIO-4,5-VI, Piracicaba - SP).

2.3 FERMENTAÇÃO ACÉTICA

A realização da fermentação acética, ocorreu com a produção de 1 batelada de 3L, sendo utilizado bactérias acéticas provenientes do vinagre não pasteurizado de etanol, denominado como vinagre forte de etanol, fornecido pela empresa *Chemim*

Alimentos, o qual apresentava aproximadamente 8,7% de acidez e 3,5% de etanol. Para ativação destas bactérias utilizou-se uma mistura de nutrientes, conhecido como *Acetozyn*, doada pela empresa Frings do Brasil, que apresenta em sua composição uma mistura física de sais inorgânicos, açúcares, extratos vegetais, aminoácidos e vitaminas, na concentração de 1g.L^{-1} , conforme indicação da empresa.

Para iniciar o processo de fermentação acética, primeiramente adicionou-se o vinagre forte na proporção de 1,5:1,0 do vinho base, o qual apresentava 5,0% de etanol, em seguida acrescentou-se o *Acetozyn*, para o fornecimento dos nutrientes necessários para as bactérias acéticas, sendo fixadas as condições do processo em $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fluxo de aeração de 1 vvm (volume de ar/volume de mosto x minuto) e agitação de 500 rpm. Para identificação da ativação das bactérias acéticas e a produção final do vinagre foram realizadas análises de acidez a cada 24h nos três primeiros dias e após a cada 12h. O produto foi considerado pronto no momento em que a concentração de etanol foi inferior a 1%, como preconiza a legislação de vinagres (BRASIL, 2012), após realizou-se a filtração em papel filtro, seguido de uma pasteurização lenta (65°C por 30min) para posterior caracterização do vinagre, conforme as análises exigidas pela legislação (BRASIL, 2012).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Determinação da Acidez

Para a análise de acidez durante a fermentação acética, utilizou-se a metodologia proposta por Pedroso (2003), transferindo-se 1,0 mL de amostra para um tubo de ensaio, adicionando-se 1 gota de fenolftaleína e titulando-se com solução de NaOH 0,1 N (por meio de pipeta de 10 mL) até coloração rosa do indicador (fenolftaleína). O percentual de acidez foi calculado por meio da Equação 01.

$$\text{Acidez total (g de ácido acético/100mL de amostra)} = \text{N}^{\circ} \text{ de mL da solução de NaOH} \times 0,6$$

(Equação 01)

Segundo o autor, essa técnica pode ser usada com a mesma unidade de acidez volátil (g de ácido acético/100 mL) porque o fator 0,6 que multiplica a Equação 01 vem do peso molecular do ácido acético que é 60,05616 g.

2.4.2 Caracterização do vinagre

Para a caracterização do vinagre obtido, foram realizadas as análises de grau alcoólico real, cinzas e extrato seco residual, conforme metodologia descrita em BRASIL (2012), em triplicatas. Para a análise de acidez total, utilizou-se a metodologia indicada por Pedroso (2013), e a determinação de açúcares redutores foi conduzida por meio da análise de Somogyi (1945) e Nelson (1944).

2.4.2.1 Grau alcoólico real

É um método densimétrico, baseado na separação do etanol por destilação da amostra e sua posterior quantificação de acordo com a densidade relativa do destilado a 20°C (BRASIL, 2005).

Foram medidos 200 mL da amostra em um balão volumétrico, anotando sua temperatura inicial. A amostra foi transferida para um balão destilatório com pérolas de vidro. O balão volumétrico de 200 mL foi lavado 4 vezes com 5 mL de água destilada, que foram juntados ao conteúdo do balão destilatório. Em seguida, o conteúdo do balão destilatório foi neutralizado com hidróxido de sódio 5 N. Cerca de $\frac{3}{4}$ do volume inicial foi destilado em um aparelho de destilação de rota- evaporador e recolhido no balão volumétrico empregado anteriormente, já com 10 mL de água destilada e mantido em banho de gelo durante a destilação (BRASIL, 2012).

Terminado o processo, o volume do balão foi completado, à mesma temperatura inicial, com água destilada e foi realizada a agitação do mesmo, em seguida utilizou-se um picnômetro de 10 mL para determinação da densidade, a qual foi convertida em grau alcoólico real a 20°C, conforme a tabela apresentada na legislação.

2.4.2.2 Cinzas

A determinação das cinzas dos vinagres produzidos foi feita por método gravimétrico, fundamentado na eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil quando a amostra é incinerada a 550°C.

Foram adicionados 25 mL da amostra em cadinhos previamente aquecidos a 600°C por 10 minutos e tarados. O conjunto foi levado até a secura em banho maria fervente e em seguida completamente carbonizado em bico de Bunsen e enviados à mufla a uma temperatura de 550°C, até que o resíduo se tornasse branco ou acinzentado. Após resfriamento dos cadinhos em dessecador, o conjunto foi pesado e o resultado da massa do cadinho com cinzas foi subtraído da tara do mesmo. Para obtenção do resultado em gramas por litro ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) o resultado foi multiplicado por 40,

uma vez que foram utilizados 25 mL da amostra. O cálculo está demonstrado na Equação 2 (BRASIL, 2012).

$$\text{Cinzas, em g}\cdot\text{L}^{-1} = 40 \times (a - b) \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

a = massa do cadinho com cinzas

b = massa do cadinho

2.4.2.3 Extratos secos total e reduzido

Obteve-se o extrato seco total por meio da evaporação lenta em banho maria a 100 °C de 25 mL da amostra em cápsula de evaporação cilíndrica de fundo plano com 55 mm de diâmetro, previamente tarada, durante 3 horas consecutivas. Em seguida, a cápsula foi colocada numa estufa a 105 °C \pm 3 °C durante 30 minutos. A cápsula de evaporação foi colocada num dessecador pra que, após esfriamento esta pudesse ser pesada. Para obter o extrato seco total em gramas por litro ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), o valor da massa do extrato foi multiplicada por 40, já que foram usados 25 mL da amostra na determinação (BRASIL, 2012).

Conforme a legislação o extrato seco reduzido é obtido pela diferença do valor do extrato seco total e dos açúcares totais e sulfatos quem excedem 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, entretanto como o farelo de arroz desengordurado não apresenta sulfatos, estes foram desprezados do cálculo, sendo o utilizado o cálculo apresentado na Equação 3 (BRASIL, 2012).

$$\text{ESR (g}\cdot\text{L}^{-1}) = \text{ES} - (\text{AT}-1) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

ES = extrato seco total, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,

AT = açúcares totais, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, (quando os açúcares forem menores que 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, desprezar o termo (AT-1)).

2.4.2.4 Acidez Total

A análise de acidez total foi realizada conforme a metodologia descrita em Pedroso (2003). Foram pipetadas 10 mL de amostra num Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada e adicionou-se 1 a 2 gotas de solução de fenolftaleína. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até a coloração rosa do indicador fenolftaleína, sendo realizado o cálculo conforme a Equação 4.

$$\text{Acidez Total (moles}\cdot\text{L}^{-1}) = (n \times M / V) \times 0,60 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

n = volume de solução de hidróxido de sódio gastos na titulação [L]

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio [$\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$]

V = volume de amostra [L]

Assim como a técnica de acidez utilizada durante o acompanhamento da fermentação acética, o resultado pode ser expresso em (g de ácido acético/100 mL) devido ao fator 0,6 que multiplica na Equação 04 que vem do peso molecular do ácido acético que é 60,05616 g.

2.4.2.5 Determinação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada em triplicata, baseando-se na quantidade de açúcares fermentescíveis liberados durante todo o processo de hidrólise enzimática, pela técnica de Somogyi (1945) e Nelson (1944). Todos os resultados foram expressos em gramas de açúcares por litro de meio hidrolisado.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ACOMPANHAMENTO FERMENTAÇÃO ACÉTICA

Por meio da Figura 1, observa-se os resultados encontrados para acidez durante a fermentação acética, sendo possível analisar que a essa etapa foi concluída após 12 dias, sendo que nos primeiros cinco dias a acidez manteve-se inalterada, indicando que as bactérias encontravam-se em fase de adaptação ao meio. O maior acréscimo na acidez foi evidenciado entre o décimo e o décimo primeiro dia de fermentação, onde a acidez aumentou de 7,2 para 7,74%, chegando ao final do processo (12 dias) com 7,98% de acidez.

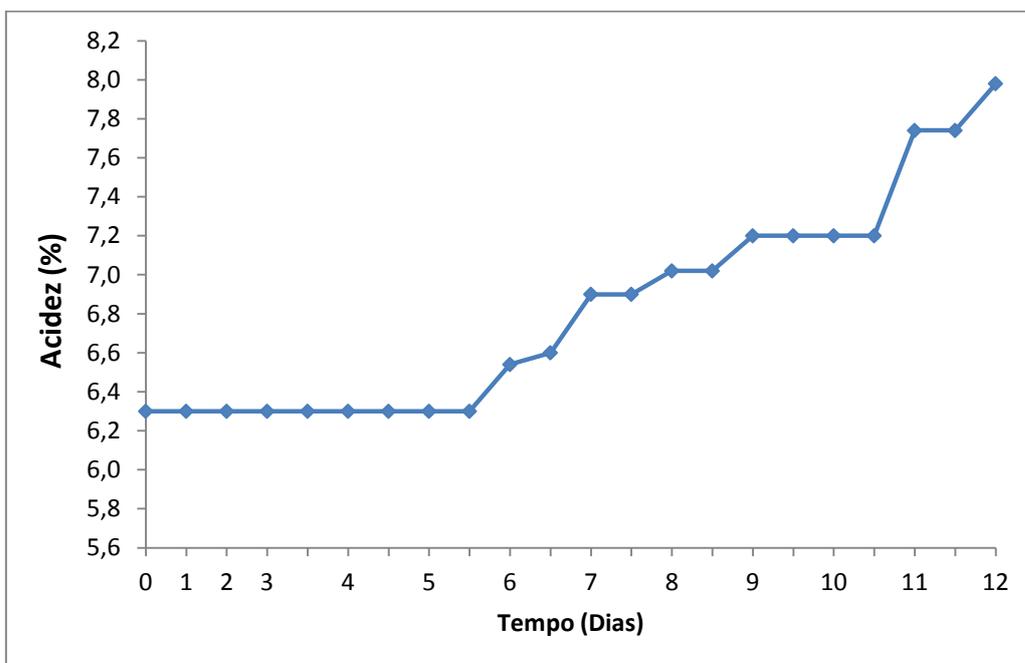


Figura 1 – Acidez em função do tempo durante a fermentação acética

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO VINAGRE À BASE DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO

Por meio da Tabela 1 é possível analisar os resultados obtidos na caracterização do vinagre de FAD, desenvolvido neste trabalho e resultados encontrados na literatura para a caracterização de vinagre de arroz e de milho.

Segundo os autores Schmoeller e Balbi(2010), o conteúdo de extrato seco total representa o material mineral e orgânico resultante da evaporação da água e substâncias voláteis da amostra. Já o extrato seco reduzido é obtido pelo valor de extrato seco total diminuído dos açúcares totais e dos sulfatos que excederem $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No vinagre de FAD, o teor de açúcares redutores e de sulfato não excederam $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, por isso não interferiram na resposta, já o teor de cinzas representa o conteúdo inorgânico, ou seja, o mineral da amostra, sendo influenciado pelo processo e matéria-prima utilizada.

Ao comparar os resultados de extrato seco reduzido obtido neste trabalho (vinagre de FAD), com os encontrados pelos autores Schmoeller e Balbi (2010), que avaliaram um vinagre de arroz comercializado em Curitiba/PR, observa-se uma similaridade nos resultados, entretanto no trabalho de Zilioli (2010), verifica-se que tanto para o extrato seco reduzido como para o teor de cinzas encontrados nos vinagres de arroz e de milho desenvolvidos pelo autor, encontram-se abaixo da legislação, sendo considerado pelo autor como um valor esperado, devido a utilização de bebidas destiladas de arroz e milho como substrato. No vinagre desenvolvido neste trabalho observamos um valor superior ao permitido pela legislação no teor de cinzas, segundo autor Pedroso (2003) isso pode ocorrer devido ao fato de os vinagres produzidos em laboratório não passarem por um processo de filtração mais rigoroso e por um sistema de clarificação.

A acidez volátil representa o valor de ácido acético presente no vinagre, sendo que conforme a legislação (BRASIL, 2012), esse resultado deve ser superior a 4,0 g de ácido acético em 100mL de vinagre. Ao analisar a acidez do vinagre de milho e arroz, encontrada pelos autores Marques et al. (2009), em vinagre de arroz e milho comercializados na cidade de Assis, SP, observa-se que esses produtos não poderiam ser denominados de vinagre, por apresentarem acidez inferior ao mínimo exigido, isso pode ser devido a diluição do vinagre originado logo após o término da fermentação acética, o qual geralmente apresenta valores de acidez próximo a 7,0%, assim como os resultados encontrados neste trabalho e nos obtidos para os vinagres de milho e arroz dos autores Zilioli (2010) e Schmoeller e Balbi (2010), que variaram de 6,34 a 8,32%, valores que encontram-se de acordo com a legislação vigente.

O teor alcoólico do vinagre determina a eficiência da fermentação acética, onde o etanol é convertido em ácido acético, sendo que no produto final pode-se obter no máximo 1,0 % v/v de teor alcoólico no vinagre. No vinagre de FAD produzido neste trabalho, o teor alcoólico foi de 0,00%. No estudo realizado pelos autores Marques et al. (2009), o grau alcoólico dos vinagres também ficaram em 0%, sendo que segundo

os autores esses resultados podem ter sido encontrados devido a baixa sensibilidade do método empregado.

Tabela 1 – Resultados obtidos na caracterização do vinagre de farelo de arroz desengordurado.

Análise	Cinzas (g·L ⁻¹)	Extrato Seco Reduzido (g·L ⁻¹)	Teor Alcoólico (%v/v)	Acidez Volátil (g de ácido acético·100mL)
Vinagre de cereal - FAD ^a	7,29±0,601	8,40±0,04	0,00	7,2±0,03
Vinagre de cereal - arroz ^b	0,48	1,20	0,40	8,32
Vinagre de cereal - arroz ^c	-	7,46	-	6,34
Vinagre de cereal - arroz ^d	3,75±0,116	14,3±0,302	0,00	3,70±0,325
Vinagre de cereal - milho ^d	0,91±0,018	5,30±0,272	0,00	3,75±0,081
Vinagre de cereal - milho ^b	0,29	1,18	0,20	7,50
Legislação^e	1 a 5	Mínimo 7,0	Máximo 1,0	Mínimo 4,0

^a Média de triplicatas ± desvio padrão; ^b Zilioli (2010); ^c Schmoeller e Balbi (2010); ^d Marques et al. (2009)

^e Valores baseados na legislação para vinagres de cereais (BRASIL, 2012).

4 CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos na caracterização do vinagre de FAD, verifica-se que o mesmo não atendeu a legislação somente no critério de teor de cinzas, o qual pode ser reduzido com a utilização de um processo de clarificação, já os demais critérios ficaram de acordo com a legislação vigente, mostrando que o farelo de arroz desengordurado apresenta potencial para ser utilizado como substrato na produção de vinagre, representando uma inovação tecnológica no segmento de fermentação, entretanto torna-se necessário mais estudos na etapa de clarificação do vinagre e na tentativa de otimizar a etapa de fermentação acética, com a redução no tempo de ativação das bactérias acéticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MR (1985) **Vinegar**. In **Microbiology of fermented foods**. Vol I (Wood, J.B.Brian Ed.). Elsevier Applied Science Pub. pp 1–47.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia na produção de alimentos**. Vol. 4. Editora Blücher, São Paulo, 2001, 523p.

BELLINI, Z. M. **Caracterização bioquímica dos vinagres brasileiros**. 2006. 98f. Tese (Mestrado em ciência de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Campinas –SP.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 06, de 03 de abril de 2012**. Aprova o manual operacional de bebidas e vinagres. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 de outubro de 2012, Seção 1, p. 11

MARQUES, P.P. Fabíola; SPINOSA, Wilma; FERNANDES, F. Kátia; CASTRO, F. S. Carlos; CALIARI, Márcio. Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, 30(Supl.1): 119-126, maio 2010.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. of Biol. Chem.**, v. 153, p. 375-380, 1944.

PEDROSO, P. F. R. **Produção De Vinagre De Maçã Em Biorreator Airlift**. 2003. 72f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

Rafaela Kropzak SCHMOELLER, K. Rafaela; BALBI, E. Maria. Caracterização e controle de qualidade de vinagres comercializados na região metropolitana de Curitiba/PR. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.11, n.2, Jul. - Dez./2010

SACHS, L.G. **Tecnologia dos produtos agropecuários – Transformações de produtos vegetais**. FFALM, Bandeirantes, Pp.58-73, 1990.

SOMOGYI, M.A. A New Reagent for the Determination of Sugars. **J of Biol.Chem**, v. 160, p. 61-68, 1945.

SUMAN, A. Priscila. **Processo de Obtenção de vinagre de gengibre**. 2012. 92f. Dissertação (Mestre em Agronomia) - Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) campus Botucatu, SP

ZILIOI, Estêvão. **Composição química e propriedades funcionais no processamento de vinagres.** Tese (doutor em Ciência dos Alimentos), na universidade de Campinas (UNICAMP). Campinas, SP, 2011.