

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro Tecnológico
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**PRODUÇÃO DE VINAGRE DE MAÇÃ EM
BIORREATOR *AIRLIFT***

Dissertação submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau
de Mestre em Engenharia Química

Paula Regina Ferraz Pedroso

Florianópolis, 28 fevereiro de 2003.

Aos meus pais, Rubens e Derli pelo apoio e incentivo; aos meus irmãos, com muito carinho.

*Ao meu noivo Paulo
pelo carinho e companheirismo.*

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao professor Agenor Furigo Junior, pela dedicação e amizade durante a orientação;

Ao professor Jorge Luiz Ninow pelas informações e pelo acompanhamento deste trabalho;

À Indústria de Vinagre e Plásticos Heinig na pessoa de Hermes Humberto Heinig Filho (Chico) pela atenção e informações cedidas;

Ao professor José Antônio Ribeiro de Souza juntamente com a Dr^a. Márcia Regina da Silva Pedrini, por comporem a banca examinadora;

A todos os amigos do Engebio em especial à Mariana e à Carol, professores, funcionários, alunos de graduação e pós-graduação pelo agradável ambiente de trabalho;

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Simbologia	ix
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
Capítulo 1	
INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Histórico	4
2.2 Definição e tipos de vinagre	5
2.3 Processos de fabricação	7
2.3.1 Processo de Orleans	7
2.3.2 Processo Alemão	8
2.3.3 Processos Submersos	9
2.3.4 Processamento final do vinagre	11
2.4 Bactérias acéticas	13
2.5 Composição do vinagre	14
2.5.1 Ácido acético	14
2.5.2 Álcool etílico (etanol) residual	14
2.5.3 Extrato seco	15
2.5.4 Cinzas	15

2.6 Biorreatores <i>Airlift</i>	15
2.6.1 Vantagens dos biorreatores <i>airlift</i>	17
2.6.2 Aplicações dos biorreatores <i>airlift</i>	18
Capítulo 3	
MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Produção de vinagre	20
3.1.1 Matérias-primas	20
3.1.1.1 Fermentado de maçã	20
3.1.1.2 Microrganismos	21
3.1.2 Cultura acética	21
3.1.2.1 Descrição do biorreator <i>airlift</i> utilizado para a acetificação	21
3.1.2.2 Descrição do biorreator clássico utilizado para a acetificação	22
3.1.3 Meio de cultivo	23
3.2 Métodos analíticos	24
3.2.1 Amostragem	24
3.2.2 Análises físico-químicas	24
3.3 Determinação de parâmetros cinéticos	33
3.3.1 Determinação da concentração de biomassa	33
3.3.2 Velocidade específica de crescimento	33
3.3.3 Conversão de substrato em biomassa	33
3.3.4 Conversão de substrato em produto	34
3.3.5 Produtividade em ácido acético	35
3.3.6 Concentração equivalente de álcool adicionado	36
3.3.7 Concentração de álcool inicial	37
Capítulo 4	
RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
4.1 Estudos preliminares	38
4.1.1 Correlação entre acidez total e acidez volátil	38
4.1.2 Características físico-químicas do fermentado de maçã	39
4.2 Produção de vinagre de maçã	40
4.3 Análises físico-químicas dos vinagres comerciais de maçã	43

4.4 Comparação entre os vinagres comerciais e os vinagres produzidos	44
4.5 Avaliação do comportamento cinético da produção de ácido acético	45
4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos	47
4.6.1 Curva de crescimento celular	48
4.6.2 Velocidade específica de crescimento média	49
4.6.3 Fator de conversão $Y_{p/s}$	49
4.6.4 Fator de conversão $Y_{x/s}$	51
4.7 Principais resultados cinéticos e estequiométricos	53
Capítulo 5	
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	54
Capítulo 6	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
Anexo I	
Composição do vinagre - alguns itens propostos pelo <i>Codex Alimentarius</i>	60
Anexo II	
Parte do Decreto N.º 99.066 de 08 de março de 1990	62
Complementação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos (vinagres)	65
Anexo III	
Dados obtidos durante a quarta cultura	69
Anexo IV	
Algumas definições sobre as análises físico-químicas	71

Simbologia

X	concentração de biomassa [g.L^{-1}]
X_0	concentração inicial de biomassa [g.L^{-1}]
C_{eq}	concentração equivalente de álcool adicionado [g.L^{-1}]
t	tempo [dia]
$Y_{x/s}$	fator de conversão de substrato em células [g.g^{-1}]
$Y_{x/s}$ médio	fator de conversão médio de substrato em células [g.g^{-1}]
M_X	massa de células [g]
M_{XT}	massa total de células gerada no biorreator [g]
M_S	massa de álcool [g]
M_{ST}	massa total de álcool [g]
$Y_{p/s}$	fator de conversão de substrato em produto [g.g^{-1}]
$Y_{p/s}$ médio	fator de conversão médio de substrato em produto [g.g^{-1}]
M_p	massa de ácido acético [g]
M_{PT}	massa total de ácido acético gerada no biorreator [g]
P_R	produtividade em ácido acético [$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$]
P_R máx.	produtividade máxima em ácido acético [$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$]
P_R média máx.	produtividade média máxima em ácido acético [$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$]
$\mu_{\text{média}}$	velocidade específica de crescimento média [d^{-1}]
μ	velocidade específica máxima de crescimento celular [d^{-1}]
ρ_{etanol}	massa específica do etanol [g.L^{-1}]
$\rho_{\text{ác. acético}}$	massa específica do ácido acético [g.L^{-1}]

Lista de Figuras

Figura 2.1	– Recipiente usado no processo de Orleans para a produção de vinagre.	7
Figura 2.2	– Gerador para a produção de vinagre com recheio.	9
Figura 2.3	– Acetificador Frings em aço inoxidável.	11
Figura 2.4	– Esquema de biorreatores <i>airlift</i> com circulação interna (a) e externa (b).	17
Figura 3.1	– Fotografia do biorreator <i>airlift</i> utilizado para a produção de vinagre (a), e esquema do biorreator utilizado (b).	22
Figura 3.2	– Fotografia do biorreator clássico utilizado para a produção de vinagre (a), e esquema do biorreator utilizado (b).	23
Figura 4.1	– Comportamento cinético da acidez para ambos biorreatores durante a quarta cultura.	45
Figura 4.2	– Produtividade média em ácido acético durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados	47
Figura 4.3	– Curva de crescimento celular durante a quarta cultura para ambos biorreatores.	48
Figura 4.4	– Velocidade específica de crescimento média durante a quarta cultura para ambos biorreatores.	49
Figura 4.5	– Fator de conversão de álcool em ácido acético durante a quarta cultura (<i>Airlift</i>).	50
Figura 4.6	– Fator de conversão de álcool em ácido acético durante a quarta cultura (Clássico).	51

- Figura 4.7 – Fator de conversão de álcool em células durante a quarta cultura 52
(*Airlift*).
- Figura 4.8 – Fator de conversão de álcool em células durante a quarta cultura 52
(Clássico).

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	– Classificação dos vinagres brasileiros.	6
Tabela 4.1	– Acidez volátil e acidez total obtida nos vinagres prontos produzidos no biorreator <i>airlift</i> .	39
Tabela 4.2	– Acidez volátil e acidez total obtida nos vinagres prontos produzidos no biorreator clássico.	39
Tabela 4.3	– Características físico-químicas do fermentado de maçã utilizado para a acetificação.	40
Tabela 4.4	– Produtividade em ácido acético, concentração inicial de álcool, concentração equivalente de álcool adicionado e início da adição de álcool para o biorreator <i>airlift</i> .	41
Tabela 4.5	– Produtividade em ácido acético, concentração inicial de álcool, concentração equivalente de álcool adicionado e início da adição de álcool para o biorreator clássico.	41
Tabela 4.6	– Análises físico-químicas dos vinagres de maçã prontos produzidos no biorreator <i>airlift</i> .	42
Tabela 4.7	– Análises físico-químicas dos vinagres de maçã prontos produzidos no biorreator clássico.	43
Tabela 4.8	– Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de maçã.	43
Tabela 4.9	– Comparação entre as amostras de vinagres comerciais e os vinagres produzidos em ambos biorreatores.	44
Tabela 4.10	– Principais resultados cinéticos e estequiométricos obtidos durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados.	53

RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de maçã do país. Para aproveitar esse potencial foi proposto neste trabalho a utilização de um biorreator do tipo *airlift* de circulação externa para a produção de vinagre de maçã. Trata-se de uma aplicação inovadora que apresentou vantagens quando comparada ao processo clássico de produção de vinagre, especialmente de ordem econômica, devido ao aumento de produtividade. Para a produção de vinagre foram realizadas quatro culturas em biorreator *airlift* e paralelamente quatro culturas controle em biorreator clássico. Foram controladas a temperatura e a aeração durante as culturas realizadas. Houve adições de álcool comercial para o término da acetificação, pois o teor de álcool do fermentado de maçã estava baixo para esse processo. O biorreator *airlift* apresentou superioridade na produção de ácido acético quando comparado com o biorreator clássico. A produtividade média máxima de ácido acético obtida durante a quarta cultura foi de $4,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e $1,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para o biorreator clássico. Vinagres de maçã comerciais foram analisados para a obtenção de valores de referência (pH, acidez total, massa específica, cinzas, teor de álcool, acidez volátil, extrato seco). Detectou-se que alguns vinagres comerciais não atendem a legislação com relação aos teores de cinzas e extrato seco. As características físico-químicas e sensoriais dos vinagres de maçã produzidos no biorreator *airlift* e também no biorreator clássico operados em batelada, atenderam às exigências da legislação e foram comparados com os vinagres de maçã comerciais. Verificou-se que os teores de cinzas e extrato seco foram superiores aos verificados nos produtos comerciais. Parâmetros cinéticos e estequiométricos foram obtidos para os biorreatores estudados. A velocidade específica média de crescimento celular foi de $0,14 \text{ d}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e $0,10 \text{ d}^{-1}$ para o biorreator clássico. O fator de conversão médio de álcool em ácido acético para o biorreator *airlift* foi de $0,56 \text{ g.g}^{-1}$ e para o biorreator clássico foi de $0,25 \text{ g.g}^{-1}$. O fator de conversão médio de álcool em células para o biorreator *airlift* foi de $0,009 \text{ g.g}^{-1}$ e para o biorreator clássico foi de $0,006 \text{ g.g}^{-1}$. Através dos resultados obtidos durante as culturas realizadas conclui-se que um biorreator *airlift* é mais vantajoso a produzir vinagre do que um biorreator clássico, pois sua superioridade fica clara em todos os parâmetros analisados.

ABSTRACT

The state of Santa Catarina is the largest apple producer in Brazil and due to this potential this work purposes the utilization of an *airlift* bioreactor with external circulation for the production of apple vinegar. It is an innovative application that presented advantages when compared to the classical process of vinegar production, mainly economically due to the productivity increase. For the vinegar production, four cultures in an *airlift* bioreactor and another four in a classical bioreactor were carried out. Temperature and aeration were controlled during the culture experiments. Commercial alcohol was added to stop acetification, because the alcohol content of the apple fermentate was low for this process. The *airlift* bioreactor presented a higher production of acetic acid when compared to the classical one. The maximum average production of acetic acid obtained during the fourth culture was $4.2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for the *airlift* bioreactor and $1.6 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ for the classical bioreactor. Commercial apple vinegars were analyzed for obtaining the reference values (pH, total acidity, specific mass, ashes, alcohol content, volatile acidity, dry extract). It was detected that some commercial vinegars do not meet the legislation regarding to the ashes and dry extract content. The physical-chemical and sensorial characteristics of the apple vinegars produced in the *airlift* bioreactor and also in the classical bioreactor operated in batch, met the legislation standards and were compared to the commercial apple vinegars. It was verified that the ashes and dry extract content were superior to those found in the commercial products. Kinetics and stoichiometric parameters were obtained for the studied bioreactors. The cellular growth rate was 0.14 d^{-1} for the *airlift* bioreactor and 0.10 d^{-1} for the classical bioreactor. The average conversion factor of alcohol into acetic acid for the *airlift* bioreactor was 0.56 g.g^{-1} and 0.25 g.g^{-1} for the classical reactor. The average conversion factor of alcohol into cells was 0.009 g.g^{-1} for the *airlift* bioreactor and 0.006 g.g^{-1} for the classical bioreactor. Through the obtained data during the cultures carried out, it can be concluded that an *airlift* bioreactor is more advantageous to produce vinegar than a classical one because its superiority is clear in all analyzed parameters.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina lidera a produção nacional de maçã, chegando a produzir no ano de 2002 aproximadamente 474,5 mil toneladas do fruto. O município de Fraiburgo lidera, com muita vantagem, a produção de maçã em Santa Catarina e no Brasil e mantém também o destaque de principal produtor brasileiro da fruta no país (CEPA, 2003). A maior parte da produção é destinada ao mercado interno, embora recentemente o estado venha exportando. Entretanto, uma considerável parcela dos frutos, principalmente aqueles não aprovados para consumo *in natura*, são processados industrialmente para obtenção de sucos, aromas, concentrados e vinagres (FISCHER, 2001).

O vinagre é utilizado no mundo inteiro como condimento e conservante de alimentos. Além disso, é considerado um complemento indispensável à alimentação humana, pela ação nutritiva e biorregulatória (AQUARONE *et al.*, 2001). É produzido por dois processos bioquímicos distintos, ambos resultantes da ação de microrganismos: a fermentação alcoólica, pela ação de leveduras sobre matérias-primas açucaradas e amiláceas e a fermentação acética, pela ação de bactérias aeróbias do gênero *Acetobacter* (AQUARONE *et al.*, 2001).

A fabricação de vinagre proporciona um meio de utilização de matéria-prima inaproveitável dos estabelecimentos industriais de frutas e especialmente de propriedades rurais, que de outra forma, não poderiam competir no mercado (EVANGELISTA, 1989). Os vinagres de frutas são considerados superiores em qualidades sensoriais e nutritivas, quando comparados a outros tipos de vinagres, apresentando características como sabor e

aroma próprios. Sob o aspecto nutricional, têm vitaminas, ácidos orgânicos, proteínas e aminoácidos provenientes do fruto e da fermentação alcoólica (AQUARONE *et al.*, 2001).

O vinagre de maçã se destaca entre os outros tipos de vinagres por possuir grandes teores de potássio, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, flúor e silício. A presença destes componentes e do ácido málico fazem do vinagre de maçã um alimento com grande potencial medicinal (RICHWARE, 2003).

O vinagre de maçã possui ainda uma atividade bacteriana e fungicida que desempenha um papel importante na manutenção da flora intestinal. Além disso, ele contém dezenas de vitaminas, minerais, aminoácidos, enzimas e outros nutrientes importantes para a saúde como a pectina, que por ser uma fibra solúvel facilita a digestão das gorduras e proteínas (RICHWARE, 2003).

Dentre os processos industriais utilizados na produção de vinagre, o mais difundido é o que utiliza cultura submersa através de forte aeração, com acetificadores do tipo Frings. O método Orleans, mais lento, é utilizado apenas nos estabelecimentos de pequeno porte, quando o objetivo é obter um produto de melhor qualidade (AQUARONE *et al.*, 2001).

Por ser um produto de baixo valor agregado é interessante encontrar novas tecnologias que acelerem a produção de vinagre, minimizando os custos de produção com a utilização de equipamentos que ocupem menos espaço e de fácil limpeza. Pensando nisso foi proposto neste trabalho a utilização de um biorreator tipo *airlift* de circulação externa para a produção de vinagre de maçã.

O biorretar *airlift* é uma torre com elevada relação altura/diâmetro e com ligação entre o líquido do topo e da base. O gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor formando uma dispersão gás-fluido. As bolhas de gás sobem através do líquido contido na torre contatando-o e deslocando-o, provocando, assim, turbulência e uma auto-circulação dirigida. O gás é retirado no topo do equipamento. A turbulência gerada e a grande distância que as bolhas de gás devem atravessar em contato com o líquido promovem altos níveis de transferência de oxigênio, que podem proporcionar processos de produção de microrganismos em grande escala, sem limitação de oxigênio local. O biorreator *airlift* pode ter circulação interna ou externa, e é de construção fácil e barata, especialmente pela ausência de partes móveis.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (Engebio) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (EQA) da UFSC dispõe de um biorreator *airlift* com circulação externa (PEDRINI, 1997), onde foi realizada a produção de vinagre

de maçã. O desempenho do equipamento foi comparado com o do biorreator clássico na produção de vinagre nas mesmas condições de operação. Os resultados obtidos nas culturas realizadas foram comparados, através de análises físico-químicas, com vinagres comerciais de maçã.

O objetivo principal desse trabalho é o estudo da viabilidade de produção de vinagre de maçã em biorreator *airlift* como uma nova tecnologia a ser aplicada. São avaliadas a produtividade média de ácido acético em cada biorreator, a velocidade específica de crescimento, o fator de conversão de substrato em células e substrato em produto. Os resultados são comparados com um biorreator clássico que simula o processo de produção de vinagre comumente utilizado em indústrias.

Objetiva-se ainda a realização de análises físico-químicas em vinagres comerciais de maçã e vinagres produzidos em laboratório, para a avaliação de suas características quanto à legislação.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Desde os tempos mais remotos o vinagre já era conhecido. Originalmente obtido pela fermentação espontânea do vinho, outras bebidas fermentadas e de mostos de frutas deixados ao ar (SACHS, 1990; AQUARONE *et al.*, 2001). A palavra vinagre deriva de *vinaigre* do francês, substantivo que designa vinho azedo (SACHS, 1990; AQUARONE *et al.*, 2001; MORETTO *et al.*, 1988). Os povos antigos usavam o vinagre não só como condimento, mas também no preparo de bebidas, refrigerantes, na conservação de alimentos e até como medicamento e cosmético (MORETTO *et al.*, 1988).

A fermentação alcoólica seguida da acética se produz espontaneamente sobre qualquer substrato açucarado exposto ao pó e aos insetos que transportam leveduras e bactérias. A acetificação também se realiza espontaneamente em vinhos e sidras de baixos teores de álcool expostos ao contato com o ar (SACHS, 1990).

Na antiga China, o jarro com vinagre era tido como símbolo da vida. Já há 5.000 anos, os egípcios, babilônios, indianos, gregos e persas conheciam a arte da fabricação do vinagre e sua versatilidade. O vinagre era mais do que um tempero picante para os alimentos, era o único meio de conservar a carne, o peixe e os legumes. Somente assim os alimentos perecíveis podiam ser transportados por longas distâncias (HEINIG, 2000).

Não somente os legionários romanos, mas também os soldados, agricultores e viajantes, até a Idade Média, bebiam água com vinagre para matar a sede e para o bem de

sua saúde (HEINIG, 2000). Existem relatos na Bíblia, de que uma esponja embebida em vinagre foi dada a Jesus, quando crucificado, para lhe aliviar a sede, pois o vinagre inibe as papilas gustativas temporariamente aliviando assim a sensação de sede por algum tempo (CASTELO, 2002).

Diversos estudiosos se interessaram pelo estudo do vinagre ainda que, somente no século XVIII, alguns resultados mais próximos da realidade tenham sido publicados.

Backer, na segunda metade do século XVII, foi o primeiro a constatar que o ar era imprescindível para a obtenção do vinagre (AQUARONE *et al.*, 2001).

Já em 1837, Kutzing, um botânico alemão, verificava a responsabilidade do microrganismo na formação de ácido acético e relatava suas experiências sobre a “mãe do vinagre” (AQUARONE *et al.*, 2001).

Berzéliu, químico prestigiado do século XVIII, afirmava em 1839 que a transformação de etanol a ácido acético não passava de processo exclusivamente químico de ordem catalítica (AQUARONE *et al.*, 2001).

Pasteur, entre 1864 e 1868 demonstrou, com detalhes em sua obra sobre o vinagre, a necessidade da presença de um ser vivo, segundo ele, *Mycoderma aceti* para a ocorrência da acetificação (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.2 Definição e tipos de vinagre

Uma definição bem geral de vinagre é que o mesmo consiste no alimento do grupo dos condimentos obtido por fermentação alcoólica de matérias-primas açucaradas ou amiláceas, seguida de fermentação acética (AQUARONE *et al.*, 2001).

Denominam-se vinagres a todos os produtos resultantes da fermentação acética de diversos substratos alcoólicos, adicionando ao nome do vinagre o do substrato correspondente. Os vinagres devem conter quantidades determinadas de ácido acético (ANEXO I) e ingredientes opcionais tais como ervas, especiarias, sal e outros, conforme especificação do Codex Alimentarius, em quantidades suficientes para conferir um sabor e aroma peculiares.

A legislação brasileira define que vinagre ou vinagre de vinho é o produto obtido da fermentação acética do vinho (BRASIL, 1990, 1988) e deve conter uma acidez volátil mínima de 40 g por litro expressa em ácido acético (4%). Sua graduação alcoólica não pode exceder a 1ºGL e deve ser obrigatoriamente pasteurizado. Um vinagre com mais

de 80 g por litro de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição (BRASIL, 1990).

A legislação especifica ainda as seguintes características organolépticas para os vinagres (BRASIL, 1974) (ANEXO II):

Aspecto: líquido, límpido e sem depósito.

Cor: de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem.

Cheiro: característico.

Sabor: ácido.

No Brasil, não é permitida a fabricação e venda de vinagre artificial, isto é, vinagre produzido a partir da diluição do ácido acético obtido a partir da síntese do etileno ou da destilação seca da madeira (BRASIL, 1990).

A classificação dos vinagres brasileiros é feita de acordo com a Tabela 2.1:

Tabela 2.1 - Classificação dos vinagres brasileiros (BELMONT, 2002).

Tipo de vinagre	Características
Vinagre de vinho tinto	-obtido através da fermentação acética do vinho tinto
Vinagre de vinho branco	-obtido através da fermentação acética do vinho branco
Vinagre de maçã	-obtido através da fermentação acética do vinho de maçã
Vinagre de álcool	-obtido através da fermentação acética do álcool

A produção de um bom vinagre depende de uma série de fatores como (CASTELO, 2002):

- a linhagem e a seleção do microrganismo;
- a matéria-prima;
- a concentração do álcool;
- a temperatura de fermentação (na faixa de 20° a 30°C);
- a quantidade de O₂;
- pH ótimo na faixa de 5 e 6;
- a maturação e a conservação;
- a clarificação, o envase, a pasteurização;
- materiais de construção de tubulações, recipientes e depósitos.

2.3 Processos de fabricação

Os principais processos industriais utilizados para a fabricação de vinagres são baseados nos métodos de Orleans, Alemão ou submerso.

2.3.1 Processo de Orleans

Conhecido também como lento, superficial ou estacionário, é o processo mais antigo (surgiu em 1670) utilizado até hoje para a fabricação caseira de vinagre. Produz vinagre de excelente qualidade empregando somente fermentado como matéria-prima (BELMONT, 2002).

A Figura 2.1 esquematiza os recipientes utilizados para a obtenção de vinagre de vinho por esse processo.

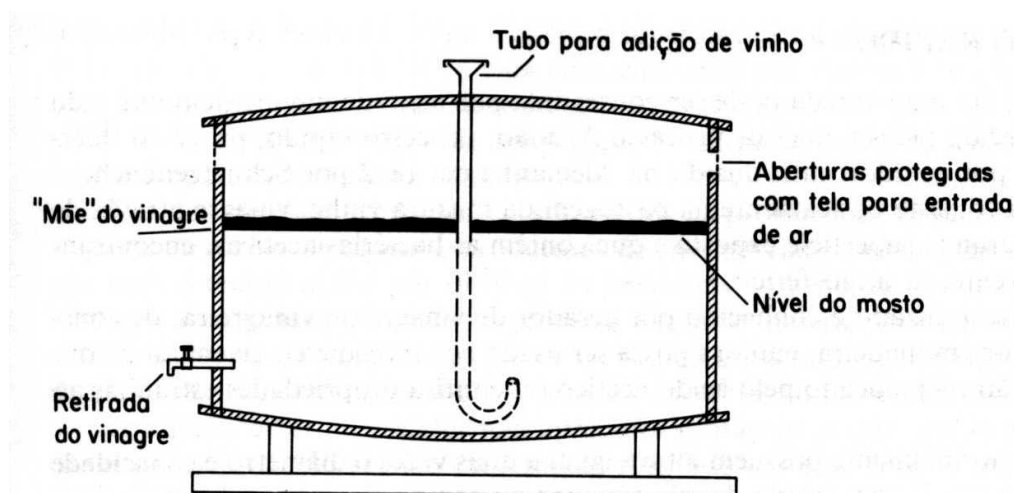


Figura 2.1 - Recipiente usado no processo de Orleans para a produção de vinagre (AQUARONE *et al.*, 2001).

O vinagre é elaborado em barris de mais ou menos 200 litros, furando-o na parte superior, fazendo-se alguns orifícios para a entrada de ar. O procedimento consiste em colocar no barril cerca de um terço de sua capacidade com vinagre, vai-se adicionando quantidades de vinho ou o fermentado de fruta entre 10 a 15 litros por semana, durante um mês. Ao fim de cinco semanas se extraem aproximadamente 20 litros de vinagre, substituindo-se por outro tanto de vinho novo, repetindo-se desta forma o processo ao longo do tempo (CASTELO, 2002).

O vinagre retirado não deve conter mais que 1°GL e, caso o teor de álcool esteja mais alto, deve-se aguardar mais alguns dias de fermentação (AQUARONE *et al.*, 2001).

A temperatura ambiente para este processo não deve exceder 25°C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação. Todas as entradas e janelas do prédio, assim como as aberturas do barril, devem ser protegidas com telas finas para evitar a presença de moscas e outros insetos que são atraídos pelos odores dos vinagres (AQUARONE *et al.*, 2001).

O produto formado pelo processo lento é um vinagre de boa qualidade, praticamente limpo, que dispensa filtração ou clarificação. No entanto, este tipo de processamento é de baixa produtividade, ocupa muito espaço e atualmente é usado exclusivamente para a produção doméstica. No caso, o fator limitante para a quantidade produzida é o fornecimento de oxigênio, já que este equipamento não conta com nenhum tipo de aerador.

2.3.2 Processo Alemão

Os processos rápidos são bastante utilizados atualmente. Foram idealizados por Boerhave no começo do século XVIII, ao descobrir que a transformação do vinho de maçãs em vinagre era bastante rápida quando deixava passar o vinho, através de um recipiente cheio de bagaços de maçã (AQUARONE *et al.*, 2001). Atualmente são utilizados recipientes geradores, empacotados com material de enchimento dos mais diversos (por exemplo, a madeira). As bactérias acéticas colonizam a superfície do material e oxidam etanol a ácido acético.

A matéria-prima é recirculada desde a parte inferior da tina até a parte superior. Este material passa pela madeira, sabugo ou carvão, onde as bactérias acéticas ficam fixadas, transformando o conteúdo alcoólico em ácido acético. A recirculação ocorre quantas vezes forem necessárias até a total transformação (CASTELO, 2002).

Uma vez ocorrido o processo total, se descarrega a metade da tina de depósito, voltando a introduzir a mesma carga de vinho base.

Um problema deste tipo de equipamento é que o material de enchimento acaba tendo que ser totalmente substituído a cada ano, pois as bactérias formam um material gelatinoso que obstrui a passagem da mistura (CASTELO, 2002).

Por este processo se obtém um vinagre bom, porém com baixo rendimento. A Figura 2.2 mostra o gerador utilizado para a produção de vinagre.

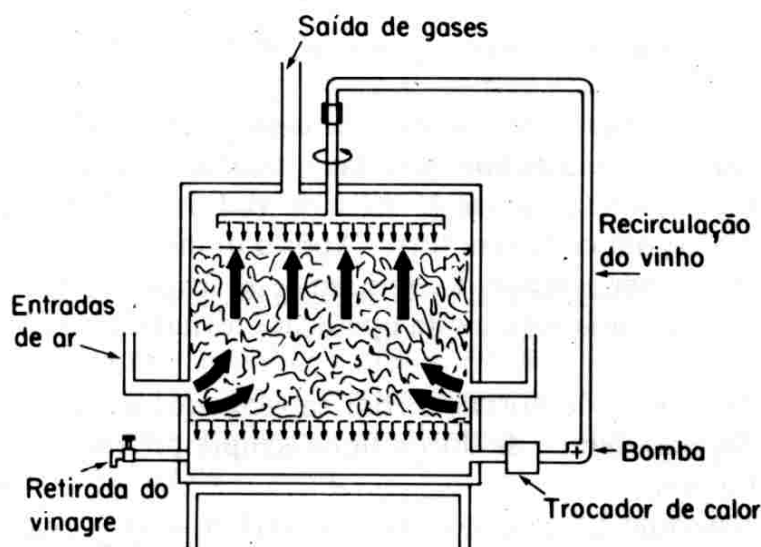


Figura 2.2 - Gerador para a produção de vinagre com recheio (AQUARONE *et al.*, 2001).

Os geradores têm tamanho e formas diferentes. O tamanho varia entre 15 a 30 cm de diâmetro por 20 a 60 cm de altura. Geralmente são de forma cilíndrica e têm, no fundo, um suporte perfurado que sustenta o material de enchimento. Pelos orifícios de suporte, passa o ar a ser utilizado na oxidação. O material de enchimento deve formar grande superfície, para permitir o contato íntimo entre líquido e ar, facilitando as trocas, sendo utilizadas fibras de coco, carvão-coque, sabugo de milho ou outras. Sobre o material de enchimento descansa uma placa crivada, para permitir uma perfeita distribuição do vinho que cai de um torniquete hidráulico ou de um bico aspersor, colocado na parte superior (AQUARONE *et al.*, 2001).

A acidez aumenta progressivamente conforme o líquido vai sendo passado, sucessivamente, duas ou três vezes pelo mesmo gerador ou através de geradores em série. Sendo o processo exotérmico, o líquido deve ser resfriado antes de entrar novamente para o gerador (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.3.3 Processos Submersos

Surgiram em 1950. O método se baseia em manter a cultura de bactérias acéticas submersas no vinho a acetificar, com um suprimento abundante de ar. Após a

acetificação da matéria-prima, é feita a descarga de uma parte de vinagre, sendo repostada com uma parte de vinho, sem parar o processo. O processo de transformação leva em média 20 horas (CASTELO, 2002).

O substrato alcoólico, por esse processo, pode ser fermentado trinta vezes mais rapidamente que por qualquer outro processo. Neste processo, o ar deve ser controlado cuidadosamente, pois um decréscimo da pressão parcial de oxigênio altera o metabolismo bacteriano (AQUARONE *et al.*, 2001).

O processo de acetificação é exotérmico e assim, deve permitir, através de serpentina, a dissipação térmica, possibilitando, dessa forma, o controle da temperatura dentro de uma faixa conveniente. O ótimo de temperatura de fermentação depende da concentração do substrato, sendo a mesma por volta de 28°C. Um disco giratório no espaço livre do tanque evita a formação de excessiva espuma (CASTELO, 2002).

O processo de fermentação submersa apresenta uma série de vantagens:

Alta eficiência: diariamente podem-se produzir cerca de 6% ou mais, de vinagre;

Rendimentos: calculados em relação ao teórico, alcançam de 90 a 95%;

Praticidade: dispensa tratamentos de clarificação e de filtração, via de regra, onerosos e demorados.

O equipamento mais utilizado para a produção de vinagre em cultura submersa é conhecido pelo nome de acetificador de Frings, fabricado e patenteado pela Heinrich Frings-Bonn, Alemanha (AQUARONE *et al.*, 2001).

A produtividade média desses acetificadores é igual a $\frac{1}{4}$ de seu volume útil em litros de vinagre a 10% ao dia (AQUARONE *et al.*, 2001).

A Figura 2.3 mostra o acetificador Frings em aço inoxidável utilizado na produção de vinagre.

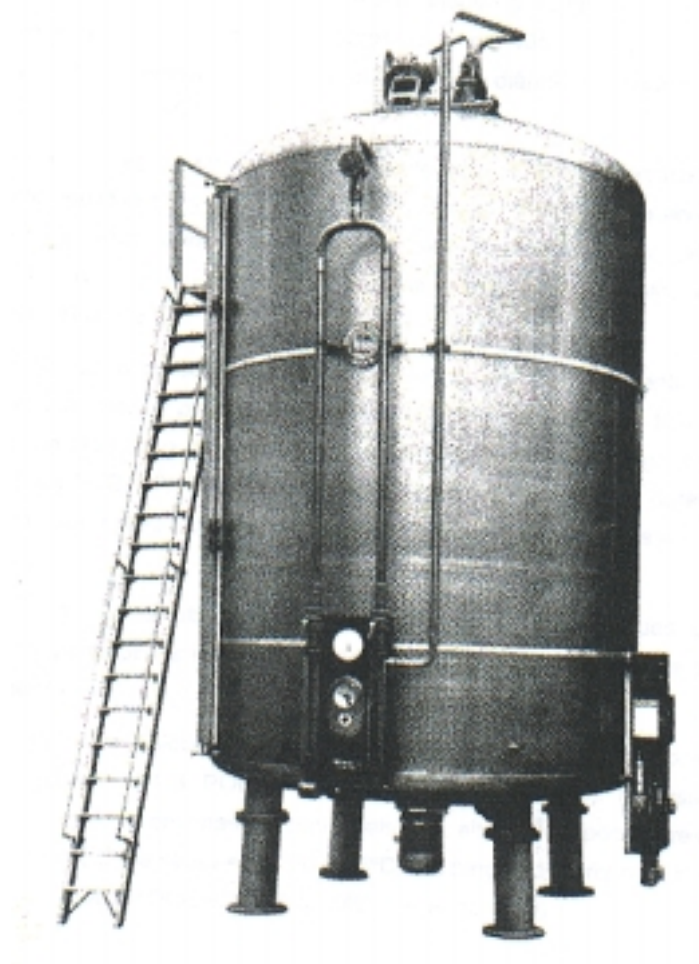


Figura 2.3 - Acetificador Frings em aço inoxidável (TAKEMOTO, 2000).

2.3.4 Processamento final do vinagre

Antes de se colocar o produto para a comercialização este deve receber alguns tratamentos para melhorar e dar estabilidade ao produto final. Isto inclui o armazenamento após a fermentação, os processos de clarificação, filtração, envelhecimento, estabilização e envase.

Após o término da fermentação, o vinagre não deve permanecer na vinagreira, pois se isto ocorrer as bactérias não tendo mais álcool para metabolizar, começam a oxidar o ácido acético, enfraquecendo o vinagre (SACHS, 1990). Sendo assim o vinagre já devidamente fermentado deve ser acondicionado em recipientes apropriados e serem mantidos sem o contato com o ar, pois sem oxigênio as bactérias são inibidas (SACHS, 1990).

A operação de clarificação pode ser feita por diversos processos: espontânea ou autoclarificação; físico-química, química ou desmetalização; mecânica, através de substâncias orgânicas e inorgânicas usadas como clarificantes (albumina, argilas, bentonita, caseína entre outras) (SACHS, 1990, AQUARONE *et al.*, 2001).

A filtração pode ser definida como a separação de impurezas e de microrganismos do líquido com a ajuda de um material filtrante. É a operação que permite obter um vinagre límpido e brilhante (AQUARONE *et al.*, 2001).

Os tipos de filtração mais utilizados são, filtração a cartucho; filtração com extrato filtrante; membrana filtrante; filtro rotativo a vácuo e filtração por meio de fibras vegetais (AQUARONE *et al.*, 2001).

De acordo com a matéria-prima utilizada, vinho ou suco de frutas, o vinagre deve ser envelhecido por um tempo superior, às vezes, um ano. Durante esse tempo, ocorrem reações de esterificação, responsáveis pelo desenvolvimento de aromas agradáveis (AQUARONE *et al.*, 2001).

Com o envelhecimento o vinagre adquire um sabor e aroma mais suave perdendo a aspereza característica do produto novo (SACHS, 1990).

A etapa de estabilização do vinagre permite manter suas características físico-químicas e organolépticas durante o período de comercialização. Pode ser feita por métodos físicos ou químicos.

Os métodos físicos mais usados na indústria vinagreira são a pasteurização e a ultrafiltração. A pasteurização consiste em tratar o vinagre a temperaturas variáveis de 50 a 80°C de modo a destruir totalmente os microrganismos e desativar as enzimas que são predominantemente a causa mais importante das alterações (oxidação do ácido acético) do vinagre. O tratamento do vinagre mediante calor pode ser uma alternativa eficaz e segura para uma melhor conservação do produto (AQUARONE *et al.*, 2001).

A pasteurização do vinagre pode ocorrer de duas maneiras:

- rápida ou alta: 75-80°C por 30-40 segundos;
- baixa ou lenta: 50-65°C por alguns minutos (20 a 30).

Os métodos químicos consistem na adição de substâncias que auxiliam na estabilização do vinagre. A legislação brasileira prevê como forma de estabilização do vinagre o uso de dióxido de enxofre (ANEXO II), num teor máximo de 0,02 g por 100 mL de vinagre de vinho.

O vinagre deve ser embalado em material resistente que não sofra corrosão e que não transmita cor ou odores desagradáveis ao produto, geralmente são utilizadas

garrafas de vidro, PVC ou polietileno, fechadas com tampas plásticas. Após o envase, é feita uma pasteurização a 60- 66°C, durante 30 min. Pode-se também fazer a pasteurização contínua e embalar subsequente (AQUARONE *et al.*, 2001).

A retirada do ar é essencial para garantir a preservação do produto. Uma clarificação adequada, boa filtração, pasteurização e adição de conservantes são os parâmetros que definem a quantidade de ar a ser retirada no momento do envase (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.4 Bactérias acéticas

A fermentação acética é realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*, pertencentes à família Pseudomonaceae (AQUARONE *et al.*, 2001).

Na fermentação acética o etanol é oxidado a ácido acético. Essa etapa é feita por bactérias acéticas em meio aeróbio (SACHS, 1990). Além do ácido acético são produzidas pequenas quantidades de outros produtos como aldeídos, cetonas, ésteres e outros ácidos orgânicos, sendo o acetaldeído o composto secundário predominante (SACHS, 1990).

Para a fermentação acética não é comum o uso de culturas puras. Emprega-se uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada a mais eficiente (AQUARONE *et al.*, 2001, SACHS, 1990).

Assim, após o término da fermentação alcoólica, inocula-se o vinho com essa mistura de bactérias úteis e ativas adicionando “vinagre forte”, que é o vinagre não diluído e não pasteurizado de uma fermentação anterior, contendo altas concentrações de bactérias acéticas (AQUARONE *et al.*, 2001).

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, produzir concentrações elevadas de ácido acético; não formar material viscoso; de preferência, não ter capacidade para completar a oxidação até anidrido carbônico e água; ter tolerância a concentrações razoáveis de ácido acético; trabalhar em temperaturas entre 25°C e 30°C (SACHS, 1990).

As bactérias do gênero *Acetobacter* são bastonetes elipsoidais, retos ou ligeiramente curvos. Quando jovens são gram-negativas e as células velhas são gram-variáveis. Apresentam a capacidade para oxidar a molécula do etanol e do ácido acético a

CO₂ e H₂O. Formam película ou crosta na superfície da cultura, vulgarmente chamada de “mãe do vinagre”, de onde partem os repiques. Essas películas variam de acordo com a espécie, podendo ser delgadas, espessas, contínuas ou em ilhas (AQUARONE *et al.*, 2001).

São comumente encontradas em frutas e vegetais e estão envolvidas na acidificação bacteriana de sucos de frutas e bebidas alcoólicas, cerveja, vinho, produção de vinagre e fermentação de sementes de cacau (SACHS, 1990).

De acordo com os autores mais modernos, são de interesse industrial: *Acetobacter aceti*, *A. xylinoides*, *A. orleanense*, *A. acetigenum*, *A. schuetzenbachii*, *A. curvum* e *A. rances* (AQUARONE *et al.*, 2001).

Descrições clássicas desses microrganismos informam que *A. aceti* suporta 11% de álcool e produz 6,5% de ácido acético; sua temperatura ótima de crescimento é 34°C entre extremos de 5°C e 42°C; *A. orleanense* tem um ótimo entre 20°C e 25°C, e os extremos são 15°C e 30°C (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5 Composição do vinagre

A composição característica de um vinagre depende basicamente da matéria-prima que o originou. Os vinagres obtidos de frutos ou de malte possuem composição mais complexa que o vinagre de álcool por conter praticamente todas as substâncias solúveis existentes na matéria-prima ou que se formaram nos processos fermentativos alcoólico e acético (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5.1 Ácido acético

O ácido acético (H₃C – COOH), peso molecular 60,05616 e densidade 1,049 g/mL, é o componente principal dos vinagres quaisquer que sejam o substrato alcoólico precedente e sua concentração é expressa em graus acéticos (gramas de ácido acético por 100 mL de vinagre) (AQUARONE *et al.*, 2001).

2.5.2 Álcool etílico (etanol) residual

Na fabricação industrial do vinagre objetiva-se alcançar o maior rendimento possível na transformação de etanol em ácido acético. Porém não se deve chegar ao esgotamento desse substrato pois as bactérias acéticas, na ausência de álcool etílico, são capazes de promoverem a degradação do ácido acético produzido, o que torna o processo antieconômico (AQUARONE *et al.*, 2001).

No Brasil, a legislação estabelece um teor máximo de 1°GL de álcool residual para os vinagres (BRASIL, 1990).

2.5.3 Extrato seco

A determinação do extrato seco de vinagres é uma tentativa de evitar fraudes bastante utilizadas no passado, já que teores muito baixos ou muito altos de extrato seco podem indicar adulterações do produto (TAKEMOTO, 2000).

No Brasil, a legislação estabelece um valor mínimo de 7 g.L⁻¹ para vinagres de vinho tinto e rosados e 6 g.L⁻¹ para vinagres de vinho branco (BRASIL, 1990).

2.5.4 Cinzas

A determinação do teor de cinzas objetiva determinar os sais minerais contidos no produto. As considerações para o teor de cinzas são análogas para o teor de extrato seco dos vinagres. Um vinagre diluído e reconstituído parcialmente com ácido acético apresenta baixos valores para o teor de cinzas assim como valores muito altos podem indicar a adição de substâncias não voláteis (TAKEMOTO, 2000).

A legislação brasileira estabelece um valor mínimo de 1 g.L⁻¹ (BRASIL, 1990).

2.6 Biorreatores *Airlift*

Biorreatores, freqüentemente chamados de fermentadores, são recipientes entre os quais microrganismos, plantas, células animais, e enzimas podem realizar seu trabalho. O sucesso deste processo depende em manter o próprio ambiente para crescimento e reação (CHISTI, 1989).

Muitos processos biológicos requerem oxigênio; devido a sua baixa solubilidade um abastecimento contínuo é requerido a taxas suficientes para manter a reação porém, quando existe uma limitação no processo como, por exemplo, a necessidade de uma maior transferência de massa gás-líquido, outros tipos de biorreatores, tais como os tipos *airlift*, são considerados (CHISTI, 1989).

Os biorreatores *airlift* são reatores pneumáticos. Eles são diferentes de outro reator pneumático comumente usado, o coluna de bolhas. Os biorreatores *airlift* compreendem quatro zonas distintas, cada uma delas com modelo distinto de fluxo, as quais dividem o reator entre duas zonas de escoamento (uma direcionada para cima e outra para baixo). As zonas ou canais possibilitam a circulação de líquido em grande escala ao redor do corpo do reator (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

A primeira zona de expansão de gás é denominada *riser*, onde o gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor, formando uma dispersão gás-líquido. As bolhas de gás sobem através do líquido contatando-o e deslocando-o. Essa seção tem maior *gas-holdup* (fração volumétrica de gás na zona de dispersão) e é onde ocorre a maior transferência de massa. O líquido deixa o topo do *riser* e entra na zona de desprendimento do gás e, com uma menor quantidade de gás, escoam em sentido contrário através do *downcomer* até o fundo do reator, retornando ao *riser*. Assim, a fase líquida circula continuamente no reator (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Os *airlifts* são geralmente divididos em dois tipos de reatores, baseados em sua estrutura física: os de circulação interna e os de circulação externa. Os de circulação interna são tanques com divisões dentro da coluna de bolhas, de maneira a criar zonas de escoamento. Nos *airlifts* com circulação externa, o *riser* e o *downcomer* são conectados por seções horizontais perto do topo e da base para criar a recirculação do líquido (CHISTI, 1989; SIEGEL & ROBINSON, 1992).

A Figura 2.4 mostra um esquema de biorreatores *airlift* com circulação interna e externa.

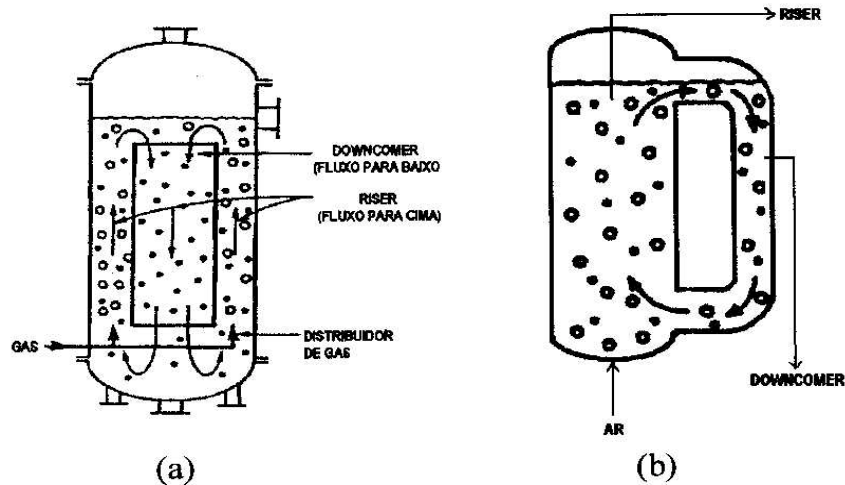


Figura 2.4 – Esquema de biorreatores *airlift* com circulação interna (a) e externa (b) – adaptado de CHISTI, 1989 (ROSSI, 2001).

Uma diferença fundamental entre os dois tipos de *airlifts* é o modelo do separador de gás- líquido. No *airlift* de circulação interna, o separador de gás-líquido é usualmente simples com uma extensão sobre o *riser* e o *downcomer*, permitindo um pequeno desprendimento de gás. No *airlift* de circulação externa o separador de gás-líquido tem uma região de fluxo horizontal, que permite maior desprendimento de gás e uma maior velocidade de circulação (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

2.6.1 Vantagens dos biorreatores *airlift*

Os biorreatores *airlift* são considerados uma importante classe de biorreatores de coluna de bolhas modificados (VIAL *et al.*, 2002). Eles têm recebido atenção devido a sua simplicidade de projeto e construção, versatilidade, fácil operação, menor possibilidade de contaminação, baixo consumo de energia e altas taxas de transferência de massa e calor (YUGUO *et al.*, 2000, VIAL *et al.*, 2002).

A simples construção dos biorreatores *airlift* possibilita uma manutenção fácil e barata. Como não existem partes mecânicas móveis necessárias para a agitação, há redução do perigo de contaminação, pois facilita a limpeza e a esterilização. A injeção do gás serve para agitar e aerar, eliminado o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Em processos biológicos, a vantagem do biorreator *airlift* sobre os reatores de

coluna de bolhas e os STRs (reatores de tanque agitado) está relacionada com o fato de a força de cisalhamento imposta pelo campo turbulento nas células ou *pellets* suspensos no meio ser muito menor em biorreatores *airlift*. Um aspecto bastante importante é que o campo de cisalhamento é mais homogêneo nos biorreatores *airlift*, sendo relativamente constante através do biorreator (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Os biorreatores *airlift* são usados preferencialmente em aplicações bioquímicas: microrganismos e células poder ser afetados pelas forças de cisalhamento de alguns processos causando um stress a esses organismos. Os reatores *airlifts* correspondem a um nível de cisalhamento mais tolerante a estes organismos e, portanto se torna o processo mais indicado (VIAL *et al.*, 2002). BONNARME *et al.*, (1993) relatam a superioridade dos biorreatores *airlift* e coluna de bolhas em relação ao de tanque agitado, na produção de metabólitos por microrganismos sensíveis ao cisalhamento provocado pelos agitadores mecânicos.

Apesar das vantagens apresentadas, a aplicação dos biorreatores *airlift* em escala de produção em indústrias bioquímicas ainda é limitada. Os *airlifts* são menos flexíveis às mudanças de processo que os STR, uma vez que os parâmetros geométricos são selecionados para um determinado processo durante o projeto; a velocidade do fluxo de gás é, em princípio, o único parâmetro de ajuste durante a operação. Portanto, os *airlifts* são menos adaptáveis a outros processos com necessidades muito diferentes de mistura e agitação, distribuição de gás e características de transferência de massa, do que os STR que apresentam a vantagem de ter controles independentes de aeração e agitação (CHISTI, 1989).

2.6.2 Aplicações dos biorreatores *airlift*

Muitas aplicações em escala de bancada e em escala piloto têm sido estudadas para uma variedade de microrganismos e culturas celulares. A maioria enfoca a cinética de crescimento em vez do fenômeno de transporte durante as fermentações. Conseqüentemente, pouca informação sobre a hidrodinâmica básica e sobre o transporte de massa encontra-se disponível para um projeto de reator ideal e *scale-up* (SIEGEL & ROBINSON, 1992).

Alguns autores estudaram o *airlift* como um biorreator potencial para o tratamento de vários resíduos. HUPPE *et al.*, (1990) utilizaram uma planta piloto de dois estágios para tratar biologicamente efluentes de refinaria de carvão. TYAGI *et al.*, (1990) utilizaram um

airlift com circulação externa para estudar a digestão aeróbica mesofílica e termofílica de lodos municipais primários e secundários.

FRÖHLICH *et al.*, (1991), WU & WU (1991) e POLLARD *et al.*, (1996), estudaram *Saccharomyces cerevisiae* em biorreatores *airlift* testando diversas configurações físicas, onde conseguiram melhorar o desempenho dos próprios biorreatores *airlift*. BONNARME, *et al.*, (1993) utilizaram com sucesso um biorreator *airlift* para produção das enzimas lignina e manganês peroxidases e proteína extracelular do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

YUGUO *et al.*, (1999) demonstraram a vantagem do biorreator *airlift* de circulação externa na produção de ácido cítrico a partir da mistura de batata doce desidratada com sedimentos de *Aspergillus niger*. YUGUO *et al.*, (2000) utilizaram com sucesso um biorreator *airlift* com circulação externa para a produção de α - amilase a partir de *Bacillus subtilis* se comparado com um biorreator de tanque mecanicamente agitado.

KLEIN *et al.*, (2002) comprovaram que o sistema de biotransformação de glucose em ácido glucônico por *Aspergillus niger* pode ser bem sucedido se utilizada a determinação da taxa de transferência de oxigênio em biorreatores *airlift*.

CHENG *et al.*, (2002) conseguiram bons resultados no cultivo de *Acetobacter xylinum* para a produção bacteriana de celulose em um reator *airlift* modificado.

Entretanto, a literatura carece de dados relacionados à aplicação de biorreatores *airlift* para produção de vinagre. A utilização de biorreatores tipo *airlift* para a produção de vinagre é, assim, uma nova tecnologia a ser explorada.

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos (ENGEBIO/EQA).

3.1 Produção de vinagre

3.1.1 Matérias-primas

3.1.1.1 Fermentado de Maçã

A maçã utilizada para a produção de vinagre não é de nenhuma variedade específica. Na verdade, o que determina se a maçã será processada são suas características físicas, sendo que as frutas com algum dano de qualidade ou fora das especificações são destinadas à fabricação de subprodutos, tais como o suco, a sidra e o vinagre.

A matéria-prima utilizada para produção de vinagre de maçã é o fermentado de maçã (sidra). Este fermentado é geralmente pobre em matéria nitrogenada.

O fermentado utilizado para a acetificação deve ter um teor alcoólico entre 7 e 9°GL. Teores muito elevados (acima de 10°GL) inibem o desenvolvimento das bactérias e teores muito baixos (abaixo de 5°GL) produzem vinagres muito fracos e favorecem as contaminações (RIZZON *et al.*, 1992).

Neste trabalho o fermentado de maçã utilizado continha 5°GL, devido a isso houve a adição de álcool comercial a 94°GL durante as culturas realizadas para se atingir os níveis de acetificação exigidos pela legislação.

A matéria-prima utilizada foi fornecida pela Indústria de Vinagre e Plásticos Heinig, com sede em Brusque, Santa Catarina.

3.1.1.2 Microrganismos

Para a acetificação não é comum o uso de culturas puras. Emprega-se geralmente uma microflora mista de *Acetobacter* contendo diferentes espécies ou variedades dessa bactéria, que é considerada mais eficiente.

Os microrganismos utilizados para a acetificação do fermentado de maçã foram obtidos a partir de vinagre forte (vinagre não pasteurizado e não diluído que contém as bactérias acéticas) proveniente de processos da indústria de vinagres Heinig.

Os microrganismos foram mantidos à temperatura ambiente, em local escuro, para não comprometer sua qualidade.

3.1.2 Cultura Acética

Para a cultura acética da matéria-prima previamente citada foram utilizados dois tipos de “biorreatores”, o biorreator *airlift* e o biorreator clássico na produção de vinagre, ambos operados em batelada. O biorreator *airlift* dispunha de sistema próprio de aeração feito por ar comprimido e o biorreator clássico utilizou uma bomba de aquário para a aeração. Um banho termostático foi utilizado em ambos biorreatores para o controle de temperatura em torno de 28°C. O volume de ar usado foi de 1,8 litros por hora por litro de calda para os dois biorreatores utilizados.

3.1.2.1 Descrição do biorreator *airlift* utilizado para a acetificação

Um biorreator *airlift* com circulação externa, volume útil de 6,5 L, construído em vidro borossilicato (resistente a temperaturas superiores a 800°C) foi utilizado na produção do vinagre. Utilizou-se como dispersor de ar comprimido uma pedra porosa. Um rotâmetro de 0 a 1,2 NL.min⁻¹ foi utilizado para medir a vazão de ar e um banho termostático foi utilizado para controlar a temperatura através de um trocador de calor

no *dowcomer*. O biorreator dispunha de orifícios para a saída de ar, controle de temperatura e retirada das amostras.

A Figura 3.1 mostra a fotografia do biorreator *airlift* utilizado para a produção de vinagre e o esquema do biorreator utilizado.

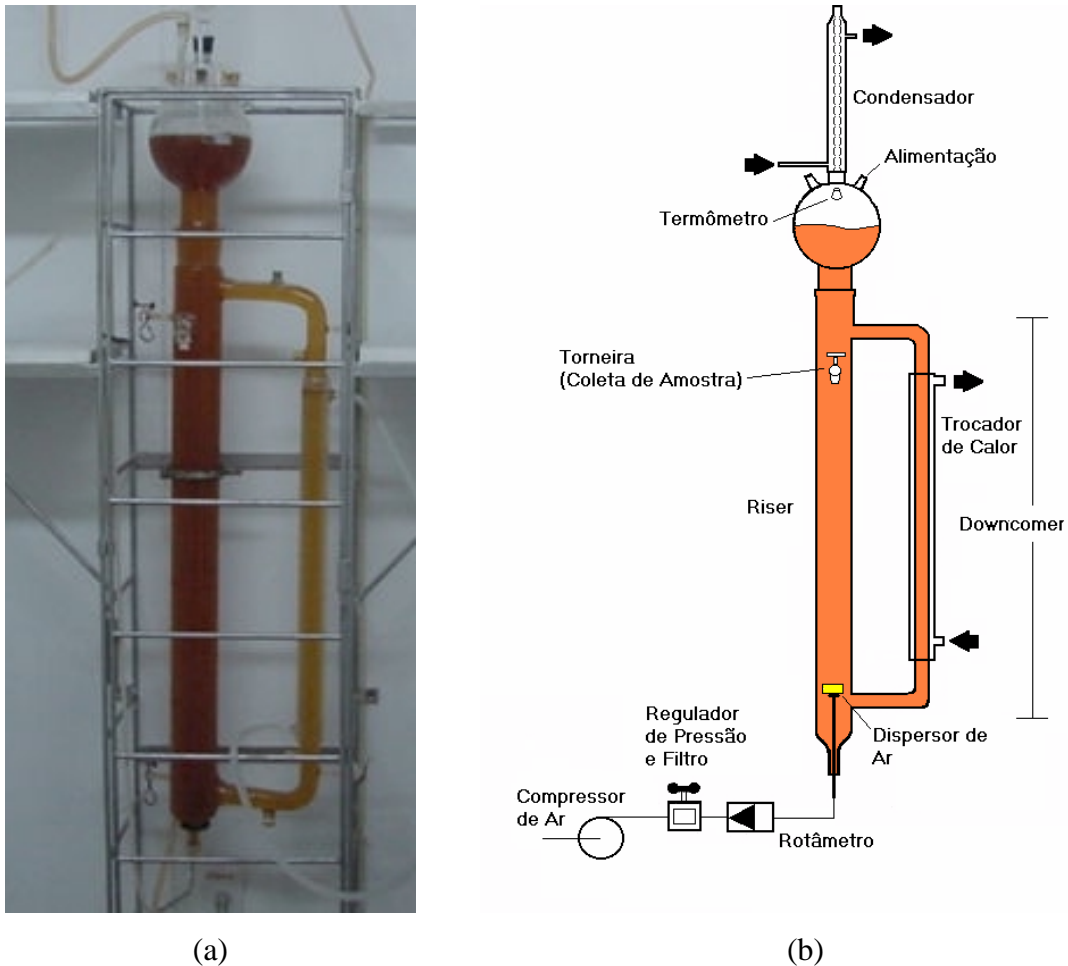


Figura 3.1 - Fotografia do biorreator *airlift* utilizado para a produção de vinagre (a), e esquema do biorreator utilizado (b).

3.1.2.2 Descrição do biorreator clássico utilizado para a acetificação

Um biorreator clássico na produção de vinagre, com volume total de 6 L e volume útil de 4 L, tendo uma cuba de vidro e os demais dispositivos em aço inoxidável e plástico, foi utilizado juntamente com o biorreator *airlift* na produção de vinagre. O sistema de aeração foi realizado por uma bomba de aquário e o mesmo banho termostático utilizado no *airlift* foi usado no clássico para o controle de temperatura

através do trocador de calor. A tampa do fermentador dispunha de orifícios tampados com algodão para permitir a saída de ar, medidas de temperatura e retirada das amostras.

A Figura 3.2 mostra a fotografia do biorreator clássico utilizado para a produção de vinagre e o esquema do biorreator utilizado.

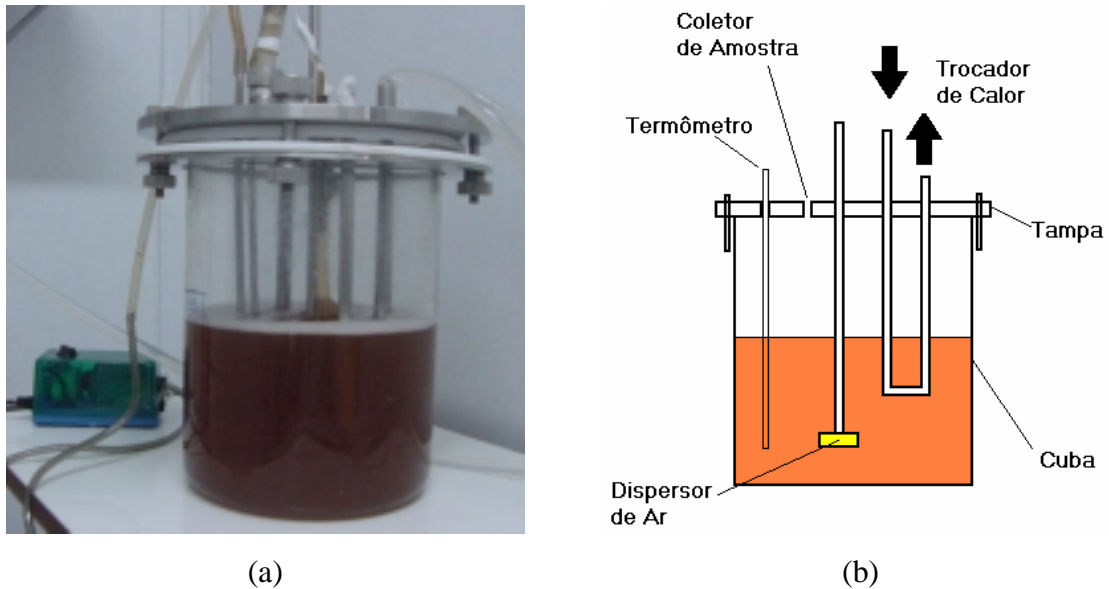


Figura 3.2 - Fotografia do biorreator clássico utilizado para a produção de vinagre (a), e esquema do biorreator utilizado (b).

3.1.3 Meio de Cultivo

O meio de cultivo ou calda é a solução para a posterior acetificação e é necessário que as bactérias acéticas tenham um tempo de adaptação ao meio. Nesta fase, o meio a ser acetificado deve conter condições ideais para o crescimento desses microrganismos, ou seja, nutrientes essenciais, certo grau de acidez e substrato para seu desenvolvimento. Para este trabalho utilizou-se uma mistura de sais pré-preparada e usada comercialmente, o *Acetozyn*, que contém os nutrientes necessários para o crescimento das bactérias acéticas, na proporção de 1g por litro de calda a ser acetificada.

A fim de manter a estabilidade microbiológica do fermentado de maçã recebido e também garantir uma boa acidificação posterior, adicionou-se à matéria-prima vinagre forte previamente elaborado, não pasteurizado, contendo as bactérias acéticas.

As caldas foram preparadas em um garrafão com capacidade de 10 L. Análises de álcool e acidez foram realizadas e posteriormente transferiu-se cerca de 3,5 L de calda para o biorreator clássico e o restante (cerca de 6,4 L) para o biorreator *airlift*. Os

biorreatores foram previamente limpos, e deixados para acetificar com a aeração forçada e constante.

Quantidades de álcool comercial a 94°GL foram adicionadas durante o processo de produção de vinagre. Essas adições eram feitas quando o teor de álcool estava próximo de zero e a acidez estava abaixo do exigido pela legislação.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Amostragem

Amostras de 110 mL foram retiradas diariamente dos biorreatores durante todo o processo, para avaliação do teor de álcool e de acidez total. Ao término da acetificação o vinagre assim obtido, foi filtrado em papel filtro, pasteurizado a 65°C por 5 minutos e diluído com água destilada até acidez volátil mínima de 4 g de ácido acético/100 mL de amostra (BRASIL, 1974). Posteriormente foram realizadas as análises citadas a seguir.

Para a avaliação dos vinagres comerciais, as amostras foram compradas em supermercados. Ao todo foram analisadas 6 amostras de vinagres comerciais de maçã, tendo sido adquiridas embalagens fechadas, em exposição nas gôndolas dos recintos comerciais.

3.2.2 Análises físico-químicas

O Anexo IV mostra algumas definições sobre as análises físico-químicas realizadas (MERCATURA, 2003).

Para as determinações físico-químicas da densidade, extrato seco, acidez volátil, cinzas e teor alcoólico utilizou-se os métodos oficiais de análises para vinagres conforme a Portaria N° 076, de 27 de novembro de 1986, a seguir.

Massa Específica a 20° C

Material

- Densímetro (1,000 - 1,100 g/mL)
- Proveta

Procedimento

O densímetro foi lavado com água destilada e depois com álcool; secou-se com papel de filtro e colocou-se no dessecador para eliminação da umidade. Encheu-se a proveta com a amostra de modo que o densímetro ficasse abaixo do nível e fez-se a leitura direta no densímetro na temperatura de 20°C. O resultado obtido é a massa específica em g/L.

A análise da massa específica do fermentado de maçã foi realizada por um picnômetro, pois a escala do densímetro utilizado era superior ao resultado lido.

Extrato seco a 100°C

Material

- cápsula cilíndrica de fundo chato de 70 mm de diâmetro e 20 mm de altura
- estufa
- banho-maria
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
- balança analítica
- pinça
- pipeta volumétrica de 25 mL

Procedimento

Foram pipetadas 25 mL da amostra na cápsula, previamente seca na estufa a 110°C, resfriada no dessecador e tarada. Evaporou-se lentamente em banho-maria a 100°C durante 3 horas consecutivas. Colocou-se na estufa a 100°C por 30 minutos. Resfriou-se no dessecador e pesou-se.

Cálculo

O extrato seco é expresso em g/L pela Equação (3.1):

$$\text{Extrato seco (g/L)} = (1000/25) \times (a - b) \quad (3.1)$$

Onde:

a = peso da cápsula com extrato [g]

b = peso da cápsula [g]

Acidez volátil

Material

- aparelho de destilação de Cazenave-Ferré
- pipetas volumétricas de 10 e 20 mL
- erlenmeyer de 250 mL
- balão volumétrico de 500 mL

Reagentes

- solução de hidróxido de sódio 0,1 N
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Preparo da amostra

Foram pipetadas 20 mL da amostra em um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água destilada.

Procedimento

Pipetou-se 10 mL da amostra diluída no borbulhador e 250 mL de água destilada no gerador de vapor do aparelho de destilação. Levou-se a água à ebulição com a torneira de vapor aberta, para eliminar o ar do aparelho e, eventualmente o gás carbônico da água destilada. Em seguida a torneira foi fechada para que o vapor de água borbulhasse na amostra, arrastando os ácidos voláteis. Recolheu-se 100 mL do destilado e titulou-se a acidez volátil do destilado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N em presença de fenolftaleína.

Cálculo

Acidez volátil é expressa em g de ácido acético/100 mL de amostra pela Equação (3.2):

$$\text{Acidez volátil (g de ácido acético/100 mL de amostra)} = \frac{n \times N \times E_q \times f}{10 \times V} \quad (3.2)$$

Onde:

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

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

Eq = equivalente grama de ácido acético [60]

f = fator de diluição [diluição 20:500, f = 25]

V = volume de amostra no preparo [mL]

Cinzas

Material

- cadinho de porcelana (ou platina) de 50 ml
- pipeta volumétrica de 25 mL
- bastonete de vidro
- banho-maria
- dessecador com sílica gel ou cloreto de cálcio anidro
- balança analítica
- mufla
- bico de Bunsen

Procedimento:

O cadinho foi aquecido na mufla ao redor de 600°C durante 10 minutos, resfriado no dessecador e pesado. Foram pipetadas 25 mL da amostra no cadinho e evaporadas completamente no banho-maria fervente (cuidando para não deixar espirrar a

amostra). Queimou-se o cadinho em bico de Bunsen e em seguida colocou-se o cadinho na mufla a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, até que o resíduo se tornasse claro. O tempo exigido para essa operação pode ser reduzido da seguinte maneira: remove-se o cadinho da mufla, esfria-se, quebra-se o resíduo ainda escuro com um bastonete de vidro, tomando-se o cuidado de lavar o bastonete com algumas gotas de água destilada, leva-se o cadinho em banho-maria até secar e coloca-se novamente na mufla até o resíduo ficar completamente claro. Esfria-se o cadinho no dessecador e pesa-se rapidamente.

Cálculo

As cinzas são expressas em gramas por litro de amostra conforme é apresentado na Equação (3.3):

$$\text{Cinzas (g/L)} = (1000/25) \times (a - b) \quad (3.3)$$

Onde:

a = peso do cadinho com as cinzas [g]

b = peso do cadinho [g]

Teor alcoólico

Material

- aparelho de destilação
- balão volumétrico de 100 mL e 200 mL
- proveta de 100 ml
- papel tornassol
- pérolas de vidro
- termômetro
- alcoômetro Gay Lussac de 0 a 100°GL

Reagentes

- solução de hidróxido de sódio 5 N
- papel tornassol

Procedimento

Mediu-se 100 mL da amostra em balão volumétrico e 100 mL de água destilada. Transferiu-se para balão de destilação, colocando-se pérolas de vidro. Neutralizou-se com solução de hidróxido de sódio 5 N, usando papel tornassol como indicador. O condensador foi conectado e mergulhado até o fundo de um balão volumétrico de 200 mL. Resfriou-se o balão, mergulhando-o em água e gelo, durante a destilação. Transferiu-se o destilado para uma proveta, e fez-se a leitura com o alcoômetro, à 20°C. O valor obtido é a porcentagem do álcool em volume ou grau Gay Lussac.

A medida do teor de álcool foi imprecisa, pois a escala do alcoômetro utilizado era muito alta (0 a 100°GL).

Para as análises de acidez total utilizou-se a metodologia de análises de bebidas e vinagres do Laboratório Nacional de Referência Vegetal - LANARV e a metodologia aplicada por algumas indústrias.

Para os vinagres prontos foi realizada a análise de acidez total pelo método do laboratório LANARV, descrita a seguir:

Acidez total

Material

- erlenmeyer de 250 mL
- pipeta volumétrica de 10 mL
- bureta de 100 mL

Reagentes

- solução de hidróxido de sódio 0,1 N
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Procedimento

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.

Cálculo

Acidez total expressa em moles/L é obtida pela Equação (3.4):

$$\text{Acidez total (moles/L)} = \frac{n \times M}{V} \quad (3.4)$$

Onde:

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

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio [moles/L]

V = volume de amostra [L]

A análise de acidez total a seguir foi realizada durante o processo de acetificação nas quatro culturas realizadas utilizando a mesma metodologia aplicada por algumas indústrias de vinagre.

Acidez Total

Material

- pipetas de 1 e 10 mL
- tubos de ensaio

Reagentes

- solução de hidróxido de sódio 0,1 N
- solução alcoólica de fenolftaleína a 1%

Procedimento

Transferiu-se 1 mL de amostra para um tubo de ensaio, colocou-se 1 gota de fenolftaleína e titulou-se com solução de NaOH 0,1 N utilizando pipeta de 10 mL até coloração rosa do indicador fenolftaleína.

Cálculo

A acidez total é obtida conforme mostrado na Equação (3.5):

$$\text{Acidez total (g de ácido acético/100 mL de amostra)} = N^{\circ} \text{ de mL da solução de NaOH} \times 0,6 \quad (3.5)$$

Esta técnica pode ser usada com a mesma unidade de acidez volátil (g de ácido acético/100 mL) porque o valor 0,6 que multiplica a equação acima vem do peso molecular do ácido acético que é 60,05616.

Para as análises de pH e teor de SO₂ livre usou-se as metodologias aplicadas no Laboratório de Vinhos da Cantina Experimental da EPAGRI - Videira, a seguir:

pH

Material

- béquer de 50 mL
- aparelho medidor de pH

Procedimento

Utilizou-se uma amostra suficiente para cobrir o eletrodo do aparelho previamente calibrado e realizou-se a leitura direta no equipamento.

Teor de SO₂ livre (método Ripper simples)

Material

- frasco erlenmeyer
- bureta de 50 mL

Reagentes

- solução indicadora de amido a 2%
- solução de ácido sulfúrico 1:3
- solução de iodo N/50

Procedimento

Foram pipetadas 20 mL da amostra em um frasco erlenmeyer. Adicionou-se 2 mL da solução de amido 2% e 3 mL da solução de ácido sulfúrico. Titulou-se com solução de iodo N/50 até mudança de coloração para cor azul intenso.

Cálculo

O teor de SO₂ livre é obtido pela Equação (3.6):

$$\text{SO}_2 \text{ livre (meq/L)} = \text{volume da solução de iodo gastos na titulação} \times 32 \quad (3.6)$$

3.3 Determinação de parâmetros cinéticos

3.3.1 Determinação da concentração da biomassa

A determinação da concentração celular realizada durante a quarta cultura foi obtida por gravimetria a partir de um volume conhecido de amostra (110 mL). A amostra foi filtrada em papel filtro pré-pesado seguido de secagem em estufa a 90°C até peso constante.

3.3.2 Velocidade específica de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento é calculada a partir do coeficiente angular da curva do logaritmo neperiano da biomassa com o tempo de acordo com a Equação (3.7):

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t \quad (3.7)$$

Onde:

X = concentração de biomassa [g.L⁻¹]

X_0 = concentração inicial de biomassa [g.L⁻¹]

μ = velocidade específica máxima de crescimento celular [d⁻¹]

t = tempo [dia]

3.3.3 Conversão de substrato em biomassa

A conversão de substrato em biomassa é definida de acordo com a Equação (3.8):

$$Y_{x/s} = - \frac{dM_x}{dM_s} \quad (3.8)$$

Onde:

$Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em células [g.g⁻¹]

M_X = massa de células [g]

M_S = massa de álcool [g]

Representando-se os dados em um gráfico $M_X = f(M_S)$, o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é $-Y_{x/s}$.

Obteve-se também o fator de conversão de substrato em células médio, conforme apresentado na Equação (3.9):

$$Y_{x/s}^{\text{médio}} = \frac{M_{XT}}{M_{ST}} \quad (3.9)$$

Onde:

$Y_{x/s}^{\text{médio}}$ = fator de conversão médio de substrato em células [g.g⁻¹]

M_{XT} = massa total de células gerada no biorreator [g]

M_{ST} = massa total de álcool [g]

3.3.4 Conversão de substrato em produto

A conversão de substrato em produto é definida de acordo com a Equação (3.10):

$$Y_{p/s} = - \frac{dM_P}{dM_S} \quad (3.10)$$

Onde:

$Y_{p/s}$ = fator de conversão de substrato em produto [g.g⁻¹]

M_P = massa de ácido acético [g]

Representando-se os dados em um gráfico $M_p = f(M_s)$, o coeficiente angular da tangente à curva em qualquer instante é $-Y_{p/s}$.

Obteve-se também o fator de conversão médio de substrato em produto, conforme apresentado na Equação (3.11):

$$Y_{P/S}^{\text{médio}} = \frac{M_{PT}}{M_{ST}} \quad (3.11)$$

Onde:

$Y_{p/s}^{\text{médio}}$ = fator de conversão médio de substrato em produto [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]

M_{PT} = massa total de ácido gerada no biorreator [g]

3.3.5 Produtividade em ácido acético

A produtividade em ácido acético é definida de acordo com a Equação (3.12):

$$P_R = \frac{V_t \times C_{\text{ác.}} - V_I \times C_{\text{ác. inicial}}}{t \times V_t} \quad (3.12)$$

Onde:

V_t = volume de calda no biorreator no tempo t [L]

V_I = volume inicial de calda no biorreator [L]

$C_{\text{ác.}}$ = concentração de ácido acético na cultura [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

$C_{\text{ác. inicial}}$ = concentração de ácido acético no início da cultura [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]

t = tempo de cultura [dia]

P_R = produtividade em ácido acético [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$]

A produtividade em cada instante, utilizada para avaliar a produtividade máxima é calculada conforme a Equação (3.13):

$$P_{R \text{ máx}} = \frac{1}{V} \frac{d(C_{\text{ác.}} \cdot V)}{dt} \quad (3.13)$$

Onde:

$P_{R\text{ máx.}}$ = produtividade máxima em ácido acético [$\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$]

V = volume de calda no biorreator (considerado constante nesse processo) [L]

$C_{\text{ác.}}$ = concentração de ácido acético [g.L^{-1}]

3.3.6 Concentração equivalente de álcool adicionado

A concentração equivalente de álcool adicionado é definida pela Equação (3.14):

$$C_{\text{eq}} = \frac{M_{\text{álcool}}}{V_{\text{T}}} \quad (3.14)$$

Onde:

C_{eq} = concentração equivalente de álcool adicionado [g.L^{-1}]

$M_{\text{álcool}}$ = massa total de álcool [g]

V_{T} = volume total de calda no biorreator no momento da adição [L]

A massa total de álcool é obtida de acordo com a Equação (3.15):

$$M_{\text{álcool}} = \rho_{\text{etanol}} \times V_{\text{álcool}} \quad (3.15)$$

Onde:

$V_{\text{álcool}}$ = volume total de álcool [L]

ρ_{etanol} = massa específica do etanol [g.L^{-1}]

O volume total de álcool é obtido através da Equação (3.16):

$$V_{\text{álcool}} = 0,94 \times V_{\text{adicionado}} \quad (3.16)$$

Onde:

$V_{\text{adicionado}}$ = volume de álcool adicionado na cultura [L]

3.3.7 Concentração de álcool inicial

A concentração de álcool no início de cada cultura é definida de acordo com a Equação (3.17):

$$C_{\text{ál.inicial}} = \frac{{}^{\circ}\text{GL}}{100} \times \rho_{\text{etanol}} \quad (3.17)$$

Onde:

${}^{\circ}\text{GL}$ = grau Gay Lussac lido no alcoômetro

$C_{\text{ál. inicial}}$ = concentração de álcool inicial [g.L^{-1}]

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Estudos preliminares

4.1.1 Correlação entre acidez total e acidez volátil

A determinação da acidez volátil e da acidez total é realizada através da titulação direta da amostra conforme descrito na seção 3.2.2 do capítulo de Material e Métodos.

Algumas indústrias vêm utilizando a determinação de acidez total como uma aproximação da acidez volátil. Essa aproximação simplifica os procedimentos práticos pela rapidez e facilidade em avaliar o desempenho das culturas quanto à produção de ácido acético.

Assim, foram realizados novos experimentos medindo-se a acidez volátil e a acidez total no vinagre pronto no sentido de correlacionar essas duas técnicas.

As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram, respectivamente, os resultados de acidez volátil e acidez total para os vinagres prontos obtidos das quatro culturas realizadas nos biorreatores *airlift* e clássico.

Tabela 4.1 – Acidez volátil e acidez total obtida nos vinagres prontos produzidos no biorreator *airlift*.

<i>Airlift</i>	1ª Cultura	2ª Cultura	3ª Cultura	4ª Cultura
Acidez Volátil (g ác. acético/100 mL)	4,26	4,12	4,05	4,00
Acidez Total (g ác. acético/100 mL)	4,20	4,14	4,08	4,02
Erro (%)	1,4	0,48	0,74	0,50

Tabela 4.2 – Acidez volátil e acidez total obtida nos vinagres prontos produzidos no biorreator clássico.

Clássico	1ª Cultura	2ª Cultura	3ª Cultura	4ª Cultura
Acidez Volátil (g ác. acético/100 mL)	4,05	4,26	4,00	4,05
Acidez Total (g ác. acético/100 mL)	4,08	4,14	4,08	4,02
Erro (%)	0,74	2,8	2,0	0,74

As análises dos resultados experimentais mostram que o erro assumido entre as análises de acidez volátil e acidez total é menor que 2% no biorreator *airlift* e menor que 3% no biorreator clássico.

Portanto, nas culturas realizadas pôde-se utilizar a técnica de acidez total para simplificar o processo de determinação de ácido acético no vinagre pronto.

4.1.2 Características físico-químicas do fermentado de maçã

O fermentado de maçã utilizado para a produção de vinagre foi previamente analisado utilizando as mesmas técnicas aplicadas aos vinagres comerciais conforme mostrado no capítulo de Material e Métodos. A Tabela 4.3 mostra as características físico-químicas deste fermentado.

Tabela 4.3 – Características físico-químicas do fermentado de maçã utilizado para a acetificação.

Análises físico-químicas	
Massa específica a 20°C (g.L ⁻¹)	942,54
Extrato seco a 100°C (g.L ⁻¹)	15,32
Acidez total (moles.L ⁻¹)	0,210
Cinzas (g.L ⁻¹)	2,20
Teor alcoólico (°GL)	5,0
pH	3,76
Acidez Volátil (g ác.acético/100 mL)	0,15
Teor de SO ₂ livre (meq.L ⁻¹)	12,80

Conforme mencionado no capítulo de Material e Métodos, o fermentado deve ter uma concentração de álcool entre 7 e 9°GL para se atingir os níveis de acetificação exigidos pela legislação. O fermentado de maçã utilizado neste trabalho continha um teor de álcool de 5°GL. Devido a isso houve a necessidade da adição de álcool comercial durante as quatro culturas realizadas para a obtenção do teor de acidez compatível com a legislação.

4.2 Produção de vinagre de maçã

Foram realizadas quatro culturas utilizando o biorreator *airlift* e, paralelamente, quatro culturas controle no biorreator clássico. A temperatura das culturas foi mantida a 28°C através de um banho termostático.

O processo tanto no biorreator *airlift* como no biorreator clássico foi interrompido quando a concentração de ácido atingiu em torno de 4,5 g ác.acético/100 mL. Para tanto houve a necessidade de adição de álcool a 94°GL, uma vez que o fermentado de maçã utilizado possuía um teor alcoólico baixo para esse processo.

A produtividade em ácido acético, a concentração inicial de álcool, a concentração equivalente de álcool adicionado em cada cultura e o início da adição de álcool estão apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5 para cada biorreator.

Tabela 4.4 – Produtividade em ácido acético, concentração inicial de álcool, concentração equivalente de álcool adicionado e início da adição de álcool para o biorreator *airlift*.

<i>Airlift</i>	P _R em ácido acético (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	C _I de álcool (g.L ⁻¹)	C _{eq} de álcool adicionado (g.L ⁻¹)	Adição de álcool a partir do dia:
1ª Cultura	2,37	31,56	14,11	8
2ª Cultura	3,36	31,56	5,93	7
3ª Cultura	1,60	31,56	15,15	7
4ª Cultura	2,04	31,56	20,82	8

Tabela 4.5 – Produtividade em ácido acético, concentração inicial de álcool, concentração equivalente de álcool adicionado e início da adição de álcool para o biorreator clássico.

Clássico	P _R em ácido acético (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	C _I de álcool (g.L ⁻¹)	C _{eq} de álcool adicionado (g.L ⁻¹)	Adição de álcool a partir do dia:
1ª Cultura	1,46	31,56	32,55	8
2ª Cultura	1,66	31,56	10,87	7
3ª Cultura	1,14	31,56	25,48	8
4ª Cultura	1,06	31,56	33,97	8

A produtividade em ácido acético no biorreator *airlift* foi superior à produtividade em ácido acético do biorreator clássico. O sistema de aeração utilizado no biorreator *airlift* propiciou melhores condições de oxidação e acelerou o processo.

A concentração equivalente de álcool adicionado no biorreator clássico foi maior do que a concentração equivalente do biorreator *airlift*, demonstrando que o processo em biorreator *airlift* apresentou novamente superioridade na conversão de álcool em ácido acético.

O tempo gasto para obter os produtos prontos foi de 8 a 12 dias para o biorreator *airlift* e de 12 a 14 dias para o biorreator clássico. Com isso pode-se dizer que o biorreator *airlift* teve um desempenho melhor na produção de vinagre do que o biorreator clássico.

Os vinagres obtidos são considerados de boa qualidade, pois atendem a legislação brasileira nos termos de produção de ácido acético e álcool. Os teores de

ácido acético nos produtos finais antes da diluição ficaram em torno de 4,5 g ác.acético/100 mL e os teores finais de álcool próximos a zero.

Após a acetificação, o vinagre foi filtrado em papel filtro, diluído para uma concentração final de no mínimo 4 g ác.acético/100 mL e pasteurizado a uma temperatura de 65°C por 5 minutos antes de ser envasado.

O aspecto final do produto atendeu às características sensoriais previstas pela legislação: aspecto límpido, sem depósito, cheiro característico e sabor ácido.

Durante a etapa de elaboração dos vinagres, houve um acompanhamento periódico através de análises de álcool e acidez total. Ao término de cada fermentação e após a diluição outras análises físico-químicas foram realizadas para garantir a qualidade do produto.

A análise do teor de SO₂ não foi realizada nos vinagres produzidos, pois não foi adicionado ao produto este conservante.

As Tabelas 4.6 e 4.7 mostram as análises físico-químicas dos vinagres de maçã prontos obtidas no biorreator *airlift* e no biorreator clássico.

Tabela 4.6 – Análises físico-químicas dos vinagres de maçã prontos produzidos no biorreator *airlift*.

<i>Airlift</i>	1 ^a Cultura	2 ^a Cultura	3 ^a Cultura	4 ^a Cultura
Massa específica a 20°C (g.L ⁻¹)	1013	1011	1011	1011
Extrato seco a 100°C (g.L ⁻¹)	14,10	14,40	15,24	14,98
Acidez total (moles.L ⁻¹)	0,642	0,667	0,624	0,666
Cinzas (g.L ⁻¹)	2,21	2,30	2,28	2,08
Teor alcoólico (°GL)	0	0	0	0
pH	3,21	3,28	3,26	3,18
Acidez Volátil (g ác. acético/100 mL)	4,26	4,12	4,05	4,00

Tabela 4.7 – Análises físico-químicas dos vinagres de maçã prontos produzidos no biorreator clássico.

Clássico	1ª Cultura	2ª Cultura	3ª Cultura	4ª Cultura
Massa específica (g.L ⁻¹) a 20°C	1014	1012	1013	1013
Extrato seco a 100°C (g.L ⁻¹)	17,66	17,36	17,74	18,12
Acidez total (moles.L ⁻¹)	0,659	0,630	0,675	0,702
Cinzas (g.L ⁻¹)	2,69	2,84	2,72	2,74
Teor alcoólico (°GL)	0	0	0	0
pH	3,27	3,34	3,31	3,26
Acidez Volátil (g ác. acético/100 mL)	4,05	4,26	4,00	4,05

Os vinagres produzidos no biorreator *airlift* e no biorreator clássico encontram-se dentro da legislação brasileira (BRASIL, 1990): acidez volátil mínima de 4 g ácido acético/100mL, extrato seco mínimo de 7 g.L⁻¹ (vinagres tintos e rosados), teor de álcool residual máximo de 1°GL e teor de cinzas mínimo de 1 g.L⁻¹.

Os resultados apresentados para os produtos prontos são correspondentes às amostras diluídas, com teores de acidez próximos ao mínimo estabelecido pela legislação, para que possam ser comparados com produtos existentes no mercado.

A seguir serão apresentadas as análises físico-químicas realizadas nos vinagres comerciais de maçã.

4.3 Análises físico-químicas dos vinagres comerciais de maçã

Para se ter referência quanto aos resultados obtidos nos vinagres produzidos, foram realizadas as mesmas análises físico-químicas anteriormente citadas em vinagres comerciais de maçã. Estas análises físico-químicas estão mostradas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Análises físico-químicas das amostras de vinagres comerciais de maçã.

Amostra	Massa específica a 20°C (g.L ⁻¹)	Extrato seco a 100°C (g.L ⁻¹)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (moles.L ⁻¹)	Cinzas (g.L ⁻¹)	Teor alcoólico (°GL)	pH	Teor de SO ₂ livre (meq.L ⁻¹)
A	1009	8,56	4,20	0,731	1,080	0	2,83	26,67
B	1005	6,20	4,50	0,790	1,320	0	3,06	16,00
C	1007	7,70	4,35	0,759	0,860	0	3,10	46,93
D	1005	5,00	4,65	0,788	0,540	0	3,14	16,00
E	1008	5,62	4,20	0,727	0,440	1	3,10	16,00
F	1009	11,22	4,35	0,734	0,600	1	3,36	12,80

Os resultados das análises físico-químicas mostraram que somente duas amostras (A e B) estão dentro da legislação brasileira no que se refere à análise de cinzas (mínimo de 1 g.L⁻¹ - BRASIL, 1990). Por outro lado a amostra B juntamente com as amostras D e E não obedecem a legislação brasileira na análise de extrato seco (mínimo de 7 g.L⁻¹ vinagres tintos e rosados - BRASIL, 1990). Estes resultados indicam possíveis excessos de diluição ou adulterações dos produtos feita por soluções de ácido acético.

A seguir será apresentada uma comparação dos vinagres produzidos no biorreator *airlift* e no clássico com os vinagres comerciais.

4.4 Comparação entre os vinagres comerciais e os vinagres produzidos

Uma comparação feita entre as amostras de vinagres comerciais e os vinagres produzidos em ambos biorreatores é apresentada na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Comparação entre as amostras de vinagres comerciais e os vinagres produzidos em ambos biorreatores.

Amostra	Massa específica a 20°C (g.L ⁻¹)	Extrato seco a 100°C (g.L ⁻¹)	Acidez volátil (g de ác. acético/100 mL)	Acidez total (moles.L ⁻¹)	Cinzas (g.L ⁻¹)	Teor alcoólico (°GL)	pH
A	1009	8,56	4,20	0,731	1,080	0	2,83
B	1005	6,20	4,50	0,790	1,320	0	3,06
C	1007	7,70	4,35	0,759	0,860	0	3,10
D	1005	5,00	4,65	0,788	0,540	0	3,14
E	1008	5,62	4,20	0,727	0,440	1	3,10
F	1009	11,22	4,35	0,734	0,600	1	3,36
*Airlift	1012	14,68	4,11	0,638	2,220	0	3,23
*Clássico	1013	17,72	4,09	0,658	2,750	0	3,30

* Média obtida das 4 culturas realizadas.

Os vinagres produzidos em laboratório apresentaram valores superiores de extrato seco e cinzas devido ao fato do produto final não ter passado por um processo de filtração mais rigoroso e por um sistema de clarificação, o que ocasionou maior quantidade de sólidos solúveis aumentando assim seu peso seco. Isto também pode ser observado pela análise da massa específica.

A baixa acidez total dos vinagres produzidos em laboratório se justifica pela falta de condições na matéria-prima que favorecessem o aumento da acidez acética. Como já foi mencionado anteriormente, durante o experimento houve a necessidade da

adição de álcool comercial para se atingir a quantidade mínima de ácido exigida pela legislação (4 g ácido acético/100 mL).

Vale ressaltar que o teor de acidez total não está atribuído somente à presença de ácido acético, já que outros ácidos orgânicos estão presentes nos vinagres tais como o tartárico, o cítrico e o málico.

A análise de pH foi realizada no intuito de mostrar que os valores encontrados para os vinagres produzidos em laboratório estão bastante próximos dos vinagres produzidos industrialmente.

A seguir será apresentado o comportamento cinético de produção de ácido acético obtido para ambos biorreatores durante a quarta cultura.

4.5 Avaliação do comportamento cinético da produção de ácido acético

A Figura 4.1 apresenta o comportamento cinético do ácido acético no decorrer da quarta cultura realizada para ambos os biorreatores (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

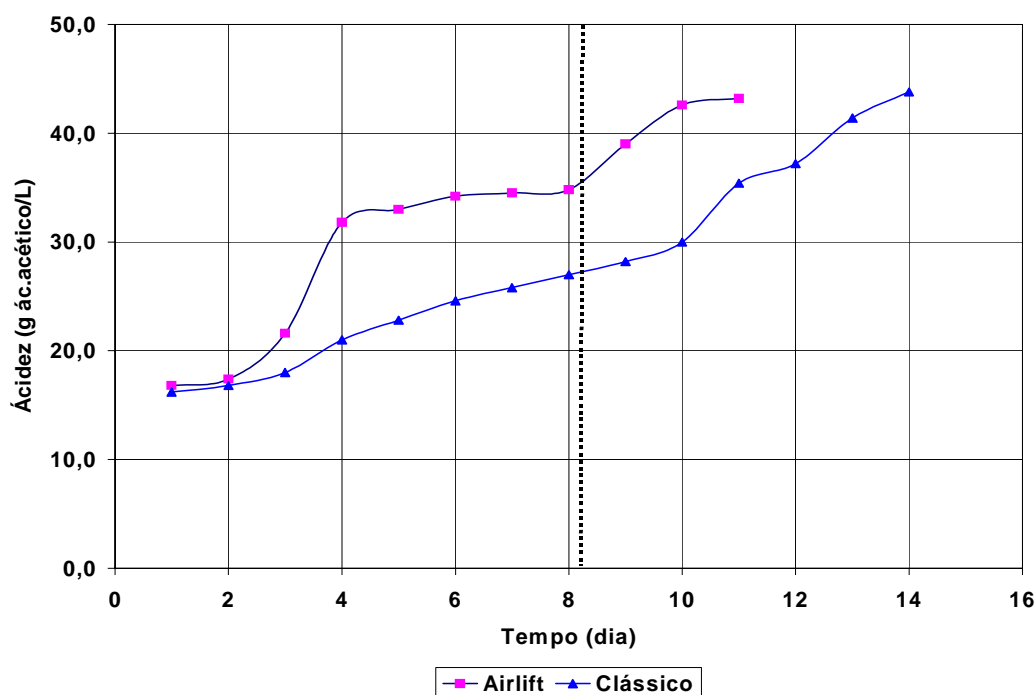


Figura 4.1 – Comportamento cinético da acidez para ambos biorreatores durante a quarta cultura.

Analisando a Figura 4.1 no período anterior à adição de álcool (linha pontilhada), nota-se uma fase de adaptação (lag) das bactérias ao meio de cultura com duração de um dia. No biorreator *airlift* fica nítida uma fase exponencial de produção de ácido e um posterior esgotamento devido ao término do álcool. Já no biorreator clássico a produção de ácido é mais constante, porém sem a mesma velocidade do biorreator *airlift*.

A produtividade máxima em ácido nesse período está entre os dias 3 e 4 para os dois casos, sendo que para o *airlift* a produtividade máxima foi de $10,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e para o clássico a produtividade máxima foi de $3,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. É visível a maior produtividade em ácido no biorreator *airlift*.

A partir do oitavo dia houve a adição de álcool comercial a 94°GL em ambos biorreatores até o término da cultura. Nota-se que a partir daí há novamente uma produção de ácido acentuada no biorreator *airlift* e no biorreator clássico.

A concentração de álcool adicionada na quarta cultura foi de $20,8 \text{ g.L}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e de $33,9 \text{ g.L}^{-1}$ para o biorreator clássico. Vale salientar que o volume dos biorreatores era diferente.

A produtividade média máxima em ácido acético obtida na quarta cultura antes da adição de álcool para os dois biorreatores utilizados é apresentada na Figura 4.2 (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

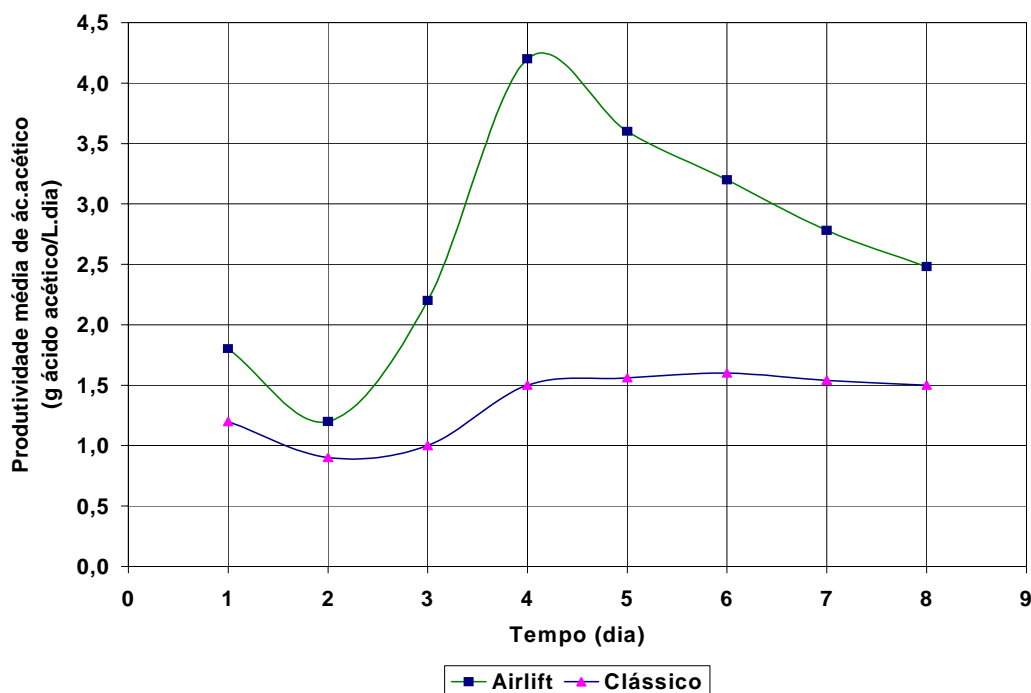


Figura 4.2 – Produtividade média máxima em ácido acético durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados.

Analisando a Figura 4.2 nota-se que a produtividade média máxima no biorreator *airlift* é de $4,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e no clássico é de $1,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, demonstrando novamente a superioridade do biorreator *airlift*.

A queda na produtividade média deve-se ao término do substrato (álcool).

A determinação dos parâmetros cinéticos obtidos durante a quarta cultura serão apresentados a seguir.

4.6 Determinação de parâmetros cinéticos

Durante a quarta cultura foram retiradas amostras diárias de 110 mL para as análises de teor de álcool e acidez total. Antes das análises serem realizadas as amostras foram filtradas em papel filtro pré-pesado e posteriormente colocados em estufa a 90°C até peso constante.

As amostras foram caracterizadas através da medida de biomassa obtida do peso seco das células. De posse desses resultados pôde-se avaliar a curva de crescimento celular, a velocidade específica de crescimento média e os fatores de conversão de álcool em ácido acético e álcool em células.

4.6.1 Curva de crescimento celular

A Figura 4.3 apresenta o crescimento celular tanto no biorreator *airlift* quanto no biorreator clássico para os primeiros oito dias de cultura (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

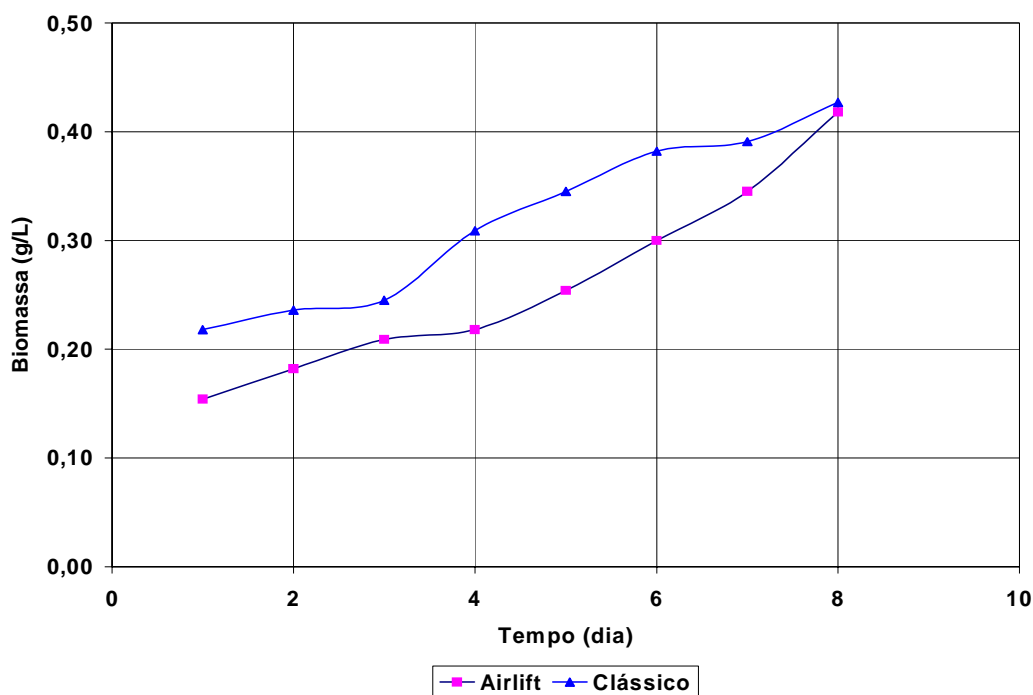


Figura 4.3 – Curva de crescimento celular durante a quarta cultura para ambos biorreatores.

Analisando a Figura 4.3, pode-se observar que embora haja um aumento contínuo no número de células, a fase exponencial não é bem definida.

Contudo, pôde-se calcular uma velocidade específica de crescimento média, considerada esta constante ao longo do intervalo. É esperado um comportamento não exponencial no final, pois a concentração de álcool está diminuindo.

A seguir será apresentada a velocidade específica de crescimento média para os dois biorreatores utilizados.

4.6.2 Velocidade específica de crescimento média

A Figura 4.4 mostra a velocidade específica de crescimento média ($\mu_{\text{média}}$) para os oito primeiros dias de cultura em ambos biorreatores utilizados (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

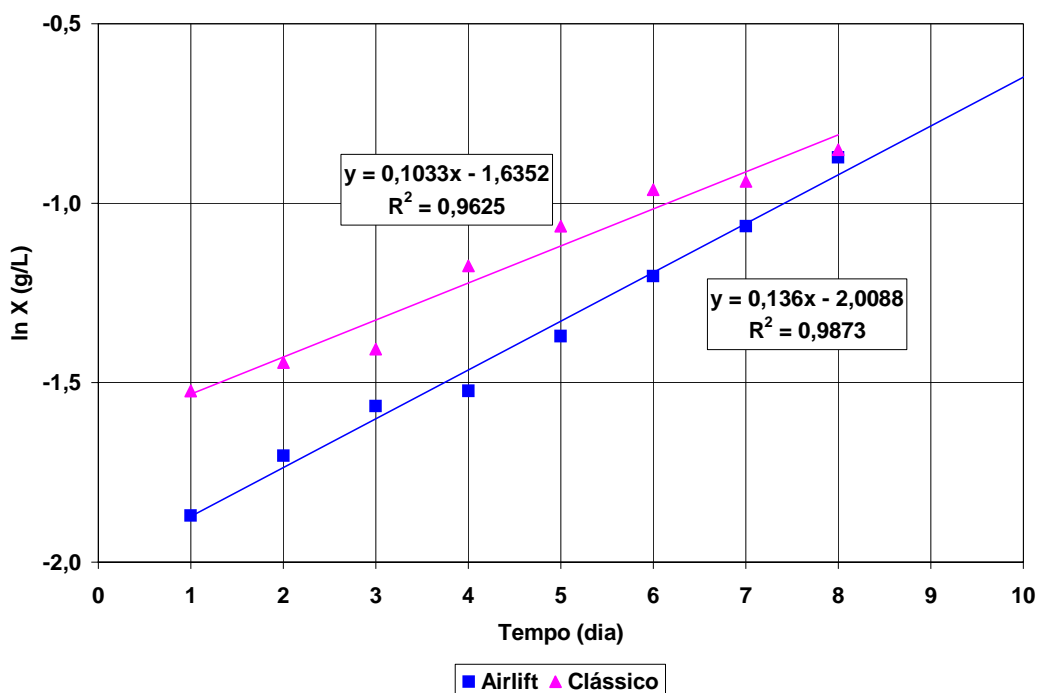


Figura 4.4 – Velocidade específica de crescimento média durante a quarta cultura para ambos biorreatores.

O biorreator *airlift* obteve uma velocidade específica de crescimento média de $0,14 \text{ d}^{-1}$ e o biorreator clássico de $0,10 \text{ d}^{-1}$. Os dois biorreatores possuem valores próximos de velocidade de crescimento de células demonstrando uma pequena vantagem para o biorreator *airlift*.

Serão apresentados a seguir os fatores de conversão de álcool em ácido acético e álcool em células para os oito primeiros dias de cultura.

4.6.3 Fator de conversão $Y_{p/s}$

As Figuras 4.5 e 4.6 mostram o fator de conversão de álcool em ácido acético antes da adição de álcool comercial obtidos durante a quarta cultura para ambos

biorreatores (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

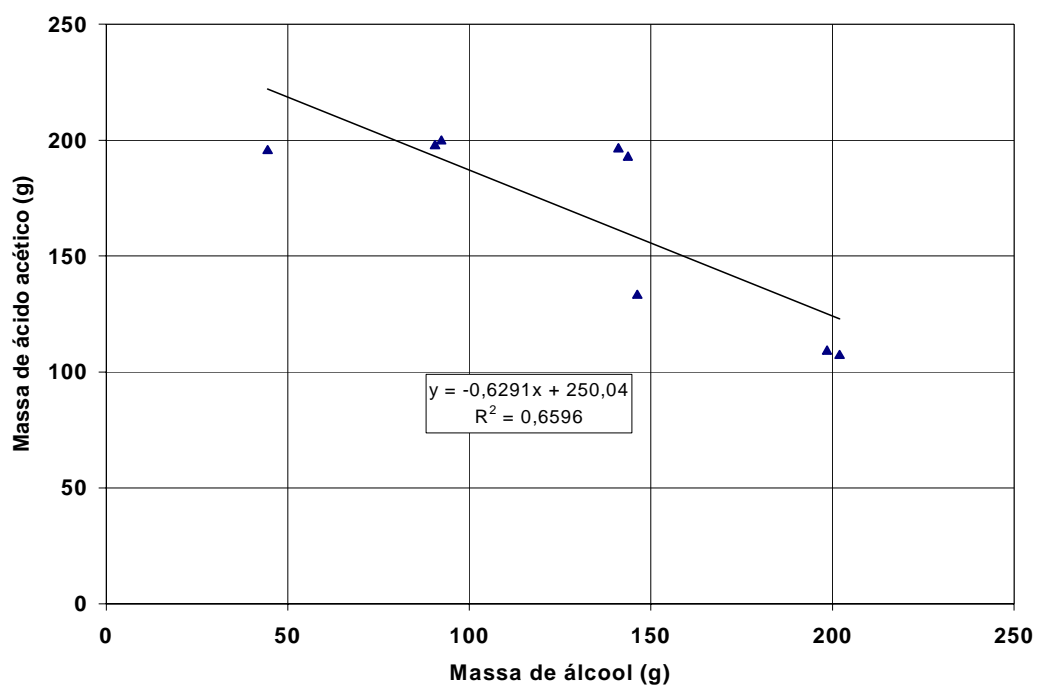


Figura 4.5 – Fator de conversão de álcool em ácido acético durante a quarta cultura (*Airlift*).

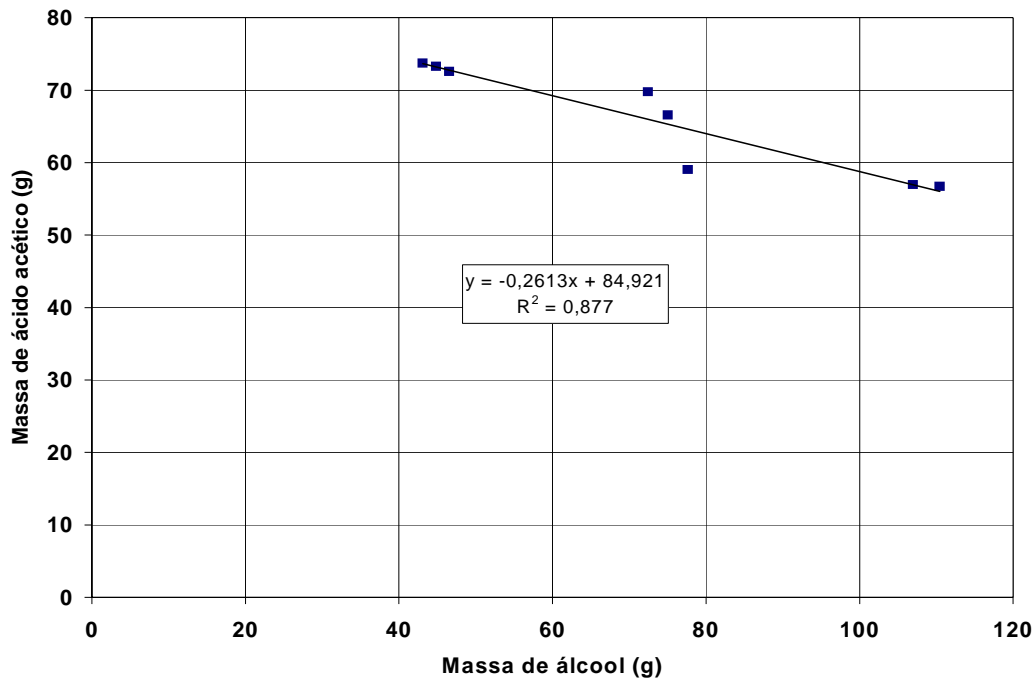


Figura 4.6 – Fator de conversão de álcool em ácido acético durante a quarta cultura (Clássico).

O fator de conversão de álcool em ácido acético obtido durante a quarta cultura foi de $0,63 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e de $0,26 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator clássico.

Os dados obtidos não foram muito bons, pois a determinação da concentração de álcool não foi muito precisa.

Foi realizado o cálculo do fator de conversão médio para os dois biorreatores utilizados. Para o biorreator *airlift* obteve-se um fator de conversão médio de $0,56 \text{ g.g}^{-1}$ e para o biorreator clássico $0,25 \text{ g.g}^{-1}$.

Pode-se notar que os valores não diferenciam muito dos obtidos graficamente e que a conversão de álcool em ácido no biorreator *airlift* é praticamente o dobro do biorreator clássico. Essa é uma vantagem que geraria uma economia de matéria-prima reduzindo os custos de operação.

4.6.4 Fator de conversão $Y_{x/s}$

As Figuras 4.7 e 4.8 mostram os fatores de conversão de álcool em células obtidos durante a quarta cultura antes da adição de álcool para ambos os biorreatores (as tabelas contendo os dados utilizados no gráfico encontram-se no Anexo III).

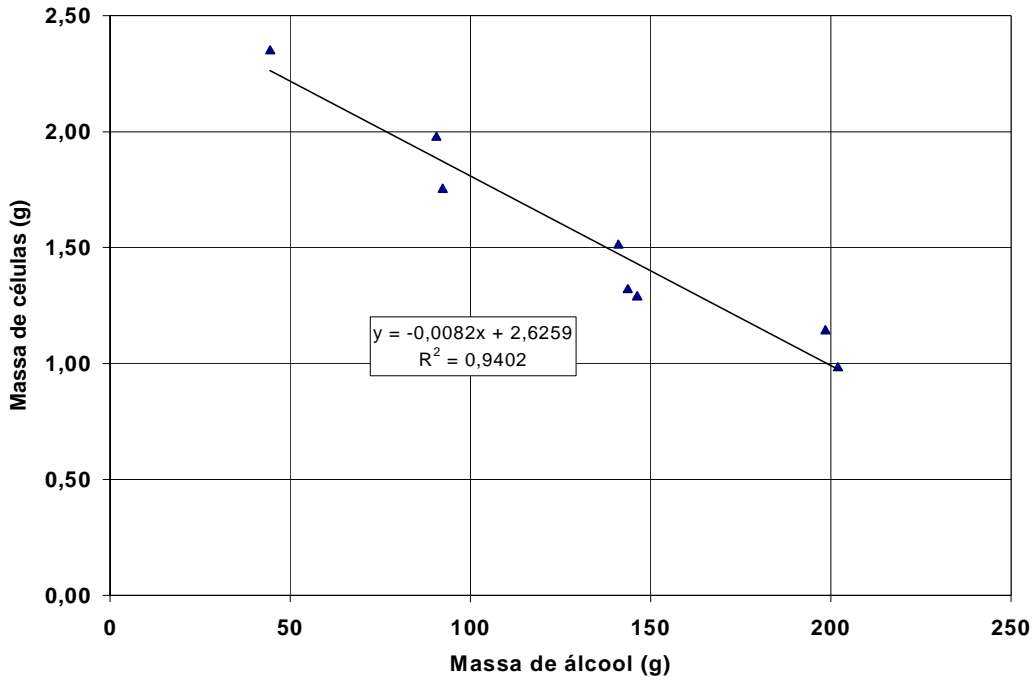


Figura 4.7 – Fator de conversão de álcool em células durante a quarta cultura (*Airlift*).

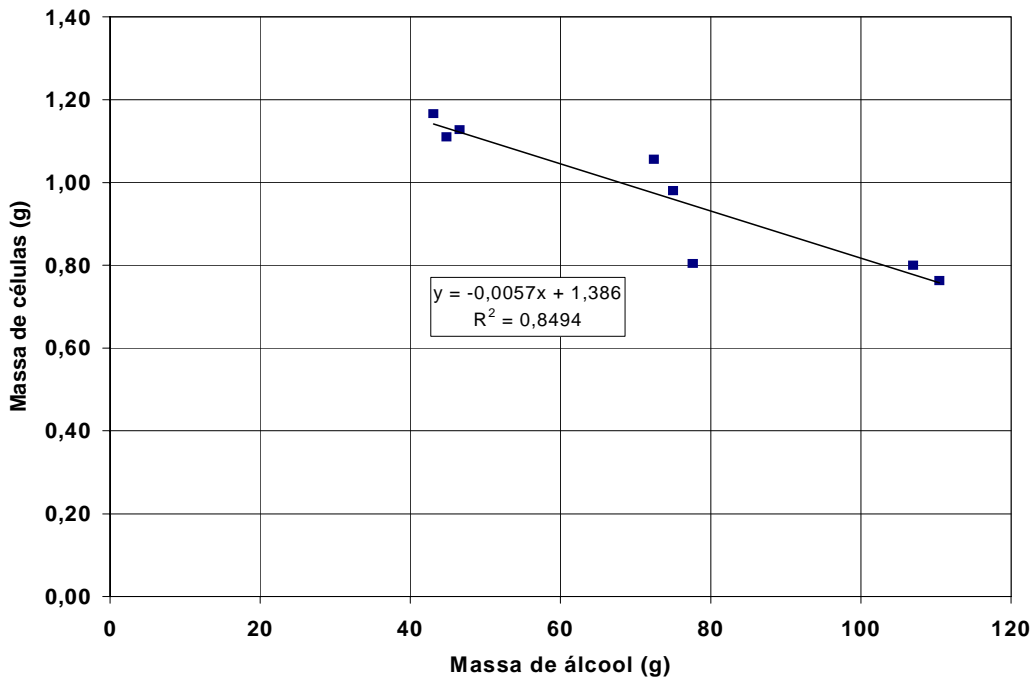


Figura 4.8 – Fator de conversão de álcool em células durante a quarta cultura (Clássico).

O fator de conversão de álcool em células obtido durante a quarta cultura foi de $0,008 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e de $0,006 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator clássico. Apesar do biorreator *airlift* apresentar também uma maior conversão de álcool em células, nota-

se que nos dois casos essa conversão é muito baixa. Assim, a vantagem do biorreator *airlift* em relação ao biorreator clássico é a maior produtividade de ácido acético e a conversão de álcool em ácido e não a conversão de álcool em células.

Novamente os resultados obtidos não foram muito bons devido à análise do teor de álcool ter sido realizada sem muita precisão.

Foi calculado o fator de conversão médio para os dois biorreatores utilizados. Para o biorreator *airlift* obteve-se um fator de conversão médio de $0,009 \text{ g.g}^{-1}$ e para o biorreator clássico $0,006 \text{ g.g}^{-1}$. Os valores obtidos não diferenciam muito dos valores obtidos graficamente.

A seguir serão apresentados os principais resultados cinéticos e estequiométricos obtidos durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados.

4.7 Principais resultados cinéticos e estequiométricos

A Tabela 4.10 apresenta os principais resultados cinéticos e estequiométricos obtidos durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados.

Tabela 4.10 – Principais resultados cinéticos e estequiométricos obtidos durante a quarta cultura para os dois biorreatores utilizados.

Biorreator	P_R máx. ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	P_R média máx. ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	μ médio (d^{-1})	$Y_{p/s}$ médio (g.g^{-1})	$Y_{x/s}$ médio (g.g^{-1})
<i>Airlift</i>	10,2	4,2	0,14	0,56	0,009
Clássico	3,0	1,6	0,10	0,25	0,006

Através da Tabela 4.10, conclui-se que o biorreator *airlift* utilizado é mais vantajoso na produção de vinagre do que o biorreator clássico utilizado, pois sua superioridade pôde ser vista em todos os parâmetros analisados.

Capítulo 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O objetivo do trabalho referente à produção de vinagre de maçã em biorreator tipo *airlift* de circulação externa foi satisfatoriamente atingido. Os vinagres produzidos nos dois biorreatores utilizados em escala laboratorial apresentaram características físico-químicas e sensoriais similares aos produzidos industrialmente, o que os tornou aptos a serem comparados com os vinagres comerciais.

Foram realizadas quatro culturas para a produção do vinagre e os resultados obtidos foram comparados com vinagres comerciais através de análises físico-químicas. Os resultados encontrados mostraram que os vinagres produzidos apresentaram um teor maior de extrato seco e cinzas por não terem sofrido um processo de filtração mais rigoroso e não terem sido clarificados. Em contrapartida algumas amostras de vinagres comerciais apresentaram valores de extrato seco e cinzas abaixo do exigido pela legislação brasileira.

Os vinagres produzidos nos dois biorreatores utilizados podem ser considerados de boa qualidade, pois atendem à legislação brasileira nos termos de produção de ácido acético e álcool. Os teores de ácido acético nos produtos finais antes da diluição ficaram em torno de 4,5 g.ác.acético/100mL e os teores finais de álcool próximos a zero.

O fermentado de maçã utilizado possuía um teor alcoólico baixo para o processo, ocasionando a adição de álcool comercial durante a acetificação para a obtenção de valores de acidez compatíveis com a legislação.

A eficiência do biorreator *airlift* em relação ao biorreator clássico pôde ser comprovada através da produtividade em ácido acético onde o biorreator *airlift* se mostrou superior. A produtividade média máxima em ácido acético no biorreator *airlift* foi de $4,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e no biorreator clássico de $1,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

A cinética de crescimento do biorreator *airlift* em relação ao biorreator clássico apresentou uma velocidade específica de crescimento média de $0,14 \text{ d}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e $0,10 \text{ d}^{-1}$ para o biorreator clássico. Apesar dos dois biorreatores apresentarem valores próximos de crescimento de células, o biorreator *airlift* apresentou uma pequena vantagem.

O fator de conversão médio de álcool em ácido para o biorreator *airlift* ($0,56 \text{ g.g}^{-1}$) foi praticamente o dobro do biorreator clássico ($0,25 \text{ g.g}^{-1}$). Essa é uma vantagem que geraria uma economia de matéria-prima reduzindo os custos de operação.

O fator de conversão médio de álcool em células foi de $0,009 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator *airlift* e de $0,006 \text{ g.g}^{-1}$ para o biorreator clássico. Nos dois biorreatores utilizados a conversão de álcool em células é muito baixa, apresentando uma pequena vantagem para o biorreator *airlift*. Com isso, conclui-se, que a vantagem do biorreator *airlift* em relação ao biorreator clássico é a maior produtividade de ácido acético e a conversão de álcool em ácido e não a conversão de álcool em células.

Através das culturas analisadas, conclui-se que o uso do biorreator *airlift* na produção de vinagres é visivelmente promissor.

Como sugestões para trabalhos futuros, propõe-se:

- Produção de vinagres em biorreatores *airlift* a partir de resíduos provenientes de processamentos industriais como, por exemplo, a produção de vinagre de maçã utilizando-se o bagaço de maçã.
- Testes de imobilização de bactérias para avaliar a possibilidade de se colocar um recheio com bactérias acéticas no biorreator *airlift*.
- Fazer a correção do fermentado de maçã, se este estiver com teor alcoólico baixo, antes de começar a cultura.
- Utilizar um processo contínuo de produção de vinagre no biorreator *airlift*.

Capítulo 6

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BELMONT. Indústria de Vinagres Belmont. Disponível na Internet: <http://www.vinagrebeltmont.com.br>, 26/06/2002.

BONNARME, P.; DELATTRE, M.; DROUET, H.; CORRIEU, G.; ASTHER, M. **Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phanerochaete chrysosporium* in agited vessels: evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors**. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 41, Pp. 440-450, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Vegetal. **Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Cerveja, Vinho, Vinho de Frutas, Fermentado de Cana, Saquê, Filtrado Doce, Hidromel, Jeropiga, Mistela, Sidra, Vinagre**. Brasília: Imprensa Nacional, 109 p., 1974.

BRASIL. **Lei N° 7.678 de 08 de Novembro de 1988**. Brasília: Imprensa Nacional, 1988.

BRASIL. **Decreto nº 99.066 de 08 de Março de 1990**. Brasília: Imprensa Nacional, 1990.

CASTELO. Indústria de Vinagres Castelo. Disponível na Internet: <http://www.vinagrecastelo.com.br>, 26/06/2002.

CEPA. Instituto CEPA de Santa Catarina. Disponível na Internet: <http://www.icepa.com.br>, 07/02/2003.

CHENG, H.P.; WANG, P.M.; CHEN, J.W.; WU, W.T. **Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor**. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, Vol. 35, Pp. 125-132, 2002.

CHISTI, M.Y. **Airlift Bioreactors**. Elsevier Applied Sciences, London, 345 p., 1989.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos** 2 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989. 652 p.

FISCHER, Sucos Indústria e Comércio. Disponível na Internet: <http://www.fischerfraiburgo.com.br>, 15/04/2001.

FRÖHLICH, S.; LOTZ, M.; KORTE, T.; LÜBBERT, A.; SCHÜGERL, K.; SEEKAMP, M. **Characterisation of a pilot plant airlift tower loop bioreactor**. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 38, Pp. 43-45, 1991.

HAMER, G. *Chemical Engineering and Biotechnology*, In: Higgins, I. J.; Best, D. J.; Jones, J.; (eds), **Biotechnology: Principles and Applications**, London: Blackwell Scientific Publications, Pp. 346-414, 1985.

HEINIG. **O uso alternativo do vinagre Heinig**. Heinig Indústria de Plásticos e Vinagre, 12 p, Brusque, 2000.

HUPE, P.; HÖKE, H.; HEMPEL, D.C. **Biological treatment of effluents from coal tar refinery using immobilised biomass.** Chemical Engineering Technology, 13:3-79, 1990.

KLEIN, J.; ROSENBERG, M.; MARKOS, J.; DOLGOS, O.; KROSLÁK, M.; KRISTOFIKOVÁ, L. **Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger* – study of mass transfer in an airlift bioreactor.** Biochemical Engineering Journal, Vol. 10, Pp. 197-205, 2002.

LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. **Bioengenharia, in: Biotecnologia.** R., Scriban (Coord.), Pp. 124-175, Ed. Manole, 1985.

MERCATURA. Disponível na Internet: <http://e-mercatura.net/glossario>, 12/02/2003.

MORETTO, E.; ALVES, R.F.; ARCHER, P.M.B.; CAMPOS, C.M.T.; PRUDÊNCIO, A. J. **Vinhos e Vinagres (processamento e análises).** Editora da UFSC. Florianópolis, 167p., 1988.

PEDRINI, M.R.S. **Desenvolvimento e aplicações de um biorreator airlift com circulação externa.** Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 101p., 1997.

POLLARD, D.J.; SHANLOU, P.A.; LILLY, M.D.; ISON, A.P. ***Saccharomyces cerevisiae* fermentations in a pilot scale airlift bioreactor: comparison of air sparger configurations.** Bioprocess Engineering. Vol. 15 (5). Pp. 279-290, 1996.

RICHWARE. Disponível na Internet: <http://www.richware.com.br>, 07/02/2003.

RIZZON, A.L; GUERRA, C.C; SALVADOR, G.L. **Elaboração de vinagre na propriedade agrícola.** Circular Técnica N° 15, EMBRAPA – Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 1992.

ROSSI, M.J. **Produção de inoculante de fungo ectomicorrízico utilizando fermentação no estado líquido em biorreator tipo airlift.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2001.

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

SIEGEL, M.H., ROBINSON, C.W. **Application of Airlift Gas-Liquid-Solid Reactors in Biotechnology.** Chemical Engineering Science, Vol. 47, Nº 13/14, Pp 3387-3394, 1992.

TAKEMOTO, S.Y. **Avaliação do Teor de Acetoína em Vinagres como forma de verificação de sua genuinidade.** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2000.

TYAGY, Z.R.D.; TRAN, F.T.; AGBEBAVI, T.J. **Mesophilic e thermofilic digestion of municipal sludge in an airlift U-shape bioreactor.** Biol. Wastes, 31:251-266, 1990.

VIAL, C., PONCIN, S., WILD, G., MIDOUX, N. **Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor.** Chemical Engineering Science, Vol. 57, Pp. 4745 – 4762, 2002.

WU, J.Y., WU, W.T. **Fed-Batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in an airlift reactor with net draft tube.** Biotechnol. Prog., Vol. 2, Pp. 230-233, 1991.

YUGUO, Z., ZHAO, W., XIAOLONG, C. **Citric acid production from the mash of dried sweet potato with its dregs by *Aspergillus niger* in an external-loop airlift bioreactor.** Process Biochemistry, Vol. 35, Pp. 237-242, 1999.

YUGUO, Z., ZHAO, W., XIAOLONG, C. **α -Amilase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor.** Biochemical Engineering Journal, Vol. 5, Pp.115-121, 2000.

Anexo I

COMPOSIÇÃO DO VINAGRE - ALGUNS ITENS PROPOSTOS PELO CODEX ALIMENTARIUS

➤ *Acidez total*

Vinagre de vinho, não menos de 6 g de ácido acético /100 ml (6° acéticos).

Outros vinagres, não menos de 5 g de ácido acético /100 ml (5° acéticos).

➤ *Álcool residual*

O álcool de fermentação que resta sem sofrer acetificação nos vinagres não deve ultrapassar de 0,5%, ainda que para o vinagre de vinho se admita 1% (1° alcoólico).

➤ *Extrato seco*

O valor do extrato seco no vinagre de vinho não deve ser menor de 1,3 g/L por grau acético. Em outros tipos de vinagre não deve ser menor de 2 g/L por grau acético.

➤ *Conservadores*

O conservador universalmente permitido em vinagres é o SO₂, ainda que o *Codex Alimentarius* também tenha proposto o antioxidante ácido ascórbico. A concentração máxima de SO₂ admitida é de 70 mg/Kg e de ácido ascórbico de 400 mg/Kg.

➤ *Aditivos*

Corante caramelo segundo as práticas comumente admitidas.

➤ *Contaminantes metálicos*

Conteúdo de arsênio, máximo 1 mg/Kg.

Conteúdo de chumbo, máximo 1 mg/Kg.

Total dos conteúdos de cobre e zinco, máximo 10 mg/Kg.

➤ *Higiene*

O vinagre deve estar livre de microrganismos que possam se desenvolver nas condições normais de armazenamento do produto, em quantidades que representem riscos para a saúde do consumidor.

O vinagre para consumo não pode conter enguias ou qualquer substância, em suspensão ou formando depósitos. Também não se admite turbidez devido ao desenvolvimento de bactérias acéticas (mãe do vinagre).

Anexo II

PARTE DO DECRETO N.º 99.066 DE 08 DE MARÇO DE 1990

Regulamenta a Lei n.º 7.678, de 08 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados do vinho e da uva.

Capítulo IV

DOS PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE

Seção VIII

Do vinagre

Art. 97. O vinho destinado à elaboração de vinagre deverá ser acetificado na origem, com vinagre duplo, de modo que apresente, após a acetificação, uma acidez acética mínima de seis milésimos, expressa em gramas de ácido acético, em cem mililitros de vinho.

Art. 98. O vinagre de duplo deverá ter uma acidez volátil mínima de oito gramas em cem mililitros do produto, expressa em ácido acético, e apresentar estabilidade biológica.

Art. 99. Somente será considerado matéria-prima, para elaboração de vinagre, o vinho- base que atender ao disposto no art. 97.

Art. 100. A fiscalização deverá executar a análise prévia e a expedição da Guia de Livre Trânsito para o vinagre destinado à acetificação do vinho.

Art. 101. Os fornecedores de vinho destinado à elaboração de vinagre providenciarão a aquisição do vinagre duplo para acetificá-lo até o limite mínimo previsto no art. 97 e o estocará em tanque próprio, em prédio isolado, distante da adega.

Art. 102. A operação de acetificação do vinho-base deverá ser feita no próprio recipiente que fará seu transporte até o destino e no local previsto no artigo precedente, com utilização de equipamento específico (bombas, mangueiras, filtros, etc.) para tal fim.

Art. 103. A acidez volátil mínima do vinagre será de quatro gramas em cem mililitros do produto, expressa em ácido acético, e o álcool residual não deverá exceder a 1° GL, sendo os outros componentes proporcionais à matéria-prima usada em sua elaboração e previstos pelo Ministério da Agricultura.

Parágrafo único. O vinagre que contiver acidez volátil superior ao dobro do previsto neste artigo, será denominado vinagre duplo, podendo ser desdobrado para fins de comercialização.

Art. 104. Ao vinagre não poderá ser adicionado caramelo ou outro tipo de corante.

Art. 105. Será proibido o uso de melão, subproduto do açúcar, mesmo como nutriente, na elaboração do vinagre.

Art. 106. O vinagre poderá ser submetido à filtração, colagem, clarificação, aeração e envelhecimento.

Art. 107. A conservação do vinagre poderá ser feita mediante pasteurização ou pelo uso de dióxido de enxofre, na quantidade máxima prevista pelo Ministério da Agricultura.

Art. 108. O uso de outro tipo de conservante, aditivo ou nutriente só poderá ocorrer mediante prévia autorização do órgão competente.

Art. 109. O grau de acidez deverá constar no rótulo ou, no caso de transporte a granel, no respectivo documento fiscal.

Art. 110. O vinagre será classificado em vinagre de vinho tinto ou vinagre de vinho branco, de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem.

Art. 111. O produto resultante da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos será denominado de fermentado acético.

Parágrafo único. O fermentado acético de outros líquidos alcoólicos poderá usar a palavra "vinagre" no rótulo, porém acrescida do nome da matéria-prima de sua origem, em caracteres de dimensão e cor iguais ao da palavra "vinagre" de maior dimensão.

Art. 112. O ácido acético do vinagre somente poderá provir da fermentação acética do vinho.

Art. 113. É vedada a produção de vinagre artificial para uso alimentar.

Art. 114. A avaliação físico-química e organoléptica ou sensorial dos vinhos e derivados, para fins de concurso ou competição pública, com divulgação ou sem ela, deverá contar com a prévia e expressa autorização dos produtores eventualmente interessados em participar, sendo obrigatória a supervisão pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, por intermédio do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho - CNPUV, que fixará as normas e métodos a serem empregados.

COMPLEMENTAÇÃO DOS PADRÕES DE IDENTIDADE E QUALIDADE PARA FERMENTADOS ACÉTICOS (VINAGRES)

Documento oficializado pela Portaria n.º 371, publicada no D.O.U. de 19/09/74 e modificado (itens 2.2 e 5.1) pela Portaria n.º 745 publicada no D.O.U. de 17/11/77.

1. OBJETO

1.1 Os presentes padrões têm por objeto estabelecer as normas de identidade e qualidade a que deverão obedecer os fermentados acéticos (vinagres).

2. DESCRIÇÃO

2.1 Definição

Fermentado acético (vinagres) é o produto obtido da fermentação acética de líquidos alcoólicos.

2.2 Classes de fermentados acéticos (vinagre)

De acordo com a matéria-prima que lhe deu origem os fermentados acéticos são classificados em:

- Vinagre de vinho ou simplesmente “vinagre”
- Vinagre de frutas
- Vinagre de álcool

2.3 Designação

2.3.1 Os vinagres serão designados conforme as respectivas classes.

2.3.1.1 Vinagre de vinho ou simplesmente “vinagre” é o produto obtido da fermentação acética do vinho.

2.3.1.2 Vinagre de fruta é o produto obtido da fermentação acética do fermentado de frutas.

2.3.1.3 Vinagre de álcool é o produto obtido da fermentação acética de uma mistura hidroalcoólica.

2.3.2 Denomina-se “concentrado duplo” ao fermentado acético cuja acidez volátil for igual ou superior a 8 g (oito gramas) por 100 mL (cem mililitros), e inferior a 12 g (doze gramas) por 100 mL (cem mililitros), expresso em ácido acético.

2.3.3 Denomina-se “concentrado triplo” ao fermentado acético cuja acidez volátil for igual ou superior a 12 g (doze gramas) por 100 mL (cem mililitros) expresso em ácido acético. A produção deste tipo somente será permitida quando a matéria-prima for o álcool.

3. INGREDIENTES BÁSICOS

3.1 O fermentado acético deverá ser preparado de mosto limpo, sem de matéria terrosa e de detritos animais ou vegetais.

4. INGREDIENTES OPCIONAIS

4.1 Na elaboração de fermentados acéticos será permitida a adição de sais nutrientes e açúcares para o desenvolvimento do fermento.

4.2 Na elaboração de vinagre de álcool é permitida a utilização de aminoácidos, vitaminas e melão, na quantidade mínima necessária à complementação do substrato de fermentação acética.

5. COMPOSIÇÃO

5.1 Os vinagres de vinho e os vinagres de frutas, deverão apresentar:

	Máximo	Mínimo
Acidez volátil, em ácido acético, em g/100 mL	-	4,0
Álcool em volume a 20° (GL)	1,0	-
Cinzas em g/L.....	-	1,0
Extrato seco reduzido em g/L: tintos e rosados.....	-	7,0
brancos	-	6,0
Sulfatos de potássio em g/L	1,0	-

5.2 Os vinagres de álcool deverão apresentar:

	Máximo	Mínimo
Acidez volátil, em ácido acético, em g/100 mL.....	-	4,0
Álcool em volume a 20° GL.....	1,0	-

5.3 Para os “vinagres concentrados” vigorarão as mesmas características e constantes analíticas exigidas para o vinagre simples, obedecidas às proporções da concentração.

6. CRITÉRIOS DE QUALIDADE

6.1 Os fermentados acéticos deverão apresentar as características organolépticas seguintes:

Aspecto: líquido, límpido e sem depósito

Cor: de acordo com a matéria-prima que lhe deu origem

Cheiro: característico

Sabor: ácido

6.2 O fermentado acético poderá ser submetido a filtração, colagem, clarificação, aeração, descoloramento pelo carvão ativo e envelhecimento.

7. PESOS E MEDIDAS

7.1 Será obedecida a legislação federal específica em vigor.

8. ROTULAGEM

8.1 Deverá ser obedecidas as normas estabelecidas pelo Decreto n.º 73.267, de 06 de dezembro de 1973 e a legislação complementar.

8.2 O vinagre resultante da fermentação acética de outros líquidos alcoólicos deverá ter no rótulo a denominação vinagre, acrescida do nome da matéria-prima que lhe deu origem, em caracteres gráficos de dimensão e cor igual a palavra vinagre.

9. AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE ANÁLISES

9.1 Os métodos oficiais de amostragem são aqueles estabelecidos no artigo 22 e seus parágrafos do Decreto n.º 73.267 de 06 de dezembro de 1973.

9.2 Os métodos oficiais de análises serão aqueles estabelecidos em Atos Administrativos do Ministério da Agricultura.

10. DISPOSIÇÕES GERAIS

10.1 Os casos omissos serão resolvidos por Atos Administrativos do Ministério da Agricultura.

Anexo III

DADOS OBTIDOS DURANTE A QUARTA CULTURA

Dados que geraram a Figura 4.1 para ambos biorreatores.

Tempo (dia)	<i>Airlift</i> - Ácido [g.L ⁻¹]	Clássico - Ácido [g.L ⁻¹]
1	16,8	16,2
2	17,4	16,8
3	21,6	18,0
4	31,8	21,0
5	33,0	22,8
6	34,2	24,6
7	34,5	25,8
8	34,8	27,0
9	39,0	28,2
10	42,6	30,0
11	43,2	35,4
12		37,2
13		41,4
14		43,8

Dados que geraram a Figura 4.2 para os dois biorreatores.

Tempo (dia)	<i>Airlift</i> - P _R média máx. (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Clássico - P _R média máx. (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
1	1,80	1,20
2	1,20	0,90
3	2,20	1,00
4	4,20	1,50
5	3,60	1,56
6	3,20	1,60
7	2,78	1,54
8	2,48	1,50

Acidez inicial (tempo zero) = 15,0 g ác.acético/L

Dados que geraram as Figuras 4.3 e 4.4 para o biorreator *airlift*.

Tempo (dia)	Biomassa (X) [g.L ⁻¹]	LnX [g.L ⁻¹]
1	0,154	-1,871
2	0,182	-1,704
3	0,209	-1,565
4	0,218	-1,523
5	0,254	-1,370
6	0,300	-1,204
7	0,345	-1,064
8	0,418	-0,872

Dados que geraram as Figuras 4.3 e 4.4 para o biorreator clássico.

Tempo (dia)	Biomassa (X) [g.L ⁻¹]	LnX [g.L ⁻¹]
1	0,218	-1,523
2	0,236	-1,444
3	0,245	-1,406
4	0,309	-1,174
5	0,345	-1,064
6	0,382	-0,962
7	0,391	-0,939
8	0,427	-0,851

Dados que geraram a Figura 4.5 e 4.7 (*Airlift*).

Massa de álcool [g]	Massa de ácido acético [g]	Massa de células [g]
201,98	107,52	0,986
198,51	109,45	1,145
146,28	133,49	1,292
143,68	193,03	1,323
141,07	196,68	1,514
92,31	200,07	1,755
90,58	198,03	1,980
44,42	195,92	2,353

Dados que geraram a Figura 4.6 e 4.8 (Clássico).

Massa de álcool [g]	Massa de ácido acético [g]	Massa de células [g]
110,46	56,70	0,763
106,99	56,95	0,800
77,64	59,04	0,804
75,03	66,57	0,980
72,43	69,77	1,056
46,55	72,57	1,127
44,82	73,27	1,110
43,08	73,71	1,166

Anexo IV

ALGUMAS DEFINIÇÕES SOBRE AS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

➤ *Acidez total*

Soma dos açúcares tituláveis, quando se eleva o vinagre a pH 7, pela adição de uma solução alcalina titulável.

➤ *Teor de Álcool – graduação alcoólica*

Porcentagem de álcool – medido em graus Gay Lussac – que o vinagre contém. Mede-se segundo a quantidade de álcool existente para cada 100 mL vinagre. Assim, um vinagre com 4° tem 4 litros de álcool puro para cada 100 L de vinagre.

➤ *Extrato seco*

Matérias secas totais; conjunto de todas as substâncias que, em determinadas condições de temperatura e pressão, não se volatilizam. Exprime-se em g/L.

➤ *Acidez Volátil*

Compreende o conjunto de ácidos voláteis formados durante a fermentação. O mais importante ácido volátil é o ácido acético, pois origina o vinagre.

➤ *Densidade (Massa específica)*

Baseia-se na relação existente entre o peso específico da amostra a 20°C em relação ao peso específico da água a 20°C usando picnômetro, densímetro eletrônico ou acessório hidrostático para balança analítica.

➤ *pH*

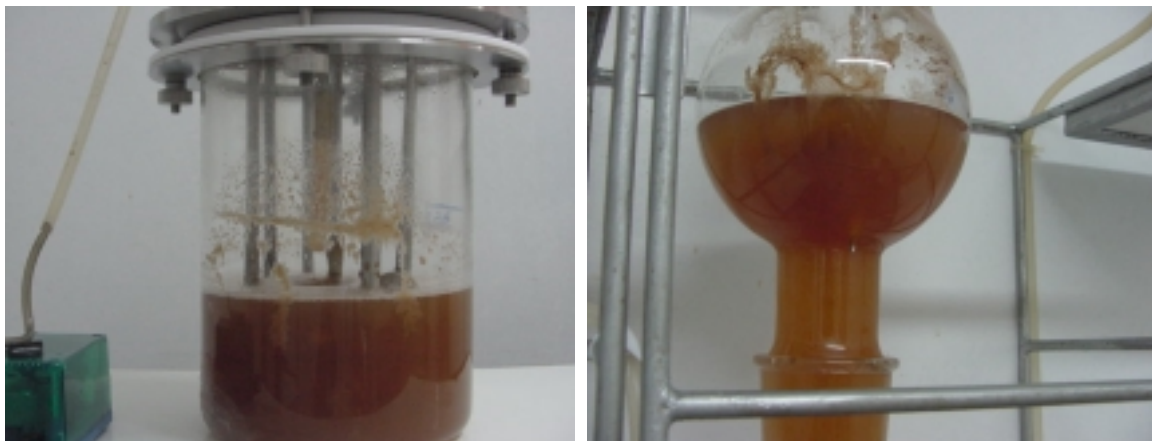
É a medida da diferença de potencial entre dois eléctrodos mergulhados no líquido estudado. Um dos eléctrodos tem um potencial que é uma função definida do pH deste líquido, o outro tem um potencial fixo e conhecido, e constitui o eléctrodo de referência.

➤ *Cinzas*

Fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica e inorgânica volátil quando a amostra é incinerada a $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral.

➤ *Mãe do vinagre*

Substância gelatinosa que se forma durante a fermentação acética devido às bactérias acéticas. A Figura 1 mostra a formação da “mãe do vinagre” durante o processo de produção de vinagre nos biorreatores *airlift* e clássico



(a)

(b)

Figura 1 – Formação da “mãe do vinagre” durante a produção de vinagre no biorreator clássico (a) e, no biorreator *airlift* (b).