



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**

**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA PROCESSOS**



**Potencialidades biotecnológicas da algaroba (*Prosopis juliflora Sw, DC*) para produção de fermento biológico**

**Manoel Ferreira Alves**

**CAMPINA GRANDE-PB.**

**Maiio/2008**

**POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora* Sw,  
DC) PARA PRODUÇÃO DE FERMENTO BIOLÓGICO**

Por

**Manoel Ferreira Alves**

**Orientador: Prof. Dr. Mário Eduardo R.M. Cavalcanti Mata**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Processos, na Área de Desenvolvimento de Processos.

CAMPINA GRANDE  
Estado da Paraíba - Brasil  
Maio/2008

**POTENCIALIDADES BIOTECNOLÓGICAS DA ALGAROBA (*Prosopis juliflora Sw, DC*) PARA PRODUÇÃO DE FERMENTO BIOLÓGICO**

<b>BANCA EXAMINADORA</b>	<b>Parecer</b>
<hr/> <p>Prof<sup>o</sup> Dr. Mário Eduardo R. M. Cavalcanti Mata (Orientador DEAG/UFCG)</p>	<hr/>
<hr/> <p>Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Elita Martins Duarte (Orientador DEAG/UFCG)</p>	<hr/>
<hr/> <p>Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Odélsia Leonor Sánchez de Alsina (Examinador - DEQ/UFCG)</p>	<hr/>
<hr/> <p>Prof<sup>o</sup> Dr. Hélio de Lucena Lira (Examinador - DEMA/UFCG)</p>	<hr/>
<hr/> <p>Prof<sup>o</sup> Dr. José Soares (Examinador – DTQA/UFPB)</p>	<hr/>
<hr/> <p>Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aurélia A. Idrogo (Membro DEP/UFPB)</p>	<hr/>

## FICHA CATALOGRÁFICA

ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

A474p

2008 Alves, Manoel Ferreira.

Potencialidades biotecnológicas da algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC) para produção de fermento biológico / Manoel Ferreira Alves. — Campina Grande, 2008.

147f. : il.

Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Referências.

Orientadores : Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elita Martins Duarte.

1. Algaroba. 2. Biotecnologia. 3. Fermento. I. Título.

CDU – 635.65(043)(043)

## **Dedico**

À minha mulher, grande incentivadora  
dos meus projetos de vida e aos meus filhos,  
em especial, a Maura Emilia, a minha nova esperança.

## **Ofereço**

Aos meus queridos pais “in memoriam”  
por terem me ensinado valores e princípios  
que nunca vão mudar e, decerto trarão bons  
frutos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, sem o qual nada seria possível, e por meio d'Ele venci mais uma etapa de minha vida.

Por ter colocado pessoas na minha vida que contribuíram para que eu pudesse alcançar mais um degrau na minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti-Mata, meus agradecimentos especiais pela valiosa orientação, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente, em relação ao incentivo as minhas atividades de doutoramento.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>, Maria Elita Martins Duarte pela sua importante colaboração e atuação presencial no tocante à organização do trabalho bem como pelas suas constantes palavras de incentivo que gentilmente, muito me lisonjearam.

Ao Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande que sempre esteve à disposição para colaborar, cujas sugestões somaram-se a este trabalho.

Ao prof. Dr. Edison R. Tribolli, do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, pelo sua amizade e inestimável contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandir Gonçalves de Oliveira da Universidade Federal de Alagoas, meus sinceros e carinhosos agradecimentos, pela amizade e sua prestimosa colaboração, ligado a sua longa experiência que o faz um exemplo de profissionalismo.

Ao Digníssimo prof. Dr. Walter Borzani, professor emérito da USP, os meus respeitos e satisfação em poder contar com sua honrosa contribuição cujas sugestões, foram valiosíssimas para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cícero Eduardo Ramalho Neto, da Universidade Federal de Alagoas, pela importante contribuição dada a esse trabalho no tocante à análise de identificação de tipagem genética das leveduras pesquisadas.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ, da Universidade de São Paulo, pelo carinho e amizade, assim como pelo seu incentivo e contatos permanentes, por meio dos quais pude contar com informações importantes para este trabalho.

À Secretaria de Integração Universidade-Sector Produtivo - SIUSP, da Universidade Federal da Paraíba, representada pelo Prof. Dr. Luiz Renato Pontes, pela sua gentileza e apoio irrestrito prestado ao trabalho de campo.

Ao Dr. José Erasmo de Souza Filho, do Setor de Ensino da Petrobrás, grande colega e incentivador das minhas iniciativas, especialmente no que se refere ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Souto Coutinho, do Departamento de Engenharia de Produção da UFPB, pelas suas palavras de incentivo em todos os momentos.

Ao Prof. Nivalson Fernandes de Miranda, titular do Departamento de Farmácia e Bioquímica Industrial, conceituado pesquisador da área de fermentação que sempre colaborou com informações de caráter relevante para este trabalho.

Ao colega José Gonçalves de Almeida, profissional de competência tecnológica inegável que muito contribuiu no dimensionamento e construção de equipamentos de interesse para o trabalho.

Ao colega Clovis Gouveia da Silva, pelo companheirismo e coleguismo ao longo de nossas andanças pelas regiões que integram o semi-árido, unindo forças com o objetivo de agregar valor a vagem da algarobeira pesquisada nesse trabalho.

Ao colega José Carlos Ferreira, pela sua valiosa participação durante as longas horas ininterruptas de monitoramento dos processos de congelamento e liofilização, assim como pela amizade e carinho.

A Agar-Brasileiro S. A., empresa instalada em João Pessoa, que não se furtou em colaborar e incentivar esta pesquisa, uma vez que o produto objeto da pesquisa tem estreita ligação com o material produzido em sua unidade fabril.

A GIASA, empresa especializada na produção de álcool, que não se negou em nenhum momento em prestar a sua contribuição na execução de análises físico-químicas e cromatográficas.

A Socorro Valadão, a quem não poderia deixar de agradecer, esse grande exemplo de figura humana que acompanhou à minha luta, e que esteve sempre presente, dando forças para realização deste trabalho.

Ao querido amigo Dr. Leônidas Lima Bezerra pelas palavras de incentivo, carinho e atenção que me fortaleceram nessa jornada.

Enfim, a todos que estiveram presentes e se dispuseram ajudar em todos os momentos, contribuindo direta e indiretamente dentro de um esforço conjunto, para a concretização deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Breve histórico</b>	<b>7</b>
2.1.1 Principais componentes da vagem	9
2.1.2 Algaroba – alternativa como meio de fermentação	10
<b>2.2 Seleção, isolamento e caracterização de leveduras</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Aspectos relacionados com a biotecnologia e cultivo de leveduras</b>	<b>16</b>
2.3.1 Outras metodologias aplicadas ao cultivo de leveduras	20
2.3.2 Exigências nutricionais das leveduras	21
<b>2.4 Reprodução celular – Cultivo de leveduras selvagens</b>	<b>22</b>
2.4.1 Parâmetros de produção	23
2.4.2 Importância do oxigênio na produção de leveduras	25
2.4.2.1 Funções específicas do oxigênio – Processo de respiração	26
2.4.2.2 Suprimento e demanda de oxigênio – processos aerados	28
2.4.3 <b>Processo de fermentação</b>	<b>31</b>
2.4.3.1 Produção de leveduras – fermento biológico	33
2.4.3.2 Leveduras como fonte de produtos químico-biológicos	34
2.4.3.3 Principais enzimas extraídas de leveduras	35
2.4.3.4 Produtos derivados da biotecnologia avançada de leveduras	37
<b>2.5 Viabilidade celular em cultivo de leveduras</b>	<b>46</b>
<b>2.6 Emprego de técnicas de preservação de leveduras</b>	<b>47</b>

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Fluxograma do Processo - descrição</b>	<b>48</b>
3.1.1 Descrição do processo	49
<b>3.2 Metodologia de produção do fermento biológico de algaroba</b>	<b>54</b>
3.2.1 Colheita e seleção das vagens de algaroba	54
3.2.2 Caracterização química e físico-química da vagem de algaroba	54
<b>3.2.3 Utilização das leveduras selecionadas do caldo de algaroba</b>	<b>55</b>
3.2.3.1 Agente fermentativo	55
3.2.3.2 Preparo do Caldo	55
3.2.3.3 Preparo do xarope	56
3.2.3.4 Preparo dos meios de crescimento e de isolamento	56
3.2.3.5 Meio usado no isolamento de leveduras selvagens	56
3.2.3.6 Fases de propagação	58
3.2.3.7 Metodologia de seleção e isolamento	58
3.2.3.8 Metodologia de identificação genética de leveduras	59
<b>3.3 Monitoramento do cultivo de leveduras – Produção de fermento</b>	<b>59</b>
3.3.1 Cultivo usando parâmetros cinéticos e operacionais	60
3.3.2 Cultivo de leveduras selecionadas em caldo de cana	61
3.4 Separação e padronização do fermento	61
3.5 Centrifugação e liofilização do fermento	62
3.6 Análises de viabilidade celular	62
<b>4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>65</b>
4.1 Caracterização e avaliação das vagens de algaroba	66
4.2 Seleção e isolamento de linhagens de leveduras da algaroba	69

<b>4.3 Avaliação do fermento produzido a partir de leveduras selecionadas</b>	<b>74</b>
4.3.1 Cultivo natural em produção de biomassa	75
4.3.2 Cultivo natural em número de células	80
4.3.2.1 Cinética de produção do cultivo natural	82
4.3.2.2 Cultivo com agitação	84
4.3.2.3 Cultivo com aeração	86
4.3.2.4 Cultivo com agitação e aeração	89
4.4 Cinética representativa do crescimento global	92
4.5 Cinética representativa do consumo de açúcares redutores totais	93
<b>4.6 Desempenho das leveduras selecionadas em caldo de cana</b>	<b>94</b>
<b>4.7 Cinéticas de congelamento e secagem do fermento produzido</b>	<b>97</b>
<b>4.8 Viabilidade celular do fermento biológico</b>	<b>109</b>
<b>5.0 CONCLUSÕES</b>	<b>116</b>
<b>6.0 RECOMENDAÇÕES</b>	<b>117</b>
<b>7.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>118</b>
<b>8.0 ANEXOS</b>	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Algarobal cultivado a partir de raleamento	3
Figura 2	Leveduras puras e selvagens	15
Figura 3	Visão do brotamento da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
Figura 4	Reprodução da Célula de Levedura	24
Figura 5	Mecanismo de conversão de substrato	33
Figura 6	DNA do <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
Figura 7	Diagrama Típico de Uma Liofilização	45
Figura 8	Fluxograma do Processo Produtivo	48
Figura 9	Prensa hidráulica	49
Figura 10	Biorreator utilizado no processo	51
Figura 11	Liofilizador	53
Figura 12	Inoculação e propagação de leveduras	57
Figura 13 -	Fases de seleção e isolamento das células de leveduras	58
Figura 14 -	Vista do campo de observação da câmara de Newbauer	63
Figura 15	Viabilidade celular	64
Figura 16	Mapa do semi-árido do Estado da Paraíba	65
Figura 17 -	Colônias de Leveduras	71

Figura 18	Identificação Genética de Leveduras	72
-----------	-------------------------------------	----

### **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1	Cultivo Natural – Produção de Biomassa	79
Gráfico 2	Cultivo Natural em População Microbiana	80
Gráfico 3	Crescimento de Leveduras Com Agitação	81
Gráfico 4	Crescimento de Leveduras Com Aeração	82
Gráfico 5	Crescimento de Leveduras Com Agitação e Aeração	89
Gráfico 6	Cinética Representativa do cultivo global	92
Gráfico 7	Cinética Representativa do Consumo de Açúcares	93
Gráfico 8	Desempenho das Leveduras Selvagens Cultivadas em Caldo de Cana	96
Gráfico 9	Cinética de Congelamento do Fermento a $-40^{\circ}\text{C}$	97
Gráfico 10	Cinética de Congelamento do Fermento a $-170^{\circ}\text{C}$	98
Gráfico 11	Cinética de Congelamento do Fermento a $-196^{\circ}\text{C}$	101
Gráfico 12-a	Modelo de Page para a secagem do fermento a $-40^{\circ}\text{C}$	104
Gráfico 12-b	Modelo de Cavalcanti Mata para secagem do fermento a $-40^{\circ}\text{C}$	104
Gráfico 13-a	Modelo de Page para secagem do fermento a $-170^{\circ}\text{C}$	105
Gráfico 13-b	Modelo de Cavalcanti Mata para secagem do fermento a $-170^{\circ}\text{C}$	105
Gráfico 14-a	Modelo de Page para secagem do Fermento a $-196^{\circ}\text{C}$	106

Gráfico 14-b	Modelo de Cavalcanti Mata para secagem do Fermento a – 196° C	106
Gráfico 15	Viabilidade celular do fermento úmido	113
Gráfico 16	Viabilidade celular do fermento liofilizado	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição Química da Vagem de Algaroba	9
Tabela 2	Análise estatística simplificada dos componentes da vagem	66
Tabela 3	Composição centesimal das vagens das microrregiões do semi-árido	67
Tabela 4	Composição química complementar das vagens do semi-árido	67
Tabela 5	Análise qualitativa do caldo de algaroba	68
Tabela 6	Análise genética das leveduras selvagens	72
Tabela 7	Crescimento em Produção de biomassa	76
Tabela 8 -	Cultivo Natural em Caldo de Algaroba – População	81
Tabela 9 -	Consumo de A.R.T. na Produção de Leveduras	82
Tabela 10	Comportamento das Diversas Linhagens Seleccionadas em Caldo de Cana	95
Tabela 11	Parâmetros físicos na fase de congelamento a -40°C	98
Tabela 12	Parâmetros físicos na fase de congelamento a – 170°C	102
Tabela 13	Parâmetros físicos na fase de congelamento a -196°C	103

Tabela 14	Coeficientes dos Modelos propostos para a secagem por liofilização	107
Tabela 15	Viabilidade do fermento liofilizados nas três temperaturas pesquisadas	110
Tabela 16	Análise estatística fatorial	111
Tabela 17	Viabilidade dos fermentos úmido e liofilizado	112
Tabela 18	Avaliação do produto final	115

## SIMBOLOGIA

No	Número inicial de células, expresso em população microbiana	23
N	Número final de células	24
Xo	Concentração inicial de células, expresso em $M_x/V$ (inoculo)	24
X	Concentração final	24
G1	Célula original em processo de crescimento	24
M	Processo de divisão celular por mitose	24
n	Número de gerações ou duplicações	25
$t_d$	Tempo de duplicação	25
dC/dt	Velocidade de oxigenação	28
C*	Concentração de oxigênio na fase de equilíbrio	29
C <sub>L</sub>	Concentração de oxigênio na fase líquida	29

S	Concentração de substrato	33
M <sub>x</sub>	Massa celular	33
M <sub>s</sub>	Massa de substrato	33
Y <sub>p/s</sub>	Fator de rendimento ou rendimento	33
K <sub>L</sub>	Coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida	33
K <sub>r</sub>	Coeficiente de respiração celular	33
a	Área de interface líquido-gás	33
X <sub>m</sub>	Concentração de células relacionada com a demanda de oxigênio	33
α	Taxa de aeração (Q/V)	88
Q <sub>ar</sub>	Vazão volumétrica de ar	88
V	Volume de meio a ser fermentado (Litro)	88
r.p.m.	Rotações por minuto	88
J	Fator relacionado com a razão de temperatura (RT)	98
k	Coeficiente de transferência de calor/coeficiente de secagem	98
η	Coeficiente do Modelo de Page & Cavalcanti Mata	107
U <sub>o</sub>	Teor de água inicial	135
U <sub>e</sub>	Teor de água de equilíbrio	135
U	Teor de água em um determinado instante	135

## RESUMO

ALVES, M. F. **Potencialidades Biotecnológicas da Algaroba (*Prosopis juliflora*, Sw, DC) Para Produção de Fermento Biológico**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande – Campina Grande (PB)

O caldo resultante da extração de vagens da algaroba (*Prosopis juliflora*, Sw, DC) foi usado como meio de cultivo para o crescimento de leveduras. Esta pesquisa foi desenvolvida em três etapas: seleção e isolamento, propagação e produção de leveduras. Com base nos princípios microbiológicos de propagação, as células provenientes da multiplicação, foram submetidas a diluições sequenciais em tubos e destes, para placas de Petri, de onde as leveduras foram criteriosamente selecionadas e isoladas. Foram isoladas 5 (cinco) leveduras denominadas ALG-1, ALG-2, ALG-3, ALG-4 e ALG-5 dentre as quais, duas se destacaram na produção de fermento, a ALG-3 e ALG-4. Estas foram identificadas geneticamente como sendo dos gêneros *Saccharomyces* e *Zigosscharomyces* respectivamente. As condições ambientais de cultivo foram semelhantes às da fermentação alcoólica tradicional que usa caldo de cana-de-açúcar ou melaço como meio de crescimento de leveduras. As variáveis foram monitoradas por meio de um fermentador de mistura completa provido de programa de controle para atender as condições crescimento das leveduras. O pH foi ajustado em 4,5; a temperatura em  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e concentração de substrato na faixa de 25 a 30g/litro. Quanto às variáveis operacionais, a taxa de oxigenação por aeração foi controlada em 0,5 v.v.m. e velocidade de agitação em 250 r.p.m. Além do cultivo natural, foram realizados cultivos com agitação e aeração em separado e, com essas operações, de forma simultânea. As leveduras selecionadas do caldo de algaroba, quando testadas e cultivadas em caldo de cana de açúcar superaram as leveduras comerciais. O fermento produzido foi submetido a congelamentos prévios, usando três temperaturas:  $-40^{\circ}\text{C}$ ,  $-165^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ , seguido de secagem por liofilização. A liofilização realizada a temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  resultou em uma maior estabilidade celular do fermento ao longo de 4 meses. Neste trabalho, foram estudadas as cinéticas tanto do processo fermentativo quanto do processo de liofilização. Finalmente, foram efetuados estudos de viabilidade celular e técnicas de preservação das culturas das leveduras. Este trabalho pôde mostrar que a algaroba é uma valiosa fonte de fermento biológico.

**Palavras-chave:** Algaroba, biotecnologia, fermento.

## ABSTRACT

ALVES, M. F. **Biotechnological potentially of mesquite (*Prosopis juliflora Sw*, DC) for yeast production.** 2008. Thesis (Doctorate in Process Engineering). Federal University of Campina Grande – Campina Grande (PB)

In present work, the broth of mesquite (*Prosopis juliflora sw*, DC) was used for growth of microorganisms, especially yeasts that naturally canning to be fermented. The research was developed in three steps: Selection and isolation, propagation and yeasts production. The strains of yeasts isoled were named ALG-1, ALG-2, AIG-3, ALG-4 and ALG-5 where ALG-3 and ALG-4 presented high performance in fermentation process. These strains were genetically analysed how being *Saccharomyces and Zigossacharomyces* type. The conditions environmental of culture were equal at alcoholic fermentation that use how culture medium juice of sugar cane and molasses. Variables were monitored and controlled through fermentor programmed with physical and chemical system sensors and projected of accord with yeast production process. The pH was maintained in 4,5; temperature of  $30^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , and optimal concentration of substrate also was maintained in 25g/liter. The operations variables used were air flow rate per medium volume united of 0,5 v.v.m. This flow rate measured the concentration of dissolved oxygen and stirrer speed was controlled in 250 rotation per minute. The propagation of cells resulted in series dilutions for a selection and isolation of strains/ yeast into more criterions methods, and well characterized with basis in the microbiological and genetic procedures. The fermentation processes were developed in batch with agitation and aeration. The yeasts selected of the broth of mesquite were tested in juice of sugar cane where yield was higher so as the commercial yeast. The yeasts selected were previously freezed at temperatures of  $-40^{\circ} \text{C}$ ,  $-165^{\circ} \text{C}$  and  $-196^{\circ} \text{C}$ , succeeded by freeze drying process. The freeze drying at temperature of  $-40^{\circ} \text{C}$  resulted in a good stabilitidy so long 4 month of stocking. The data analysis was utilized for studies of the kinetics of fermentative process and of yeast drying by liophilization. In this phase, were evaluated the influence of the better cryoprotectant medium for the maintenance of yeast cell viability. This work can show that mesquite é the big source of yeast production.

Keywords: Mesquite, biotechnology, yeast.

## RESUMEN

ALVES, M. F. **Potencialidad biotecnológica del algarrobo (*Prosopis juliflora*, Sw, DC) para producción de fermento biológico.** 2008. Tese (Doctorado en Ingeniería de Procesos). Universidad Federal de Campina Grande – Campina Grande (PB), Brazil.

El caldo que resulta de la extracción del fruto del algarrobo (*Prosopis juliflora*, Sw, DC) fue utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de levaduras. Esta investigación fue desarrollada en tres etapas: selección y aislamiento, propagación y producción de levaduras. Las levaduras separadas en tubos fueron sometidas a refrigeración a una temperatura de menos 4°C para posteriormente ser utilizadas en los procesos de fermentación. Estas levaduras fueron denominadas ALG-1, ALG-2, ALG-3, ALG-4 e ALG-5. Solamente, dos fueron usadas con destaque, a ALG-3 e ALG-4 que fueron genéticamente identificadas como *Saccharomyces* e *Zicossacharomyces*. Las condiciones ambientales de cultivo fueron semejantes a la fermentación alcohólica tradicional que normalmente utiliza el caldo de la caña-de-azúcar como medio de crecimiento para producción de fermento. Las variables controladas en el experimento fueron pH de 4,5, temperatura de 30°C con una tolerancia de 2°C y sustrato concentrado en 25 y 30g/litro. Las variables operacionales fueron concentración de oxígeno mantenido en 0,5 v.v.m, y agitación en 250 r.p.m. La metodología utilizada en esta investigación comprendió la multiplicación de las levaduras en nivel de laboratorio, con el objetivo de producir fermento biológico. En el experimentos, fueron realizados cultivos por medio de agitación e aireación de forma separada y simultáneamente. El fermento producido fue sometido a congelamiento en las temperaturas de -40°C, -170°C y -196°C seguido de deshidratación por liofilización (secaje e eliminación de sustancias volátiles a temperatura baja e sobre presión reducida). La liofilización a temperatura de -40° C fue a que resultou mayor estabilidad en un periodo de 4 meses de almacenamiento. Como resultados se puede apuntar la determinación de la cinética de los procesos fermentativo y de liofilización. El cultivo de estas levaduras también fue realizado en caldo de caña-de-azúcar. Finalmente, fue realizado estudios de la viabilidad celular y de preservación de las culturas de levaduras de algarrobo. Este trabajo puede mostrar que el algarrobo es una valiosa fuente de fermento orgánico.

Palabras-chave: Algarrobo, Biotecnología, levadura.

## 1- INTRODUÇÃO

Algaroba é o nome dado ao fruto da algarobeira, planta largamente difundida e cultivada na região do semi-árido do Nordeste brasileiro. Cientificamente, pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* sendo atualmente conhecidas cerca de 44 espécies.

A algarobeira é uma planta que cresce razoavelmente bem nos desertos do continente americano e em alguns desertos africanos, sendo eminentemente xerófila. Trata-se de uma cultura nativa de regiões áridas que vão do sudoeste norteamericano até a Patagônia, na Argentina. A espécie predominante no Brasil é a *Prosopis juliflora*, originária do deserto do Piura no Peru. Todavia, outras espécies, ao longo das últimas décadas, foram selecionadas para diversos fins, por meio de estudos vinculados a empresas especializadas como a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Dentre estas, destacam-se principalmente, o *Prosopis tamarugo*, *P. nigra*, *P. alba* e *P. chilensis*, sendo as duas últimas, destinadas especificamente à produção de aguardente e álcool por via fermentativa, conforme BARROS (1982).

As espécies do gênero *Prosopis* são, em geral, arbustos de tamanho médio ou não muito raro, árvores de grande porte, que podem atingir uma altura de 20 metros, e seu tronco medindo pouco mais de um metro de diâmetro. Além disso, possui uma rede de raízes laterais distribuídas na superfície, ligadas a raízes pivotantes que penetram solo adentro em busca de águas subterrâneas. Outros cultivares de algaroba, não muito comuns, chegam a atingir 60 metros de profundidade. Essa planta tem se adaptado em áreas inóspitas onde outras plantas jamais se adaptariam, sendo bem caracterizadas pelas suas raízes alongadas, capazes de captar águas a uma profundidade média de 30 metros, conforme reportado por AGIDE (1987).

Esta planta foi introduzida no Nordeste, mais precisamente, na região do semi-árido durante a década de 1940, onde apesar de algumas controvérsias, se adaptou muito bem àquela região.

Além das características peculiares, a sua vagem é extremamente rica em proteína e componentes energéticos cujo teor de açúcares, chega a 40%, em média, o que lhe confere o poder bioenergético. Possuem proteína bruta com teores acima de 12%, sendo constituída de

proteínas digestivas em quase toda sua totalidade, (FIGUEIREDO, 1984), além de sais minerais. Quanto às dimensões das vagens, não há uma uniformidade em termos de comprimento e largura, em geral, o seu tamanho médio é de 25 cm de comprimento e 1 cm de largura.

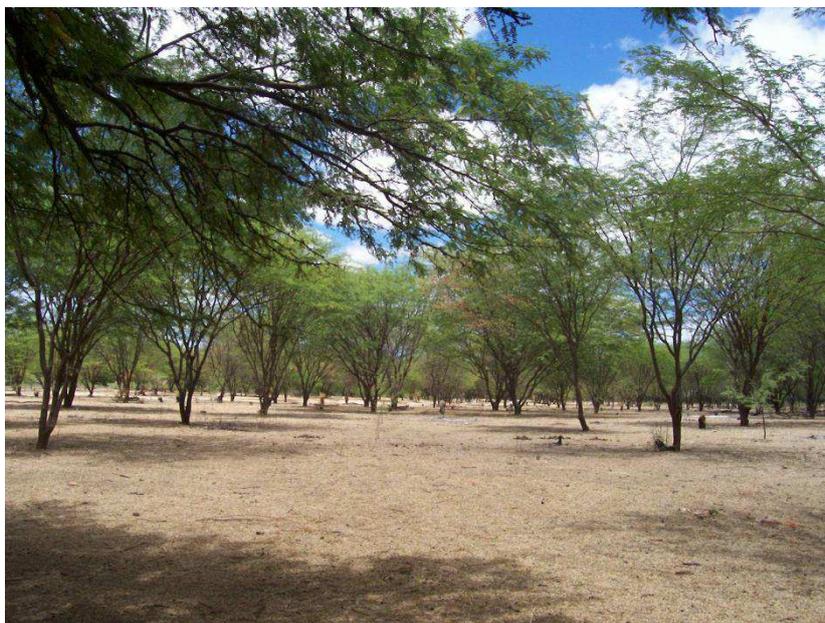
Nas regiões áridas e semi-áridas, há séculos, a algaroba vem sendo usada como alimento para humanos e animais. Algumas variedades permitem o desenvolvimento da apicultura por terem propriedades nectaríferas (GOMES, 1991). Quando moídas de forma artesanal, dão origem a uma espécie de farinha usada para diversos fins culinários. O extrato aquoso obtido após cocção das vagens, depois de concentrado, gera um produto escuro e denso, lembrando mel de abelhas. As vagens moídas e torradas são utilizadas no preparo de uma bebida que substitui o café, sendo comum a utilização desses produtos por populações rurais. Nos últimos 25 anos, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de estudar melhor a forma de aproveitamento das vagens na elaboração de novos produtos.

Diante desse quadro, a algarobeira tem concorrido de modo decisivo para que a economia do semi-árido não entre em colapso. É imponderável a sua participação econômica em todo e qualquer lugar onde foi implantado o seu cultivo.

Além do uso integral da vagem, é uma planta que protege os solos com sua sombra e faz com que haja incorporação de matéria orgânica através de suas raízes, folhas e estruturas florais após fecundação. Dentre outras vantagens, possibilita também a recuperação de solos salinizados, completamente estéreis para qualquer outra planta. Além dessas vantagens, tem evitado assoreamento nos rios durante o período de inverno.

Por outro lado, em virtude da falta de parâmetros para o seu cultivo, dados relativos à sua produtividade são ainda pouco precisos, onde a produção de vagens por hectare é muito variável. Sabe-se que a produtividade, da maneira com que é cultivada na atualidade, não vai além de 8 toneladas por hectare, quantidade que corresponde ao fornecimento de néctar para aproximadamente 250 litros de mel de abelha. Estudos mais atualizados, relatados por SUASSUNA (2007), têm mostrado que o uso de enxertia pode aumentar expressivamente a sua produtividade, a partir de sistema de cultivo planejado, com espaçamento de 10 m em forma de triângulo equilátero. Nessas condições, com adensamento máximo de 330 plantas por hectare, é possível aumentar para 20 a 22 toneladas de vagens por hectare/ano.

Isto significa uma quantidade de néctar suficiente para produzir de 600 a 700 litros de mel de abelhas. Estas estimativas são baseadas em dados reais, porque são conhecidas algumas e poucas variedades que chegam a produzir até 200 kg de vagens, individualmente, numa só safra. Seu ciclo de produtividade é relativamente curto, passando a produzir seus primeiros frutos a partir do 3º ano de vida e, daí em diante, sua produção é anual, cuja safra vai de novembro até fevereiro. Ocasionalmente, tem se constatado períodos de sucessivas safras quando o inverno é prolongado, o que proporciona alta produtividade. A Figura 1 mostra o cultivo planejado de algaroba na forma de raleamento.



**Figura 1** - Algarobal planejado a partir de raleamento

O fato de se tratar de uma planta que retira muita água do solo tem se tornado, eventualmente, alvo de polêmica. Largamente encontrada em regiões áridas e semi-áridas, a algarobeira vem se destacando por sua capacidade de resistência a longos períodos de estiagem, mantendo-se verde durante o ano todo.

Trata-se de um arbusto dotado de propriedades importantes como leguminosa fixadora de nitrogênio, que é uma das suas grandes vantagens. Atualmente, estão sendo selecionadas e identificadas novas variedades em diferentes partes do mundo, com o objetivo de contribuir com a revitalização do meio ambiente, principalmente no reflorestamento de regiões consideradas críticas, evitando assim, o processo de desertificação (MENDES, 2001).

Apesar de alguns questionamentos, de caráter momentâneo porque passa esta planta, antes vista com certo descrédito e até mesmo indesejável, trabalhos de comprovação científica contribuíram para o seu reconhecimento pela National Academy of Science, destacando a algaroba como uma leguminosa de alto valor nutricional, importante para o desenvolvimento de regiões menos favorecidas.

Outra grande vantagem da algaroba, refere-se ao fato de se tratar de um produto natural oriundo de uma cultura que permite, por via biológica, a utilização de tecnologia limpa, isto é, sem comprometer o meio ambiente.

Diante desse quadro, as inovações tecnológicas associadas aos incessantes progressos da ciência têm propiciado a abertura de atividades em campos multidisciplinares, em que o aproveitamento da algaroba engloba ecologia, biologia, microbiologia, cultura de tecidos, tecnologia de alimentos e principalmente, nutrição.

Atualmente, os sistemas biológicos ou processos de bioprodução, possibilitam a obtenção de bens e serviços, de caráter econômico e social, que seguramente, poderão contribuir com o desenvolvimento sustentável regional. Ultimamente, trabalhos envolvendo crescimento de leveduras a partir da propagação de células têm sido desenvolvidos com resultados altamente positivos, empregando-se a biotecnologia tradicional.

O caldo de algaroba, considerado como meio de cultura natural, por excelência, apresenta características bem peculiares, cujas especificidades são favoráveis aos processos de fermentação. O mais importante é que seus componentes nutricionais induzem a ocorrência de microrganismos, a exemplo de outros meios naturais que contêm fontes de carbono e energia (OLIVEIRA, 2003).

Meios naturais a exemplo do caldo de algaroba, foram estudados com certo pioneirismo por ARRUDA (1994), cujos estudos foram direcionados especificamente para produção de álcool. Segundo este autor, a fermentação alcoólica e a produção simultânea de levedura alimentar podem, desencadear outros processos com múltipla aplicação da vagem, dentre as quais: a seleção, isolamento e caracterização genética de novas linhagens de leveduras bem como a produção de alimentos e bebidas por fermentação, e outros produtos alimentícios de

interesse econômico.

O desenvolvimento industrial na atualidade, está atrelado à busca de novos produtos e, a biotecnologia moderna tem sido um instrumento de inovação que, na prática, é imprescindível para a sobrevivência de boa parte das empresas. A algaroba é uma matéria prima que poderá contribuir com a inovação desses sistemas de produção. Neste contexto, acham-se disponíveis os recursos da biotecnologia, como ferramenta para o monitoramento e controle desses processos de produção.

Esta é uma forma de contribuir com a expansão do mercado de alimentos e de produtos fermentados. A tecnologia das fermentações é uma área que abrange todos esses processos, para os quais, as condições de operacionalização são facilmente controláveis, em face desses parâmetros serem amplamente estudados nos processos de bioengenharia.

Diante da possibilidade da manipulação desses processos, a algaroba surge como alternativa, onde podem ser exploradas as suas potencialidades biotecnológicas principalmente, como fonte de produção de leveduras. Nesta pesquisa, o que diferencia dos processos tradicionais é a matéria-prima que é constituída de caldo de algaroba ao invés de caldo de cana de açúcar e/ou melão que são usados de forma mais ampla, na produção de fermento biológico.

Enfim, com o enfoque que vem sendo dado nas últimas pesquisas com a biotecnologia da algaroba, pretende-se neste trabalho, abrir um espectro de novos produtos voltados não só para os setores de panificação e sucro-alcooleiro, como mais especificamente, para os que utilizam metodologia moderna de sistemas de bioprodução.

## 1.1 Objetivos

**Geral:** Pesquisar sobre as potencialidades biotecnológicas da algaroba para produção de fermento biológico.

**Específicos:**

- Caracterizar, a partir de uma amostragem da região do semi-árido, as vagens da algaroba que possam se adequar melhor como matéria-prima para o desenvolvimento da pesquisa;
- Selecionar, isolar e caracterizar novas linhagens de leveduras a partir do caldo de algaroba;
- Produzir fermento a partir das linhagens selecionadas em caldo de algaroba estudando-se as variáveis cinéticas e operacionais exigidas para esse fim;
- Testar as linhagens selecionadas em caldo de cana de açúcar para efeito de estudo comparativo com as leveduras comerciais usadas nesse tipo de processo;
- Avaliar as cinéticas de congelamento e secagem do fermento biológico produzido do caldo de algaroba;
- Analisar a viabilidade celular do fermento de algaroba assim como as técnicas de preservação que possam assegurar um grau de pureza e estabilidade das células de leveduras.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Breve histórico

Desde a sua implantação no Brasil em 1942 até os dias atuais, a algaroba tem servido permanentemente de suporte alimentício, especialmente para a região do semi-árido nordestino, onde a sua aplicação se restringe à agropecuária, especialmente, na criação de caprinos, ovinos e bovinos, conforme relatado por BARROS (1982). A vagem é rica em açúcares, proteínas e sais minerais. A maior parte dos seus componentes tem sido eficaz no processo de crescimento e engorda desses animais.

Embora nativa de outros países, a algarobeira é uma planta que pelas características e potencialidades poderá agregar valor e contribuir com o desenvolvimento sustentável do semi-árido, especialmente do Nordeste.

Segundo CAMPELO (1984) a vagem da algarobeira vem sendo estudada há mais de 4 décadas, embora só a partir da segunda metade dos anos 80, algumas formas de aproveitamento foram desenvolvidas e, principalmente alternativas de interesse alimentar, partindo da vagem “in natura” processada, como farinha destinada a fabricação de pães, bolos e biscoitos, dentre outros, e produto alimentício com qualidades semelhantes ao café.

BRAGA (1987) ao examinar certas vagens, chegou a identificar algumas variedades do Gênero *Prosopis*, cujas flores são ricas em néctar, as quais têm produzido um mel comparável àqueles mais conhecidos na apicultura.

Uma bebida conhecida e muito comum nos países da América do Sul, produzida a partir da vagem, a algarobina, é um produto recomendável para a saúde por possuir características e funções medicinais. A obtenção de açúcar e produtos bioquímicos de interesse econômico também tem sido desenvolvida usando a algaroba como matéria-prima (AZEVEDO, 1999).

Outros produtos ligados à química mais refinada têm sido obtido a partir dos componentes da semente, cujo endosperma é constituído basicamente de proteínas e polissacarídeos. A semente, embora tenha grande importância para outros processos como alternativa tecnológica, para processos de fermentação especificamente, esta parte da vagem é completamente descartável. Todavia, quimicamente tem sido reconhecido o seu alto valor protéico. A quantidade de proteína na semente chega a 34 %, em média, além de possuir um polímero de alto peso molecular, o “galactomanano” que se constitui em um dos seus principais componentes que pode agregar valor à vagem, FIGUEIREDO, (1984).

Além desses componentes, a casca da algaroba possui de 6 a 7% de ácido tânico, conhecido comumente como tanino, produto muito usado nos curtumes e produz uma resina de cor amarela que tem substituído a goma arábica.

Dentro dessa linha de processos, destacam-se produtos como estabilizante, espessante e emulsificante, sem contar com outras aplicações como por exemplo, modificador de textura em certos sistemas de gel, açúcar líquido dietético que, pode ser obtido a partir do xarope de algaroba, conforme MENDES (2001).

Do ponto de vista de fermentação, a algaroba é uma matéria-prima alternativa com amplas possibilidades de aproveitamento pelas características bem peculiares que a tornam susceptíveis de sofrer bio-transformação. Dados relatados nas últimas décadas por BRAZ, (1999) mostram a importância dos componentes do fruto da algarobeira assim como do seu valor nutricional. Ao mesmo tempo, a quantidade de açúcares contida na vagem a coloca na condição de produto energético natural, somado aos demais componentes que também são de interesse alimentar.

Produtos tão importantes quanto as proteínas e fibras, em quantidades consideráveis, também estão presentes na vagem integrando boa parte da sua composição. Trabalhos publicados recentemente mostram que seus açúcares têm propriedades hipoglicêmicas, isto é, permitem controlar os níveis de açúcares na corrente sanguínea, e são recomendados para pessoas acometidas de diabete, (OLIVA, 2005)

A algaroba tem sido considerada um produto de reconhecido valor econômico em

praticamente todos os países da América do Sul, porém no Brasil, suas aplicações ainda são muito limitadas. Diante das suas potencialidades bioquímicas, outros produtos envolvendo biotecnologia de ponta podem ser desvendados a partir da seleção e caracterização genética de novas linhagens de microrganismos que podem ter um vasto campo de aplicabilidades..

### 2.1.1 Principais componentes da vagem de algaroba

O percentual médio de 45 % de sacarose e glicose na vagem, conforme GOMES, (1991) justificam o seu aproveitamento como matéria-prima para os processos de fermentação. Além dos componentes que integram a sua composição, o néctar também contribui para que a vagem se torne um produto natural e bioenergético que surge como alternativa emergente e com grande potencial de aproveitamento nos processos que usam os recursos da biotecnologia.

Os dados compilados na Tabela 1 mostram a diversidade e riqueza dos componentes que constituem a vagem de algaroba. Estes, naturalmente oferecem condições capazes de se transformarem, quando embebidos, em um caldo nutriente que pode conduzir a uma fermentação.

**Tabela 1:** Composição físico-química da vagem da algarobeira

Componentes	Concentração (g/100g)
Umidade	12,53
Proteína bruta	12,92
Fibra bruta	21,30
Açúcares Redutores	2,52
Açúcares Não Redutores	43,52
Açúcares Totais	46,04
Carboidratos	65,80
Lipídios	3,20
Cinzas	4,15
V.C.T.*	333,00 Calorias

Fonte: FIGUEIREDO (1984)

\* VCT = Valor calórico total

De acordo com os últimos trabalhos relatados, a análise fitoquímica das vagens de

algaroba levou ao isolamento de uma substância que depois de submetida à caracterização estrutural utilizando técnicas espectroscópicas usuais, foi identificada como “*juliprosopina*”, um alcalóide piperidínico, amplamente divulgado na literatura, como toxina, pelos seus efeitos considerados nocivos, segundo alguns autores (TABOSA, 2000; SILVA, 2002).

Essa substancia, por ter gerado algumas controvérsias ultimamente, estudos mais aprimorados mostram que esses produtos, especificamente nos processos de fermentação, podem ser eliminados totalmente por processo físico, com aquecimento brando. Como se trata de proteína de baixo peso molecular, o uso de temperatura acima de 50°C é suficiente para eliminar esse problema, pois nesta faixa de temperatura, as proteínas se desnaturam facilmente.

Por outro lado, a corrida à biotecnologia tem se tornado uma forte aliada nesse processo que, em breve, será possível eliminar as características indesejáveis da algaroba e acentuar apenas, as desejáveis. Eliminado estas substancias, a fermentação segue o seu curso normal, sem interrupção de substancias que se acham presentes no meio que possam inibir o processo.

Os processos físicos e bioquímicos, e, sobretudo, os biotecnológicos, são os meios pelos quais atualmente se pode aproveitar melhor o potencial da vagem, por se tratar de metodologia tecnológica já consolidada. A sua utilização envolve desde a área de alimentos até a de saúde humana e animal, colocando-a dentro das tendências mercadológicas de bio-produtos que podem propiciar alta demanda.

### 2.1.2. Algaroba – alternativa como meio de fermentação

A algaroba, além de servir tradicionalmente como alimento para populações rurais, pode também se transformar, quando triturada e embebida em água, em um meio de fermentação alternativo tecnicamente viável. Estudos preliminares realizados, comprovam a eficiência desse meio. Para um processo de fermentação, o mais importante é que a composição da matéria prima contenha, em primeiro lugar, açúcares fermentáveis, e em segundo, componentes complementares como nitrogênio e sais minerais. Tanto o nitrogênio quanto os sais minerais têm contribuições importantes no processo como um todo.

Experimentos já comprovados, mostram que o caldo de algaroba, contém todos esses componentes, principalmente açúcares, que conduzem ao processo de fermentação natural. Ao mesmo tempo, os nutrientes e elementos contidos nesse meio, induzem à presença espontânea de agentes microbianos que por sua vez, atuam como precursores da fermentação. Como esses microrganismos, têm tendência natural em fermentar, logo levam a produção de álcool e paralelamente, a de fermento. Portanto, o caldo de algaroba, assim como os demais meios naturais, conduzem a uma fermentação natural onde são formados simultaneamente, álcool e fermento.

Outra forma de processamento com essa mesma finalidade, tem sido efetuada a partir da vagem triturada e embebida em água quente. Esse processo resulta em um meio líquido semelhante a um xarope ou mel de baixa densidade, o qual poderá ter dupla aplicação: uma como meio de cultivo ou meio de fermentação e outra, como xarope para produção de açúcar por evaporação, MENDES, (2001). O aproveitamento do caldo como meio de crescimento, despertou interesse devido a necessidade constante de se recorrer a pesquisa e ao desenvolvimento de novos produtos. Os microrganismos presentes nesse meio podem ser selecionados e isolados por meio de técnicas microbiológicas adequadas, podendo ter interesse industrial.

Em relação a esses processos, THIEMANN (1998) relata informações importantes sobre a contribuição dos processos biotecnológicos dando ênfase, desde a pesquisa básica até a implantação de projetos.

Os primeiros experimentos de bancada com caldo de algaroba, foram realizados na Universidade Federal de Alagoas – UFAL, no início da década de 90, onde foram elaborados testes de propagação e multiplicação leveduras, (OLIVEIRA, 2003). No desenvolvimento destes testes, foram adotadas as mesmas variáveis de cultivo usadas nos processos tradicionais de fermentação como pH, °Brix e temperatura. Esses experimentos, foram aprimorados mais tarde, usando-o como meio de crescimento.

Em relação ao uso da algaroba como meio de fermentação, os processos pioneiros especificamente tratando de fermentação alcoólica, só foram desenvolvidos em 1994 quando ARRUDA (1994), através de pesquisa aplicada, mostrou pela primeira vez, simulação de processo de produção de etanol, em micro-escala, partindo do caldo extraído da

vagem da algarobeira. Neste trabalho, foi comprovada a eficiência de fermentação na produção de álcool de algaroba, no qual foi usado fermento selecionado comercial.

O álcool assim obtido por via biológica, serviu de embasamento e/ou como ponto de partida para outras pesquisas direcionadas para o aproveitamento de forma racional, do potencial biotecnológico dessa cultura.

Trabalho desenvolvido nos últimos anos em pesquisa voltada para a produção de aguardente mostrou a possibilidade de se obter esse produto a partir de leveduras selvagens presentes no próprio caldo, isto é, partindo de leveduras naturais sem selecioná-las, (SILVA, 2002).

### 2.1.3 Seleção, isolamento e identificação de leveduras selvagens

Uma população microbiana, sob condições naturais, contem muitas espécies de microrganismos. Com os recursos da microbiologia, torna-se possível selecionar, isolar, enumerar e identificar os microrganismos. As etapas seguintes tratam da sua classificação e caracterização. A ciência da taxonomia inclui a classificação (arranjo), nomenclatura (nomes) e identificação (descrição e caracterização) dos organismos vivos. A taxonomia é o meio pelo qual se chega ao sistema formal de organização, classificação e nomenclatura dos microrganismos, KREGER, (1994). Em geral, é usado um sistema binomial de nomenclatura. Cada espécie recebe um nome constituído de duas palavras, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. O primeiro termo representa o nome do gênero e o segundo, representa a espécie.

Ocasionalmente, é necessário subdividir uma espécie em variedades. Isto ocorre quando existem diferenças funcionais em uma mesma espécie gerando informações insuficientes para o surgimento de uma nova espécie. Um exemplo prático disso pode ser o *Saccharomyces cerevisiae* var. *floculans*, que significa uma levedura normal com a função de flocular. Estes, realmente, são fatores de suma importância para auxiliar no agrupamento das linhagens de acordo com o habitat da levedura (BARNETT et al. 1998).

Dentro deste princípio, taxonomicamente, as leveduras são classificadas como microrganismos eucariotos, heterotróficos e unicelulares.

Nos últimos anos, técnicas de seleção e identificação de leveduras foram aprimoradas e novos gêneros e espécies foram descritos e rearranjados, segundo CABRINI & GALLO (2000). Leveduras e fungos tipo-leveduras (Yeast-like-fungi) associados a substratos naturais, pertencentes aos gêneros *Pichia* e *Hansenula*, foram estudados e rearranjados em outros gêneros e sub-gêneros. Assim sendo, outras leveduras foram estudadas e bem caracterizadas pela heterogeneidade e confirmadas por análises taxonômicas mais profundas.

A seleção e isolamento de leveduras do gênero *Candida*, também podem ser estendidos para outras espécies de leveduras, como é o caso das leveduras do caldo de algaroba, (NEVES et al. 2006). Pode-se observar claramente que, a vagem em sua composição química, comporta uma grande quantidade de nutrientes que formam um meio de cultivo completo, com características próprias e capacidade de uso para outros fins.

Estudos mais direcionados especificamente para seleção e isolamento de linhagens de leveduras do caldo de algaroba foram desenvolvidos (RAMALHO NETO, 2005) respectivamente na Universidade Federal de Alagoas - UFAL e Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/Universidade de São Paulo, tendo em vista o interesse em aumentar os seus respectivos bancos e coleções de microrganismos, (BASSO et al. 1995).

Os procedimentos de como selecionar os microrganismos são tradicionalmente aplicados por meio de técnicas microbiológicas básicas segundo CARL-GÖRAN & ILLÉNI (1980). Alguns pesquisadores tem direcionado esses métodos para a diversidade microbiana oriunda de plantas e frutos tropicais. Nesse contexto, pode incluir a algaroba. A fonte natural de leveduras encontra-se em geral nas plantas, em suas partes somáticas como folhas, flores, frutos e raízes, grãos de cereais e outros substratos provenientes de processamento industrial.

Devido ao processo de propagação e a facilidade de manipulação por meio de técnicas da microbiologia, as leveduras podem ser selecionadas a partir de análises de tipagem genética usando marcadores moleculares para a devida confirmação do gênero e espécie (FERREIRA & CATAPÁGLIA, 1996). O crescimento a temperaturas elevadas em meios com altos teores de açúcares, a exigência de vitaminas, a susceptibilidade a certas substâncias inibitórias expostas no meio e a produção de determinados fatores metabólitos são critérios usados na descrição e classificação de leveduras.

MALDONADO et al. (1985) mostram algumas possibilidades de aplicação da fermentação alcoólica no aproveitamento de culturas e/ou frutas tropicais como caju, abacaxi, amora, banana, entre outros. A seleção e o isolamento de leveduras estão basicamente ligadas a metodologia microbiológica enquanto a identificação está relacionada com técnicas mais sofisticadas e avançadas como a biologia molecular e métodos que envolve reação em cadeia da polimerase. Em geral, nesses casos, são usados marcadores moleculares para identificação de microrganismos.

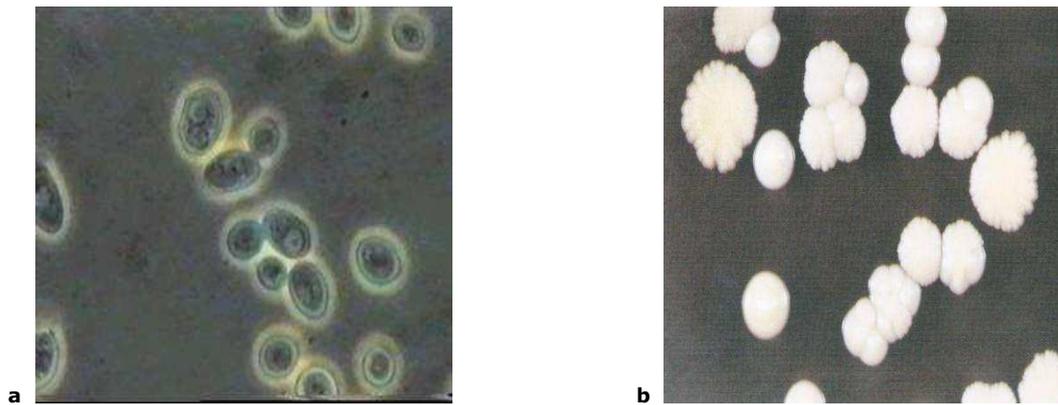
Em geral, as leveduras alcoolgênicas usadas nas destilarias brasileiras são selecionadas. Todavia, estas são afetadas por inúmeras reciclagens que ocasionam interferências advindas da flora do próprio caldo, do ambiente e de outras fontes, tornando-se vulnerável à contaminação por outros microrganismos, inclusive leveduras indesejáveis, (PEREGO et al. 1981). Métodos de monitoramento microbiológico possibilitam o controle de forma rápida e eficaz nesses casos.

O surgimento de leveduras com caráter “Killer” em meios dessa natureza, tem oportunizado estudos de seleção de leveduras pertencentes aos grupos *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, (TOSTA, 2006). As leveduras expostas por longo tempo de fermentação podem acarretar também mutação genética segundo o mesmo autor.

Uma variedade largamente usada na indústria alcooleira do Brasil tem sido o *Saccharomyces uvarum* (IZ-1904) que é uma levedura selecionada e isolada da casca e do caldo da uva.

No processo de seleção natural, pode-se distinguir uma levedura pura de uma levedura selvagem pelo aspecto físico apresentado. A levedura de panificação ou de cervejaria, por exemplo, forma colônias lisas, brilhantes e bordas regulares que a caracteriza como pura. Por outro lado, as leveduras selvagens, presentes geralmente em caldos naturais, apresentam colônias de superfície rugosa e bordas irregulares.

A Figura 2, mostra claramente as diferenças básicas entre uma levedura pura e uma levedura selvagem, as quais, são muito distintas.



**Figura 2** – Leveduras puras - *Saccharomyces cerevisiae* (a) e Leveduras selvagens (b)  
Fonte: AMORIM (2005)

As leveduras selvagens são encontradas naturalmente no caldo de cana de açúcar e outros caldos naturais constituídos de fontes sacaríneas, como por exemplo, o de caldo de algaroba. Trabalhos, dentro dessa linha de seleção, foram desenvolvidos por NEVES et al. (2006), usando o caldo de frutos tropicais como meio de crescimento.

Inúmeros trabalhos de pesquisa sobre seleção e identificação de novas linhagens proveniente de caldos naturais têm sido desenvolvidos de forma a contribuir com os atuais sistemas de produção que usam processos de fermentação, SCAVUZZI, (2007).

A Biotecnologia tradicional empregada nas destilarias e usinas de todo país, tem sido consideravelmente melhorada ao longo dos últimos anos. A manipulação adequada de técnicas modernas de isolamento tem permitido colocar à disposição dos meios empresariais, novas cepas e/ou linhagens com o objetivo de atender os mais diversos fins industriais.

As cepas selecionadas, em especial, do gênero *Saccharomyces*, tem tido grande aplicabilidade na agroindústria sucro-alcooleira além do seu uso mais tradicional na indústria de panificação.

O desenvolvimento industrial no momento, por circunstâncias ou exigências de mercado tem forçado preferencialmente a obtenção de produtos orgânicos, a partir de linhagens naturais ou selecionadas que não comprometam o processo ao invés de organismos geneticamente modificados, os chamados OGMs. Embora, no momento, o uso desses organismos, ainda tem sido discutível por questões de bio-segurança ou de legislação específica, porém isso não descarta a importância e a contribuição que esses microrganismos

possam trazer para os processos de fermentação.

Outros processos mais modernos ligados ao desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase - PCR (Polymerase Chain Reaction) mostram a importância do uso de marcadores moleculares como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para identificação e caracterização genética de microrganismos. Os marcadores de DNA se prestam ao uso de estudos, especialmente, de mapeamento e análises de similaridade e distância genética. É uma técnica usada para detectar polimorfismos de DNA e as marcas de DNA podem ser utilizadas para identificar plantas ou isolados de um microrganismo, (WILLIAMS et al. 1990).

Diante dessa preocupação, inúmeros trabalhos tem sido desenvolvidos no sentido de buscar novas linhagens naturais. MATIENZO (2002), cita trabalho com resultados extremamente positivos do ponto de vista genético com o emprego de cepas de leveduras selecionadas, sobretudo do gênero *Saccharomyces*, com excelente produtividade e eficiência bioquímica em processos de fermentação.

#### 2.1.4 Aspectos relacionados com a biotecnologia e cultivo de leveduras

A arte de produzir vinhos e produtos fermentados faz parte de um referencial teórico que está ligada à história da humanidade. Embora, por muitos anos, a fermentação tenha sido explorada como método de preservação de alimentos e bebidas, em um passado mais recente é que Louis Pasteur identificou microrganismos como os responsáveis pelo processo. Pois, somente em 1850 ele concluiu que a transformação do açúcar em etanol dependia da existência de células vivas ou seja, de leveduras que são fungos unicelulares, amplamente distribuídos na natureza, (RUSSEL & STEWART, 1996). E a partir daí, demonstrou que as leveduras possuíam habilidade simultaneamente respiratória e fermentativa, de onde surgiu a metodologia de obtenção de culturas puras.

Historicamente, a levedura desempenha um papel fundamental na fabricação do pão, um alimento muito conhecido pelo homem desde tempos remotos. Esse organismo, em condições anaeróbicas conduz a fabricação de bebidas fermentadas e fermento-destiladas, cujos produtos são amplamente conhecidos (CRUEGER & CRUEGER, 1997).

As primeiras observações de leveduras foram feitas por Antonie Van Leeuwenhoek em 1680, quando analisava a fermentação da cerveja. Mais tarde, em 1826, ficou comprovado que as leveduras de cerveja e vinho apresentavam capacidade de reprodução por gemulação, (COLUCCI, 2004).

As leveduras são microrganismos que constituem um produto totalmente natural, não transgênico, conhecido como fermento, e que tem uma expressiva importância na alimentação humana. São classificadas como fungos, formadas por uma única célula que possuem reprodução vegetativa por brotamento ou fissão.

Cientificamente, o elemento básico do processo de fermentação é um microrganismo de células simples ou microrganismo unicelular, taxonomicamente denominada *Saccharomyces cerevisiae* (Levedo de cerveja).

MAMEDE & PASTORE, (2004) mostram a importância da biotecnologia de leveduras aplicada no aproveitamento de sucos de determinadas espécies de uvas. Os meios naturais são verdadeiras fontes de microrganismos, especialmente leveduras.

LIMA & GOLDANI, (2004) mencionam que depois da formulação da estequiometria da fermentação por Gay-Lussac (1815), Pasteur (1863) demonstrou a natureza microbiológica da fermentação alcoólica como um processo anaeróbico e ainda, que durante as primeiras décadas de 1900 as pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química do açúcar em etanol e gás carbônico no interior da levedura.

Com o decorrer do tempo, em função das pesquisas na área de fermentações houve a necessidade de se buscar novas tecnologias para a obtenção de produtos de valor econômico. Recentemente, a fermentação tem emergido como uma tecnologia fundamental e vital, como suporte integrante da biotecnologia moderna.

Dentro desse princípio, trabalhos importantes como o de LALUCE (2004) mostra a capacidade de produção da leveduras selvagens de cana-de-açúcar bem como as suas funções mais específicas ligadas à eficiência e rendimento do processo de fermentação. Esse trabalho, trouxe contribuições importantíssimas para os processos que envolvem a fermentação

alcoólica usada tradicionalmente em destilarias que integram área agro-industrial alcooleira do Brasil.

LOPES (2005), desenvolveu trabalhos com cultivo de leveduras, da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, mostrando a maneira mais prática de como proceder a seleção e o monitoramento de células crescidas em caldo de cana.

Atualmente, os sistemas que aplicam biotecnologia de leveduras são responsáveis por uma gama de processos e produtos que movimentam atualmente uma fração considerável da economia tanto no mercado interno quanto no externo. O desenvolvimento desses processos tem despertado interesse nos meios empresariais induzindo a busca de novas investigações científicas com o objetivo de ampliar o leque de novos produtos. A sua utilização envolve desde a área de alimentos até a de saúde, colocando-o dentro das tendências mercadológicas como um produto de altíssima demanda.

As leveduras, em geral, dependem de fontes de carbono orgânico para o seu crescimento e obtenção de energia, sendo os carboidratos, os nutrientes de maior importância. Alguns açúcares simples como glicose, frutose e manose são assimilados por todas as espécies estudadas, enquanto que alguns oligossacarídeos, polissacarídeos, álcoois primários, polióis, ácidos orgânicos, pentoses, tetroses, hidrocarbonetos e lipídeos são utilizados seletivamente por algumas espécies (TAVARES, 2004).

No caso particular da algaroba, embora se trate de um meio rico ou completo, tem-se verificado a ocorrência de substâncias até certo ponto indesejáveis, como dextrinas, amido e proteínas. Estas substâncias têm dificultado o processo de contagem, segundo COSTA (2004). Embora sendo pouco menores, as proteínas se confundem com as leveduras. São recomendados procedimentos que envolvam o uso de aglutinizantes como asfílica, por exemplo, que tem o poder de aglutinar as proteínas facilitando o processo de arraste por decantação. As substâncias em suspensão, podem ser eliminadas também por simples aquecimento, embora alguns estudiosos não recomendem esta operação pelo fato de comprometer as características fisiológicas das leveduras (ANDRIETTA & RODRIGUES, 2005).

Quanto à pureza do fermento são usados métodos especiais, com álcalis adequados para

essa determinação. BELLUCO (2001) desenvolveu trabalho com cultivo de leveduras, do gênero *Saccharomyces*, mostrando a maneira mais prática de como proceder para analisar o fermento produzido em caldo natural, quanto à forma de purificar.

Os processos pioneiros envolvendo especificamente fermentação alcoólica, em 1994 foram desenvolvidos por meio de processo de simulação em micro-escala, partindo do caldo extraído da vagem da algarobeira. Este trabalho mostrou a possibilidade de se produzir álcool a partir de algaroba usando fermento Fleischmann, uma variedade do *Saccharomyces cerevisiae*, comercialmente conhecido como, fermento de panificação. Neste trabalho foi usada a tecnologia de fermentação tradicional por meio conduzido em batelada ou processo descontínuo.

No final da década de 90, essa pesquisa foi aprimorada por OLIVEIRA (2003) quando desenvolveu os primeiros testes de propagação de leveduras visando a produção de álcool. Nesses experimentos, foi utilizado meio de cultivo à base de caldo de algaroba extraído da vagem triturada e embebida a frio.

Utilizando processos com melhores eficiências de extração, a partir da vagem triturada e embebida a quente, SILVA (2002) desenvolveu protótipo visando à fabricação de aguardente. O desenvolvimento desse processo despertou interesse em outros pesquisadores na busca de novas investigações científicas objetivando ampliar o leque de novos produtos derivados da algaroba.

De acordo com PEREGO et al. (1981), esses resultados podem ser melhorados desde que sejam atribuídos parâmetros de produção pertinentes do ponto de vista técnico e científico. Segundo AGIDE, (1987) o caldo de algaroba é constituído de uma verdadeira fonte de microrganismos, da qual podem ser extraídas bactérias e leveduras de interesse para a indústria.

#### 2.1.4.1 Outras metodologias aplicadas ao cultivo de leveduras

Atualmente, a tecnologia de leveduras imobilizadas está sendo testada na produção de cerveja, por ser uma técnica moderna usada como instrumento para reduzir o tempo de fermentação e aumentar a velocidade específica de crescimento celular. Este é um fator que

está intimamente ligado com o aumento de produtividade.

Por outro lado, NAGODAWITHANA, (1994) em seus trabalhos, mostrou a formação de compostos geradores de sabor e aromas, durante a fermentação, produzidos por leveduras, especificamente do gênero *Saccharomyces, var carlsbergensis*.

Melhoradores de sabor e aromas derivados de leveduras estão ligados provavelmente a ação direta e simultânea de álcoois superiores, dicetonas, aldeídos, compostos sulfurados (H<sub>2</sub>S, DMS e SO<sub>2</sub>), ésteres e ácidos graxos, sempre presentes nos mostos alcoólicos. A engenharia enzimática, a engenharia microbiológica, a engenharia metabólica e tecnologia de DNA recombinante, conhecida como engenharia genética, dentre outras técnicas modernas, tem sido usadas para melhorar cada vez mais os chamados processos biotecnológicos, (MOSHY, 1987; ALLEN, 1993; RUSSEL & STEWART, 1996).

Esses conhecimentos multidisciplinares têm mostrado a importância da produção de leveduras, sobretudo para consumo humano, e como fonte dos mais diversificados produtos bioquímicos.

Modernamente usa-se a biotecnologia de leveduras como meio para se obter melhoradores de sabores alimentares. Outras características das leveduras decorre da presença de determinados compostos orgânicos que se formam paralelamente no meio e, que são responsáveis pelo desenvolvimento do sabor, aromas e odor. Trata-se de características organolépticas que dependem exclusivamente das matérias-primas e dos microrganismos, especialmente leveduras, usados no processo (QUAGLIA, 1991).

Ainda dentro deste contexto, enquadra-se o processo de fabricação de cerveja que pouco tem mudado em relação ao que foi desenvolvido pioneiramente na Alemanha em 1519. Malte, lúpulo, água e fermento são os ingredientes básicos, porém hoje, são utilizadas adicionalmente, matérias-primas ricas em carboidratos, chamadas de ingredientes complementares como é o arroz, o milho ou o xarope oriundo da cerveja. Esses complementos são adicionados ao malte para melhorar a fermentação e as leveduras desenvolvidas nesse processo, são responsáveis pelo o aroma e sabor. (OTTO, 1985).

Por outro lado, OSZLANYL (1980) realizou trabalho, em escala de bancada, sobre

produção de proteínas de organismos unicelulares especialmente com leveduras da espécie *Candida guilliermondii*. As proteínas de unicelulares, na década de 70 foram denominadas de SCP (Single Cell Protein), representando a biomassa formada a partir de leveduras.

#### 2.1.4.2 Exigências nutricionais das leveduras

As leveduras são importantes fontes de carbono, nitrogênio, fosfatos de magnésio, cálcio e potássio. Em menor proporção, porém indispensáveis, estão os minerais como o manganês, o ferro e o cobalto que atuam favoravelmente de forma conjunta, em suas atividades vitais. Esses minerais são essenciais ao crescimento.

Em estudos mais aprimorados, com meio de composição química conhecida são levados em consideração pelo menos 6 elementos minerais como essenciais para o crescimento de leveduras, (ROTHMANN et al. 1987)

Em ordem de importância, são: fósforo, magnésio, sódio, potássio, manganês e cobalto, os quais são supridos na forma de sais de fosfato e sulfato. No entanto, traços de elementos como: cobre, ferro e zinco são também essenciais, especialmente para propagação de leveduras assim como para a fermentação.

Esses minerais atuam como parte integrante das proteínas como ativadores de enzimas e funcionam como co-fatores nas reações bioquímicas intracelulares. Eles atuam também como estabilizadores para as proteínas. O magnésio, por exemplo, é essencial para o crescimento da levedura, exercendo o papel de ativador de enzimas, principalmente de certo número de descarboxilases, (OWEN, 1996).

Igualmente, a adição de zinco no meio também contribui com o crescimento da levedura. O zinco é um importante co-fator de enzimas, dentre as quais se destacam: a álcool-desidrogenase, a anidrase carbônica e a carboxipeptidase.

#### 2.1.4.3 Processo de reprodução das leveduras

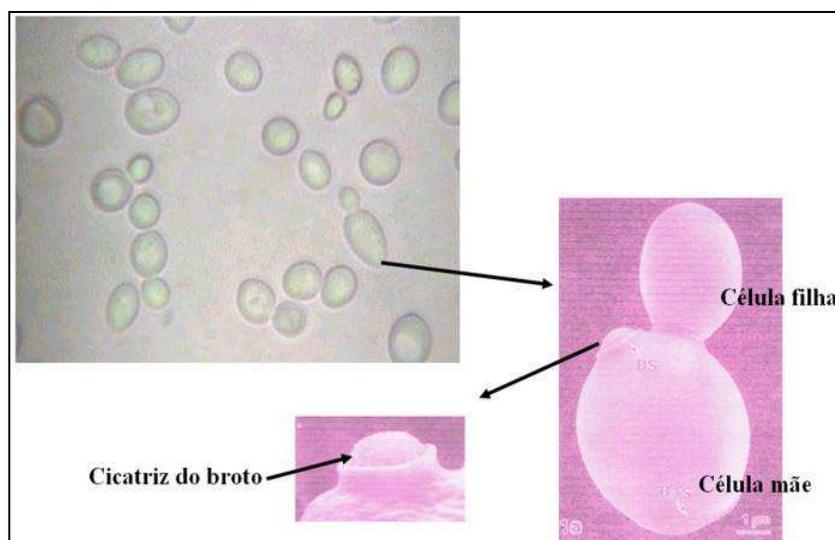
As leveduras são as mais antigas fontes de proteínas unicelulares. Seu tamanho varia

bastante, de 1 a 5 $\mu$ m de diâmetro a 5 a 15 $\mu$ m de comprimento. Elas possuem formas arredondadas, desde esféricas até células elípticas, estas em alguns casos alongadas, segundo BORZANI (1999). Crescem rapidamente em meio simples e natural gerando alta densidade celular.

As leveduras têm sido de grande interesse no momento para área sucroalcooleira pelo fato de se tratar de microrganismos que tem participação direta nos processos de produção de bebidas fermentadas e fermento-destiladas, (BELLUCO (2001). Deste modo, o agente microbiano mais conhecido nos processos de fermentação, é o *Saccharomyces cerevisiae*, principal gênero.

A constituição das leveduras é muito variável, em geral, com predominância de carboidratos e em menor proporção, de proteínas e gorduras. A levedura *S. cerevisiae*, obtida no processo de fermentação de cana-de-açúcar é a mais difundida comercialmente no Brasil. Outras matérias-primas de origem vegetal tem sido exploradas com a mesma finalidade, principalmente na produção de álcool combustível.

Algumas espécies se reproduzem por divisão binária à semelhança das bactérias. Aquelas que não apresentam um processo de reprodução sexuada, são chamadas pseudo-leveduras e são classificadas como *Fungi imperfecti* (THORN & REED, 1991). O processo mais comum de reprodução assexuada é o brotamento, desenvolvendo-se principalmente na fermentação alcoólica, do qual resultam células-filhas inicialmente menores que a célula mãe. Apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa em células jovens e rígidas em células adultas. Na Figura 3 pode-se observar essas particularidades das leveduras.



**Figura 3** - Visualização do brotamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fonte: LOPES (2005)

Ambas se reproduzem por brotamento, ou seja, há formação de um broto ou uma célula filha durante o tempo de geração. À medida que ocorre o rompimento da célula filha, há formação de uma cicatriz na célula mãe. Em média, uma célula mãe é capaz de produzir 16 brotos, deixando cicatrizes decorrentes de reproduções sucessivas.

#### 2.1.4.4 Crescimento de Leveduras: Parâmetros cinéticos

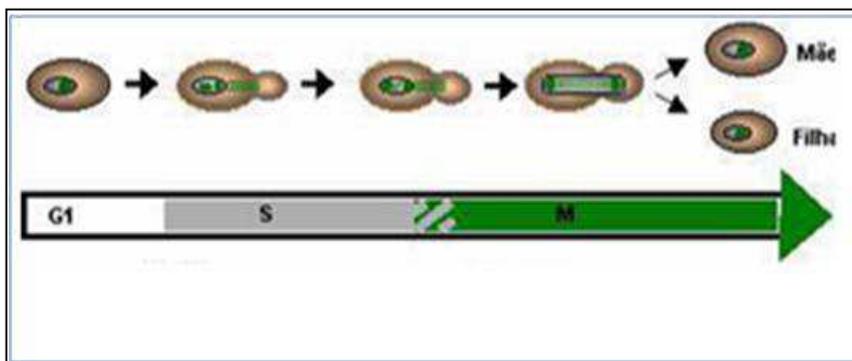
Em geral, as leveduras quando em reprodução apresentam um comportamento semelhante a uma expressão de ordem geométrica (MORETTI, 2006). Numericamente, o crescimento populacional microbiano genérico, pode ser representado pela seguinte progressão:

$$1 : 2 : 2^2 : 2^3 : 2^4 : 2^5 : \dots : 2^n$$

A reprodução celular resulta da duplicação de sua massa que está associada diretamente a um tempo de geração ou de duplicação. A base 2 usada é porque se trata de reprodução binária, isto é, cada célula produz duas a cada instante. Uma fermentação consiste de n tempos de duplicação, podendo ser expresso tanto em números de células quanto em massa celular ou biomassa, conforme pode ser visto na Figura 4, por meio do processo de divisão por mitose, cuja reprodução está ligada às seguintes expressões:

$$N_0 : 2 N_0 : 2^2 N_0 : 2^3 N_0 \dots : 2^n N_0 \quad \text{População microbiana} \quad 2^n N_0 = N \quad (1)$$

$$X_0 : 2 X_0 : 2^2 X_0 : 2^3 X_0 \dots : 2^n X_0 \quad \text{Biomassa:} \quad 2^n X_0 = X \quad (2)$$



**Figura 4** – Reprodução celular por Mitose. Fonte: MORETTI (2006)

Inicialmente, a célula original ( $G_1$ ) absorve os nutrientes necessários para o seu crescimento que, leva a geração da célula-filha (S) e em seguida, quando esta atinge o tamanho ideal desliga-se da célula-mãe, por um processo de divisão celular (M) conhecido por mitose. O tempo necessário para que uma levedura duplique a sua massa celular, em média, leva de 1 a 1,5 hora. Esse período corresponde ao tempo de duplicação ou tempo de geração. Portanto, numa fermentação, a levedura até alcançar a sua concentração máxima, passa por vários tempos de duplicação ou tempos de geração. Portanto, o tempo de fermentação corresponde a  $n$  tempos de geração ou de duplicação, representado como sendo  $t = n \cdot t_d$ .

As equações (1) e (2) representam o crescimento microbiano, em número de células e em biomassa ou massa celular, onde as células, crescem em uma velocidade inteiramente exponencial, podendo ser expressa por:

$$\begin{aligned} \ln N &= n \ln 2 + \ln N_0 & \text{ou} & & N &= N_0 \exp^{\mu t} \\ \ln X &= t/t_d \ln 2 + \ln X_0 & & & X &= X_0 \cdot \exp^{\mu t} \end{aligned}$$

Tanto a velocidade específica quanto o tempo de duplicação tem algo a ver com a produtividade em células, porque esta aumenta à medida que o tempo diminui, segundo CONO & ASAI (1990). Cineticamente, pode-se deduzir que o tempo de duplicação da massa celular está intimamente ligado com velocidade específica de crescimento, quer seja de leveduras selecionadas ou selvagens.

Na prática, a velocidade específica é inversamente proporcional ao tempo de duplicação. Quanto maior a velocidade específica de crescimento, menor será o tempo de geração e conseqüentemente, menor será o tempo de fermentação. Portanto, quanto menor o tempo de duplicação tanto maior será a produtividade.

#### 2.1.4.5 Importância do Oxigênio na Produção de Leveduras

O oxigênio atua fundamentalmente nos processos de fermentação como substrato limitante, isto é, o processo fica limitado em função da necessidade metabólica da célula.

Todos os organismos vivos, indistintamente utilizam oxigênio (na forma molecular ou através de compostos oxigenados) e eliminam o dióxido de carbono através do processo de respiração. Vários autores (FARIA et al. 2002; TAUKE & GAMBALE; 1982) mostram claramente a importância do oxigênio no metabolismo microbiano.

Os efeitos decorrentes das interações microbianas são perfeitamente perceptíveis nos atuais processos de fermentação, onde este elemento é imprescindível e vital, sem o mesmo o crescimento torna-se lento. Basicamente, funciona como uma espécie de acelerador do crescimento microbiano.

É usual classificar esses processos através das várias interações entre o oxigênio e os microrganismos. Nenhum organismo parece ser indiferente ao oxigênio embora alguns deles se comportam como facultativos, em relação à sensibilidade ao oxigênio livre. Nas fermentações, o oxigênio é primeiramente absorvido na fase líquida passando depois para dentro da célula na cadeia respiratória, sendo incorporado a biomassa. A participação de oxigênio na respiração ocorre particularmente com processos em aerobiose.

#### 2.1.4.6 Funções específicas do oxigênio – Processo de respiração aeróbica

- **Receptor de elétrons**

Dentre as funções mais específicas, o oxigênio pode ser melhor compreendido com base no conceito de receptor de elétron. No interior da célula, há uma categoria de substâncias cujo papel é o transporte de hidrogênios. Essas substâncias, na respiração, retiram hidrogênios do “combustível” celular, a glicose, e os cedem ao oxigênio. CHAUD & SGARBIERI (2006), explicam que nessa fase, o hidrogênio é liberado em vários momentos, combinando-se com o oxigênio do meio, que forma água e libera energia.

- **Regulador do metabolismo fermentativo**

O mecanismo de indução por oxigênio está diretamente ligado com bases de DNA (ácido desoxirribonucleico) onde o oxigênio molecular parece ser indispensável à levedura. Ao mesmo tempo, o oxigênio pode ter uma ação mutagênica ou tóxica, conforme POSIGATE (1981). Nas fermentações, o oxigênio pode provocar mudanças metabólicas drásticas sobre alguns

amino-ácidos, principalmente o ácido glutâmico.

Portanto, as células quando expostas a concentrações variáveis de oxigênio comportam-se diferentemente e, este elemento atua como agente tóxico no cultivo aeróbico. A experiência tem mostrado que alguns microrganismos quando expostos de forma prolongada ao oxigênio a pressões superiores a atmosférica ( $2 < atm < 10$ ) exerce efeito mutagênico. Este efeito foi observado no cultivo de *Escherichia coli*. O oxigênio afeta diretamente o metabolismo fermentativo, podendo funcionar como indutor ou, ao contrário, como repressor

Por outro lado, a altas taxas de aeração, o crescimento de células e o consumo de substrato são lentos, embora a demanda de oxigênio seja satisfatória. O sistema microbiano parcialmente inibido contribuindo para formação de quantidade reduzida de produto.

- **Controlador de potencial de oxi-redução (Redox)**

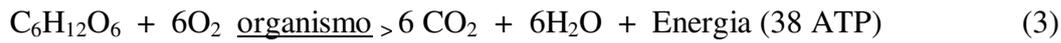
Estudos realizados em processos de fermentação, pressupondo baixa a concentração de oxigênio dissolvido, mostram que o oxigênio atua como oxidante. O potencial de oxi-redução é alterado devido a variação das atividades metabólicas que ocorre com o microrganismo durante a fermentação. Em cultivos anaeróbios e facultativos, o potencial [E] pode ser usado como controlador da variável de aeração na condição de substrato limitante, isto é, o crescimento limitado por oxigênio, quando ocorre excesso desse elemento no processo, ( ESTRELA & PÉCOR, 2003 ).

- **Gerador de energia**

Nos sistemas microbianos, especialmente nas fermentações, o oxigênio atua segundo CRUEGER & CRUEGER, (1997), como gerador de energia basicamente em duas etapas:

a) por meio de reação bio-termoquímica, gerando energia calorífica decorrente dos combustíveis bioquímicos celulares, a exemplo da glicose.

b) sintetizando substâncias ricas em energia, conhecidas respectivamente como **ATP** (Trifosfato de adenosina) e **ADP** (Difosfato de adenosina). Estas substâncias armazenam de energia proveniente da célula. A reação de biossíntese do processo de respiração, amplamente conhecida, é dada por:



Processo de respiração aeróbia

Isso mostra que há liberação de grande quantidade de energia quando o oxigênio reage a glicose. Além do substrato que é consumido, a umidade e temperatura são fatores que afetam o processo aeróbico. O mecanismo de degradação consiste de descarboxilação, ou saída de  $\text{CO}_2$ , remoção de átomos hidrogênios da glicose e por fim oxidação da cadeia respiratória. A degradação da glicose ocorre tanto no processo de respiração como no de fermentação

- **Controlador da membrana permeável da célula**

O transporte ativo é uma expressão genérica usada para indicar a maneira de transferir substâncias e/ou nutrientes via osmose ou por difusão. Em células vivas, principalmente leveduras, os nutrientes, passam através da membrana celular, que utiliza o transporte ativo, que fica melhor compreendido dentro do conceito da termodinâmica (energia livre). Em geral, a membrana celular é altamente seletiva e por conseguinte, controla o processo de permeabilidade.

#### 2.1.4.7 Suprimento e demanda de oxigênio – Processos aerados e agitados

O oxigênio é um dos fatores que afetam diretamente os sistemas biológicos que envolvem crescimento microbiano. Este elemento atua como nutriente. As leveduras e fungos em geral, incorporam oxigênio molecular através de ácidos graxos e esteróis na formação de sua biomassa.

Nos sistemas de produção em aerobiose, o ar é distribuído no meio com o auxílio de um compressor. O oxigênio no estado dissolvido passa a interagir diretamente com os microrganismos através da troca de oxigênio que ocorre na área de interface. O fluxo de massa por unidade de tempo exige conhecimento sobre o conceito de transferência de massa. Nesse caso, torna-se difícil obter um valor preciso da área de interface assim como as correlações que envolvem troca de massa. Esse fato faz com seja introduzido o conceito de área interfacial por unidade de volume de líquido, representada por **a** que é conhecida como área específica, (A/V). O fornecimento de ar resulta em um suprimento de oxigênio, cuja

velocidade pode ser expressa pela seguinte equação:

$$dC/d\theta = k_L a (C^* - C_L) \text{ -----} \rightarrow \text{Suprimento} \quad (4)$$

onde o  $k_L$  representa o coeficiente de transferência de oxigênio na fase líquida, o qual está associado à área específica e, este produto ( $k_L a$ ), em bioengenharia, é considerado como se fosse uma única variável. O segundo membro representa as concentrações, onde  $C^*$  é a concentração de oxigênio na fase líquida, que estaria em equilíbrio com a quantidade de gás existente na fase gasosa e  $C_L$  é a concentração média de oxigênio dissolvido na fase líquida.

A velocidade de respiração, em relação à disponibilidade de oxigênio no meio, é proporcional à concentração de células presentes nesse instante. Dentro dessas considerações, pode-se estabelecer um balanço material para o oxigênio. O oxigênio é fornecido através das bolhas onde boa parte é consumida devido à respiração das células. Em regime permanente, quando o fornecimento de ar é constante, a quantidade de oxigênio dissolvida no líquido, deve ter um suprimento igual à demanda. Nesse caso, o suprimento de oxigênio torna-se igual à demanda, pois neste caso, está em perfeita sintonia com a necessidade das células. Isto ocorre quando a taxa de aeração ( $= Q_{ar}/V$ ) é constante.

$$K_L a (C^* - C_L) = k_r \cdot X_m \text{ -----} \rightarrow \text{Suprimento} = \text{demanda} \quad (5)$$

Caso contrário, se a velocidade de consumo de oxigênio pelas células for diferente da velocidade com que o oxigênio é dissolvido, o regime deixa de ser estacionário, obedecendo o balanço material que se segue:

$$dC/d\theta = K_L a (C^* - C_L) - k_r \cdot X_m \quad (6)$$

Esta equação representa o balanço para o oxigênio, principalmente quando se utiliza aeração mecânica, onde  $dC/d\theta$  é a velocidade do ar fornecido ao sistema; o produto  $K_L a (C^* - C_L)$ , o suprimento e o produto  $- k_r \cdot X_m$  representa a demanda de oxigênio, onde  $k_r$  é uma constante de proporcionalidade conhecida como velocidade específica de respiração ou coeficiente de respiração celular e  $X_m$ , a concentração de células para o mecanismo de metabolização. A demanda compreende a necessidade de oxigênio dissolvido que as leveduras precisam para exercer o seu metabolismo. O balanço para o oxigênio pode ser

determinado mais facilmente por meio da taxa de aeração ( $= Q_{ar}/V$ ) expressa em volume de ar por volume de meio por minuto, cuja unidade é conhecida como v.v.m. Essa taxa de aeração, diminui proporcionalmente com o aumento do volume a ser processado.

O comportamento dos microrganismos nos processos de respiração tem sido observado diante da mudança física causada no sistema pela disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio. Vários modelos para o crescimento de microrganismos aeróbicos, na condição de fator limitante, têm sido reportados, durante as duas últimas décadas, FARIA et al. 2002; COOK;1994).

INETI/IBOTA (1997) trabalhando especificamente com *Saccharomyces cerevisiae* e mostrou que, durante o período mais ativo da fermentação a concentração de oxigênio alcança, em média, 5 mg/litro. Diferentes modelos relativos à produção de leveduras são exemplificados, mostrando que a faixa de concentração de oxigênio em função do fornecimento de ar está situada entre 5 e 7 mg/litro (OTTO, 1985).

NOGUEIRA et al. (2005) mostram a importância do oxigênio, nos processos aerados de produção de leveduras, destacando inclusive, uma das suas funções mais importantes que é como substrato limitante nos processos. Nesse trabalho, são citados vários exemplos de crescimento com leveduras da espécie *Candida utilis*, com bons rendimentos. Sob condições limitantes de concentração, o oxigênio participa do processo interagindo com a massa de células, onde a concentração de oxigênio dissolvido é fundamental para o crescimento da biomassa. Este elemento atua tanto na forma gasosa quanto na forma de oxigênio dissolvido, sendo este último, de fundamental importância para reprodução celular.

Embora, constitua apenas uma pequena parte da massa celular, o oxigênio torna-se um elemento altamente importante e imprescindível para o crescimento. Quando se trata de crescimento de leveduras, quer seja do gênero *Saccharomyces* ou não-*Saccharomyces*, podem-se destacar algumas das principais funções do oxigênio:

BRAZ et al. (1999) mostram o emprego de caldos naturais provenientes de frutos tropicais, e propõem modelos para determinação de parâmetros cinéticos relacionados com a participação do oxigênio como substrato limitante. Estes autores mostram ainda a influência da agitação, oxigenação, pH, tempo e nutrientes sobre produção de biomassa de *Candida guilliermondii*.

RIBEIRO & HORII (1999) desenvolveram trabalho correlato inclusive, com os mesmos objetivos onde se fez destaque, prioritariamente as potencialidades das leveduras selvagens de caldo-de-cana. Estudos direcionados para a produção de leveduras, mostram a importância das variáveis operacionais da engenharia bioquímica, usadas nesse tipo de processo. O suprimento e demanda de oxigênio assim como os processos com agitação e aeração são alguns dos temas mais explorados, (WANG et al. (1997). Na indústria de fermentação, é comum o uso dessas operações, principalmente na produção de fermento. A aeração influi tanto no crescimento celular quanto no consumo de substrato. Sem esta operação o crescimento é lento. Na produção de fermento, sabe-se da importância que tem essas operações, sem as quais não se tem o rendimento desejado porque o crescimento é lento.

#### 2.1.4.8 Processos de Fermentação

O processo fermentativo é considerado um dos mais antigos métodos de preservação de alimentos. Este processo pode ser realizado por tecidos vegetais superiores, por alguns fungos (Leveduras) e por algumas espécies de bactérias. Um agente microbiano muito utilizado pelo homem há vários anos é o *Saccharomyces cerevisiae* conhecido popularmente como lêvedo de cerveja, espécie predominante na fermentação alcoólica e que, em condições anaeróbicas, permite a fabricação de bebidas fermentadas e destiladas como vinhos, cervejas e aguardentes.

DÖBEREINER & BALDANI (2003) cita importante trabalho sobre a possibilidade de aproveitamento dos recursos biomássicos naturais na produção de combustíveis biológicos ou bioenergéticos a partir dos conhecimentos já consolidados como a fermentação alcoólica.

No Brasil, a fermentação do caldo de cana de açúcar e sua posterior destilação produzem dióxido de carbono e álcool etílico, por meio das destilarias anexas ou autônomas, para fins industriais, farmacêuticos e como álcool combustível.

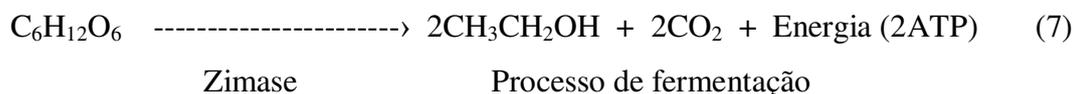
Dentro dessa linha, OLIVEIRA (2003) desenvolveu processo de produção de produção de álcool usando bactérias ao invés de leveduras. Foi o primeiro processo de produção não convencional usado no Brasil. Nesse processo, foi utilizado uma bactéria, a *Zimomonas*

*mobilis* cultivada em caldo de cana, por meio da qual, se atingiu uma produtividade três vezes maior do que o processo de fermentação alcoólica tradicional que usa leveduras. Essa produtividade se deve ao tempo de duplicação celular dessa bactéria que é extremamente curto. Esta é, no momento, uma das principais bactérias produtoras de álcool que se tem informação nos meios científicos.

O catabolismo ocorre exatamente no processo fermentativo onde a glicose é transformada por meio das leveduras. Os processos biossintetizantes, ao contrário, acontecem por meio de anabolismo. Porém, tanto o processo de respiração como o de fermentação apresentam saldo energético positivo. No processo de fermentação, o álcool produzido contém pequena parte da energia proveniente da célula. A fermentação libera menos energia do que o processo de respiração porque na fermentação, a degradação da glicose é menos completa.

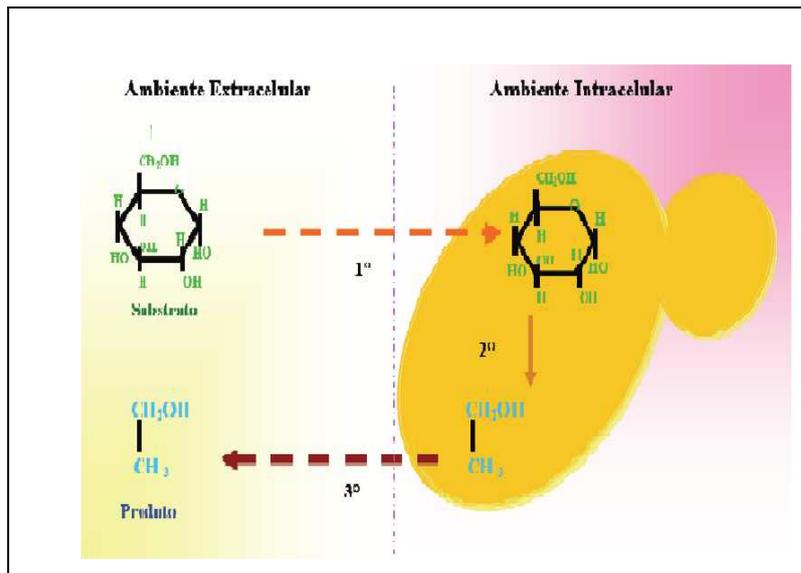
Contrariamente à respiração, a fermentação independe do oxigênio, embora nos dois processos, o combustível utilizado é a glicose.

A equação global de desdobramento da glicose em álcool e CO<sub>2</sub>, em um processo de fermentação ocorre naturalmente com geração espontânea de energia, conforme se segue:



De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay-Lussac cuja relação estequiométrica mostra que **1** mol de glicose (180g) produz simultaneamente **2** moles etanol (92g) e **2** moles de dióxido de carbono (88g) com saldo positivo de energia proveniente das células.

Na fermentação, parte da energia química da glicose continua armazenada no álcool, o que lhe confere o poder combustível, (HISS & BORZANI, 1993). A Figura 5 permite mostrar o mecanismo de bio-conversão de substrato nos seus produtos mais comuns, etanol e anidrido carbônico.



**Figura 5** – Mecanismo de conversão de substrato em produto durante o processo fermentativo Fonte: PANTOJA (2006)

No que diz respeito ao rendimento teórico ( $Y_p/s$ ) sabe-se que a partir do fator estequiométrico (0,511), obtem-se valor na ordem de 90 %, onde se estima que parte do açúcar metabolizado pela levedura seja desviado para gerar outros produtos.

Na fermentação alcoólica, são formados paralelamente produtos como glicerol, aldeídos, especialmente furfural, álcoois superiores que são produzidos além do necessário para a manutenção celular (PANTOJA, 2006)).

Além desses produtos, pode ser encontrado nos vinhos, o ácido carbâmico, produto ainda em estudos, por se tratar de um ácido que provém de mostos alcoólicos em geral, tratados ou enriquecidos com uréia.

#### 2.1.4.8.1 Produção de leveduras selecionadas: aplicações

O fermento, representa massa de leveduras, que são seres vivos usados na transformação do açúcar em álcool, durante a fermentação alcoólica. O uso mais freqüente e importante do fermento para o homem se relaciona com a fabricação do pão. Trata-se de um produto fermentado conhecido desde épocas muito remotas.

Na massa, a farinha é misturada ao fermento (“Fleischmann” - uma variedade de

Saccharomyces) que fermenta por algumas horas e em seguida, é deixada por algum tempo em ambiente aquecido (THORN & REED;1991). O amido acaba sendo transformado em álcool e CO<sub>2</sub>, ocorrendo no processo, “recarregamento” dos ATPs das células do fermento. O gás carbônico (CO<sub>2</sub>) faz “crescer” a massa do pão, formando dentro dele um sem número de alvéolos (câmaras) que se mantêm após o cozimento.

De todos os ingredientes usados em panificação, a levedura é o mais sensível, pela influência que exerce sobre as condições ambientais do processo. As leveduras são muito valorizadas como fontes produtoras de enzimas e de outros produtos de interesse econômico relacionados com a biotecnologia moderna.

#### 2.1.4.8.2 Leveduras como fonte de produtos químico-biológicos

Além dos produtos obtidos a partir de sistemas de bioproduções comerciais, como fermento de panificação, combustível e alimentos e bebidas, as leveduras são verdadeiras fontes de produtos químico-biológicos. Inúmeros trabalhos têm mostrado a importância das leveduras na obtenção de produtos de interesse econômico e científico, (NOGUEIRA et al 2005).

Uma característica peculiar dos organismos é que eles se mantêm vivos e se reproduzem de uma geração para outra sem interrupção, por mecanismos puramente químicos. Muitas reações ocorrem no interior da célula, onde alguns exemplos desse fenômeno são encontrados nos microorganismos unicelulares, (GUTIERREZ, 1993).

As reações são catalizadas por enzimas que operam numa faixa de temperatura de 0° a 50°C sendo portanto, de 20° a 35°C a faixa ideal. Frequentemente as enzimas são reversíveis de acordo com a lei de ação das massas atribuídas ao sistema reativo.

Dentre os produtos bioquímicos provenientes de levedura podem-se destacar: enzimas e dezenas de outras substâncias associadas à biotecnologia avançada que tem sido atualmente de grande interesse econômico.

#### 2.1.4.8.3 Principais enzimas extraídas de leveduras

Embora estejam catalogadas pouco mais de 2000 enzimas na Comissão Internacional de enzimologia, atualmente, além das enzimas de origem vegetal, sabe-se que cerca de 70% a 80% das enzimas comerciais são obtidas ou extraídas de fontes microbianas, e uma das principais fontes está nas leveduras (HUGH, 1983). Desse total, apenas 30 delas têm aplicação de caráter industrial ou em nível de pesquisa. As leveduras são verdadeiras fontes naturais desses produtos. As principais enzimas obtidas por leveduras são: **invertase**, **maltase** e mais destacadamente **zimase**.

A invertase converte sacarose em dextrose e a levulose e a maltase, converte maltose em dextrose. Dextrose e levulose são açúcares simples, os quais são diretamente fermentáveis por leveduras. A Zimase por outro lado, por se constituir num complexo de enzimas, age sobre açúcares simples, convertendo-se em dióxido de carbono, álcool e outras substâncias com sabores peculiares.

## 1. **Invertase**

Uma das reações mais comuns controlada por enzimas é a hidrólise. Um exemplo típico de hidrólise enzimática é o da INVERTASE, classicamente conhecida como Sacarase ou ( D – Frutofuranosidase que hidroliza a sacarose em frutose e glicose, invertendo a solução de dextro para levo. Essa é uma enzima mais específica da frutose. A invertase foi a primeira enzima a ser estudada, que pode hidrolizar também a rafinose, frutose e melibiose. A inversão da sacarose foi observada pela primeira vez em 1928, onde se pôde constatar cientificamente o efeito da invertase, (PELLON. 1995).

Essa enzima é encontrada em várias cepas de leveduras, inclusive leveduras de panificação do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, a qual acha-se associada na parede celular através de manana – polissacarídeo da frutose. A invertase aumenta a sua atividade junto ao crescimento da levedura na presença de manana (CHAUD & SGARBIERI; 2006). Processos relacionados com a fermentação alcoólica têm mostrado a atividade dessa enzima.

## 2. **Amilase**

Leveduras do gênero *Endomycopsis* notadamente da espécie *fibuliger* exercem um efeito amilolítico extracelular sobre os carboidratos nos quais elas são suspensas. CRAIG (1998) mostra que esse efeito é notado usando um sistema simbiótico no qual o *E. fibuliger* converte o amido em açúcares simples enquanto ocorre o crescimento de *Candida utilis*. A cultura mista assim produzida é seca e usada como ração animal. A amilase da levedura pode ser usado de forma associada com células vivas. Este, é um processo utilizado na Suécia, como trabalho pioneiro envolvendo cultivo misto.

### 3. Lactase

Outra enzima extraída de levedura é a lactase ou ( $\beta$ - galactosidase que se forma quando *Saccharomyces fragilis* cresce com aeração limitada, por um suprimento de nitrogênio assimilável. Preparações de Lactase parcialmente purificadas são empregadas na hidrólise de lactose, produtos lácteos, sorvetes, leites fermentado e concentrados e rações animais (QUAGLIA, 1991).

### 4. Outras enzimas de interesse para a indústria de bio-processos.

Muitas outras enzimas têm estado presente nas leveduras. Trabalhos nessa linha, são citados por ALLEN (1993), porém algumas tem tido interesse puramente acadêmico, em conexão com pesquisas desenvolvidas sobre mecanismo metabólico intracelular. Enzimas comercialmente importantes acham-se disponíveis em pequenas quantidades para fins de pesquisa e de uso na medicina.

As enzimas têm grande aplicação na moderna Engenharia enzimática quando se deseja planejar um produto com qualidade total associado às exigências de mercado. Incluem-se entre outras, algumas enzimas conhecidas no meio científico e catalogadas no momento, como a fosfatase, a hidrogenase a alcool-desidrogenase, a glicose 6 – fosfato-desidrogenase, a glutationato redutase e a hexoquinase. Essas enzimas têm funções específicas nos mais variados processos industriais.

#### 2.1.4.8.4 Produtos da biotecnologia avançada de leveduras

## 1 Transportadores de fosfato e hidrogênio

A transferência de hidrogênios ocorre na célula a partir de determinadas substâncias como a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo nas formas oxidada ou reduzida (NAD e NADH<sub>2</sub>) e Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD e FADH<sub>2</sub>).

Estas substâncias são excretadas da *Saccharomyces cerevisiae* pelas mesmas técnicas usadas por outros nucleotídeos conhecidos. As coenzimas de transferências de fosfato incluem o fosfato de uridina, citidina e guanosina, particularmente o di e tri-fosfato de Adenosina (ADP e ATP). Estas substâncias são amplamente conhecidas como armazenadoras de energia dentro da célula, cujo metabolismo faz com que sejam transferidas para os produtos a exemplo do etanol, (ROBINSON, 1997).

## 2. Carreadores de radicais orgânicos

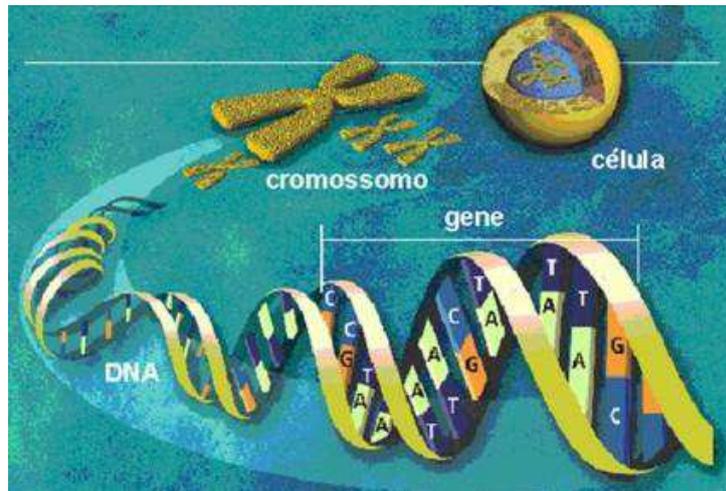
A *Saccharomyces cerevisiae* é também a principal fonte co-enzima-A, que é altamente importante como transportadora de radicais do tipo acetil, succinil e malonil usado nas reações metabólicas que ocorre dentro da célula viva, segundo BRAZ et al. (1999). A acetil-Co-A é uma coenzima de uso muito importante na produção de ácido acético.

## 3. Ácidos Nucléicos e derivados

As leveduras contém ácidos ribonucléicos (RNA) e desoxirribonucleicos (DNA) que são compostos derivados de pentoses e bases nitrogenadas, conforme os seguintes componentes: D - ribofuranose purinas, adenina e guanina, e as pirimidinas, citosina e uracil, (WINTER & WINTER; 1989). Os ácidos nucleicos são os principais constituintes da célula. Neles, estão contidas as informações genéticas que identificam e caracterizam a célula, as quais são transferidas para as células filhas no processo de reprodução.

Atualmente, os ácidos nucleicos têm uma importância biotecnológica muito grande, pois os mesmos são largamente utilizados em processos avançados que envolvem a engenharia metabólica, e em especial, a engenharia genética.

A Figura 6 apresenta a estrutura do DNA da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 6** - DNA da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Fonte: LOPES (2005)

Trabalhos recentes, com isolados de leveduras do gênero *Saccharomyces*, tem sido exaustivamente pesquisados por RAMALHO NETO (2005) com o DNA cromossômico de uma levedura padrão com a finalidade de classificar geneticamente espécies com alto potencial de produção de álcool, em usinas e destilarias do Estado de Alagoas.

Os ácidos nucléicos encontrados nas leveduras de panificação e de cerveja têm em média, 8% de peso seco. MOSHY, (1987) mostra que eles são obtidos por adição de álcalis seguido de neutralização imediata e o precipitado é filtrado por via ácida. Os sólidos são submetidos a lavagem e novamente dissolvidos e re-precipitados e podem estar presentes como ácidos livres ou convertidos em sais de cobre, ferro ou magnésio.

#### **4. Proteínas**

De acordo com QUAGLIA (1991) quase metade de peso seco de Levedura consiste de proteína, que é incorporada em muitas enzimas vitais para o processo. Do ponto de vista nutricional, a proteína é provavelmente o mais importantes componente da célula. São obtidas através de técnicas especiais que tornam o produto floculado por secagem em atomizador de ar.

## 5. Aminoácidos

As proteínas são complexos que contém aproximadamente 20 amino-ácidos diferentes, os quais são obtidos por hidrólise de Levedura. Uma fonte comum de amino-ácidos está no creme de lêvedo proveniente da cerveja, segundo HUGH, (1983).

Os amino-ácidos são sintetizados intracelularmente, formando o chamado pool de amino-ácidos. Essas considerações foram estudadas por LOPES et al. (2005). A priori, os amino-ácidos constituem as unidades que formam as proteínas.

## 6. Lipídeos

Esta classe de componentes normalmente envolve apenas 3% do peso seco de levedura, porém algumas espécies como *Rhodotorula gracilis* e *Torulopsis lipofera*, crescidas sob condições especiais e alimentadas com nitrogênio e fosfato podem conter pouco mais de 70% de glicídios.

Leveduras Não-*Saccharomyces* como *Endomycopsis vernalis*, *Ouspora lactis* e outras leveduras de interesse industrial tem sido usadas com sucesso em processos de fermentação, segundo GUTIERREZ (1993).

## 7. Vitaminas

As leveduras de padaria e de cerveja também são constituídas de verdadeiras fontes de vitaminas. Estas, representam fatores de crescimento cujas faixas de concentração são expressas em peso seco[ $\mu\text{g/g}$ ], que pela ordem de importância, destacam-se: tiamina (5-100); riboflavina (25-80); niacina (150-180); ácido pantotênico (50-250); piridoxina (20-100); inositol (2500-4500); **ácido fólico** (10-50); ácido p-aminobenzoico (10-150) e colina (4000-6000). As três primeiras, são altamente necessárias na nutrição humana, porém as demais, estão mais intimamente ligada ao metabolismo microbiano.

As faixas de concentração mencionadas foram estudadas por BARBOSA (2006). Pela ordem de importância dos componentes bioquímicos o fermento biológico, tem sido incluído atualmente no programa de medicamentos alternativos, conforme pesquisa desenvolvida por pesquisadores do Centro Regional de Especialidades da Universidade Federal do Paraná –

Curitiba.

Foram desenvolvidas experiências inéditas com fermento biológico no tratamento dos efeitos colaterais da AIDS, conforme citação feita por NASSER (1993).

O “Leucovorin” é um medicamento indicado no combate à anemia, e que no momento, está sendo substituído por um produto natural, o fermento biológico resultante do processo de produção biotecnológica de cana de açúcar.

O fermento de panificação é constituído de componentes nutricionais, além de outros produtos de grande importância como a vitamina B<sub>12</sub>- o ácido fólico, substância que representa o princípio ativo daquele medicamento. Ainda não há comprovação científica de sua eficácia, porém testes em nível experimental com fermento, têm surtido efeito que promete alguma esperança na área de saúde humana e animal (PALLONE et al. 2006).

## 8. Carboidratos

Parte da reserva e estrutura das leveduras é constituída de carboidratos, principalmente glucana, manana, glicogênio e trealose que ocorrem em todas as células.

As fosfomananas, por exemplo, são produzidas por algumas espécies de leveduras do gênero *Hansenul.*, (OTTO, 1985), mostra a produção de polissacarídeos, como por exemplo, o Zimosano que tem uso clínico, que são formados por algumas linhagens de leveduras. Esta é, uma das áreas de maior importância da biotecnologia de leveduras, onde se destaca a influência da membrana celular, na qual se acham presentes os biopolímeros da glicose e da frutose.

### 2.4 Desempenho de Leveduras Selvagens com Potencial de Produção de Álcool

As leveduras, especialmente as selecionadas representam verdadeiras fontes de produção de álcool e de outros produtos de interesse para a economia.

As potencialidades de produção, estão intimamente ligadas com o meio de fermentação. Além das leveduras disponíveis em micoteca e coleções de culturas, bem como as comerciais, existem também aquelas que são produzidas nas próprias unidades de produção. Além das leveduras selvagens, são usadas as selecionadas e puras, pois ambas, têm propriedades

alcoologênicas. RIBEIRO & HORII (1999) trabalhando com fermentação natural, destacam as potencialidades das leveduras selvagens, assim como o desempenho destas em meio à base de caldo de cana. Esses estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de efetuar testes comparativos em relação ao fermento prensado comercial. Além do fermento, o mais conhecido produto de excreção por células de levedura é o etanol, largamente usado na fabricação de bebidas, alimentos, produtos farmacêuticos, em perfumes, solventes, etc. Segundo os mesmos autores, os testes são feitos em função da formação desse produto.

Dentro deste contexto, o caldo de cana-de-açúcar é uma excelente fonte de leveduras naturais, nativas ou selvagens conforme citação de PUGLIA, (2006). Geralmente, quando os açúcares são fermentados por leveduras, quer sejam naturais ou selecionadas, o CO<sub>2</sub> é excretado aproximadamente na mesma proporção que o etanol. Como há uma quantidade considerável de dióxido de carbono produzido nas grandes destilarias, devido à sua importância na indústria química, tem se adotado métodos que resultam no seu total aproveitamento. Partindo de processos unitários, o gás passa por sistemas de purificação para remover os gases indesejáveis uma vez que estes estão sempre presentes em baixas concentrações. A seguir, são comprimidos por pressurização e enfim, coletados para venda comercial na forma de gelo seco, muito usado na extinção de incêndio.

Todavia, sabe-se que o álcool de petróleo, considerado de uso não potável, também é produzido em grande proporção, porém o obtido por via biológica ou mais precisamente por processo de fermentação, por motivos óbvios, são recomendáveis para uso em alimentos e bebidas, segundo OWEN (1996)

Em contrapartida, com a expansão do Programa Nacional de Álcool, a cana-de-açúcar é uma cultura bioenergética importante que passa a assumir uma parte considerável da economia do país diante da atual política de combustíveis líquidos. Isto se deve à sua alta eficiência na produção e acúmulo de sacarose.

Para a produção de álcool OLIVEIRA, (2003) mostra a importância do uso de novas linhagens, selecionadas e isoladas a partir de meios naturais, nos processos de fermentação alcoólica.

## 2.5 Tipos de leveduras

Segundo OSZLANYL (1980), a levedura é o único microorganismo usado comercialmente em larga escala, como fonte de álcool ou como produto de forragem. As leveduras puras acham-se disponíveis, em geral, em coleções de cultura com grau pureza confiável. O fermento, no sentido científico, é constituído de um microorganismo vivo que se reproduz na presença de açúcares fermentáveis.

Além das culturas puras para uso específico em pesquisas, acham-se disponíveis, no mercado em diversos estados físicos, tais como: levedura granular, levedura comprimida ou prensada (tablete) e levedura seca ativa (THORN & REED; 1991) sendo esta última processada por secagem direta.

**2.6.1 Levedura úmida** ou fermento úmido - Ao término da fermentação, as células sedimentadas são separadas por filtração ou centrifugação, formando o creme de leveduras ou creme de lêvedo. O creme assim obtido, com um teor de água entre 68 a 70% é prensado e extrusado sendo comercializado em tabletes.

**2.6.2 Levedura seca ativa** ou fermento seco - Em escala comercial, a produção de LSA como é conhecido, é feita a partir de caldo ou melaço de cana de açúcar, em separado, ou os dois juntos, onde a levedura encontra um ambiente propício para se propagar dentro de condições ótimas de crescimento. É uma outra linha de fermento comercial que consiste basicamente de uma operação de secagem na massa celular, de tal forma que o produto final mantenha ao mesmo tempo, viabilidade compatível com o seu uso e atividade microbiana para determinados processos.

A estabilidade da levedura seca (fermento seco) é adversamente afetada pela umidade atmosférica e pela alta temperatura, o que recomenda ser preservado em ambiente seco e de preferência, esterilizado (MORITZ, 1980).

A possibilidade de deterioração e/ou decomposição microbiana cessa em ambientes com umidade relativa menor que 60%. Ao passo que as bactérias são em geral, mais exigentes quanto à disponibilidade de água livre quando comparadas com as leveduras e bolores. A secagem tem como principal finalidade remover a água intracelular através da membrana e parede celulares. Nesta operação, torna-se necessário o devido cuidado para evitar danos na membrana celular ou no equipamento enzimático intracelular, pois estes efeitos podem

reduzir a produção de gás, quando estes organismos são postos em operação, (HUMPHREY, 1991).

O tempo de secagem varia entre 3 e 6 horas, tempo suficiente para alcançar o teor de água ideal para tornar o produto pronto para ser comercializado. A levedura seca é obtida a partir do fermento prensado com um teor de umidade aproximado de 70%, e chega ao final do processo dentro de uma faixa de 3 a 8% de teor de umidade.

COLUCCI (2004) em seu trabalho sobre a produção de leveduras instantâneas, mostra que o principal objetivo desse processo é manter as células com atividade fermentativa e viabilidade celular dentro das exigências e especificações para uso em processo. Este autor relata os princípios de como proceder desde a pesquisa até a implantação dos processos biotecnológicos.

### 2.6.3 Levedura Seca por liofilização - fermento liofilizado

A grande vantagem desse processo ao desidratar um material biológico é manter as características fisiológicas originais, permanecendo todas as reservas nutritivas e bioquímicas no produto final. O fermento biológico se presta muito bem a esse tipo de processo. A importância da liofilização na produção de leveduras está ligada a manutenção da viabilidade celular assim como a estabilidade do fermento. Na verdade, esses processos surgiram das dificuldades encontradas pelo médico e cientista inglês Alexander Flemming em 1929 ao separar a penicilina do meio de cultivo utilizado, cuja substância era produzida por fungos. Isto fez com que outros cientistas da Universidade de Oxford, Inglaterra, após laboriosas e exaustivas pesquisas, encontrassem uma solução para o problema, quanto ao modo de extrair, concentrar e purificar aquele produto. Esse método complexo recebeu o nome de Liofilização, que consiste basicamente, em desidratar determinadas substâncias por meio de evaporação em vácuo a baixas pressões e temperaturas. As condições impostas ao sistema faz com que a água que abandona o produto o faz por sublimação sem danificar as delicadas ligações químicas e, ainda assim, não afetam a estrutura original que constitui o produto, a não ser apenas a remoção de água, (SCHUCH, 2005).

A liofilização objetiva estabilizar não só fermento como alimentos por meio das diversas operações que o material é submetido durante os processos de congelamento, sublimação,

secagem a vácuo, sob condições controladas. Esse processo acontece quando a água pura atinge o limite superior de temperatura que é de 0° C a uma pressão máxima de 4,58 mmHg. Estas condições de temperatura e pressão correspondem ao ponto triplo da água onde ocorre equilíbrio das fases sólida, líquido e vapor. Portanto, em qualquer condição abaixo desta máxima indicada, o fenômeno ocorre.

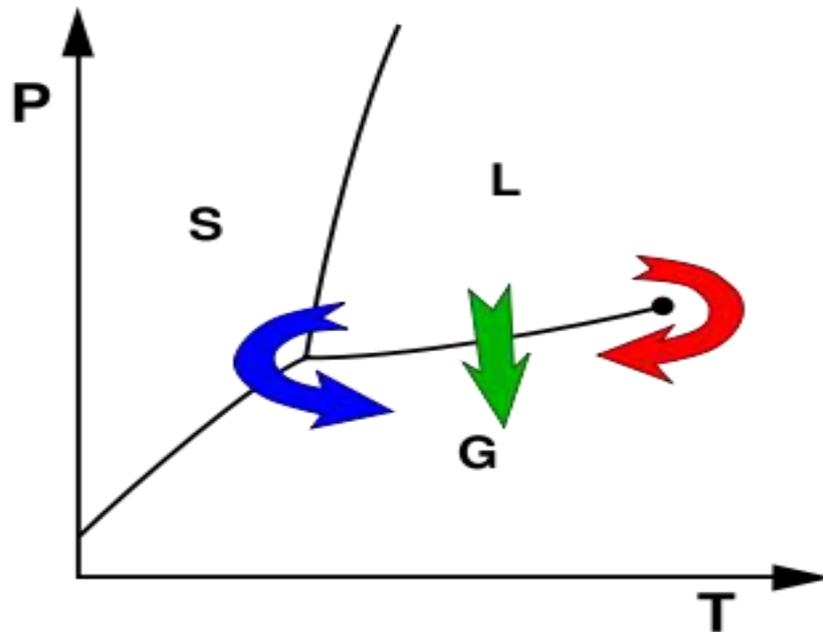
A rigidez estrutural do produto é um fator importante que depende do congelamento efetuado antes da sublimação da água. Em geral, a estrutura resultante do produto é vista como uma matriz porosa, constituída dos sólidos do produto.

Em muitos casos, dependendo da temperatura do processo, são arrastados junto com a umidade, vapores diversos. Esse tipo de secagem é uma das operações industriais mais usadas, tanto para o acabamento final ou equilíbrio da umidade própria dos diversos materiais processados com ar ambiente, como para a sua melhor conservação, como é o caso dos cereais, dos alimentos e das culturas microbianas, segundo BAGUENA & MARTINEZ-ANAYA (1983).

Atualmente, o processo pode ser aplicado a outras situações como, por exemplo, a produção de sorvete de gelo seco usado na comida dos astronautas. É também comum e conveniente para aqueles que exercem atividades nas regiões montanhosas no Nepal e na Índia, porque o peso reduzido permite que carreguem mais alimento e possa reconstituí-lo com a água disponível no local. Portanto, é um processo de desidratação usado basicamente para preservar produto perecível ou torná-lo mais conveniente para o transporte (PODLECH, 1996).

O fermento úmido depois de centrifugado, com teor de água de 70% é submetido a uma liofilização que tem demonstrado ser um método mais eficiente, (PARK et al. 2007). O produto a ser liofilizado, é antes congelado pela exposição de uma corrente de ar frio. A seguir, a água do produto é removida depois de sofrer sublimação em um câmara de vácuo, sendo retirada da mesma através de uma bomba. A liofilização causa menos danos ao produto do que aqueles que usam secagem direta, onde o produto final apresenta maior estabilidade e alta qualidade quando comparados com a secagem convencional. Comparado a outros processos de desidratação, a liofilização é uma das operações de maior controle de umidade porque grande parte da água é removida por sublimação. A figura 7 contém o diagrama típico

de um processo de liofilização



**Figura 7** - Diagrama típico de uma liofilização. Fonte: PARK (2007).

Em um diagrama de fase típico, o limite entre o gás e o líquido funciona do ponto triplo ao ponto crítico. A liofilização (seta azul) traz o sistema em torno do ponto triplo, evitando a transição direta do líquido para o gás vista na secagem ordinária (seta verde). Portanto, esta operação, na prática, tem duplo objetivo: manter as características das células de leveduras (Fermento) fisiologicamente inalteradas e a preservar a viabilidade celular por longo período. O fermento liofilizado apresenta uma grande vantagem em relação ao fermento úmido. A liofilização é uma das técnicas de conservação de microrganismos mais eficientes e seguras, porque as células podem, a qualquer momento, ser re-hidratadas e reativadas em um novo meio de cultivo sem o menor risco de contaminação. Em relação à conservação de leveduras por liofilização, DELAZARI et al. (1992) demonstrou a eficiência desse método em função do tempo de estocagem, comparado com outras técnicas de preservação.

## 2.6 Viabilidade celular em cultivo de leveduras

No término da fermentação, a biomassa ou fermento é separado por centrifugação ou filtração, consideradas operações importantes e indispensáveis no processo de separação, conforme GAMBRINI (1997). O fermento úmido obtido depois dessas operações, em geral, é

submetido a técnicas de padronização com o objetivo de manter a pureza e estabilidade celular de modo que o produto final atenda as especificações exigidas.

Atualmente, o estudo das técnicas de contagem celular é de suma importância para o acompanhamento do processo. Procedimentos desenvolvidos por NOBRE et al. (2007) mostram como manusear e quantificar células em placas de Petri a partir de semeadura da cultura pura. A metodologia de contagem direta ao microscópio tem sido usada para avaliar a viabilidade celular.

FREGUGLIA & HORII, (1998) realizaram estudos de avaliação da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo misto com *Lactobacillus fermentum* que se constitui no princípio básico de contagem direta ao microscópio.

Por outro lado, REINA (2003) apresenta técnicas mais direta de contagem de células através de câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer é o mais simples instrumento usado para contagem de células. Trata-se de uma câmara espessa provida de uma parte central que ao ser ligada, a objetiva apresenta um campo com cerca de 25 quadradinhos, cada um dos quais, possuindo 16 pequeninos quadrados. Portanto, o campo de contagem comporta uma área restrita de 400 quadradinhos, nos quais as células ficam expostas para quantificação.

A metodologia de contagem é usada para determinar a viabilidade celular, e geralmente, tem sido feita com o uso de corantes adequados. O azul de metileno é utilizado como corante preferencial, pela sua especificidade em relação a membrana celular que é altamente seletiva. Esta membrana, no entanto, permite ou não a passagem deste corante. Todavia, outros corantes também tem sido utilizado como Trypan azul e o azul violeta. Os corantes usados nos testes de Gram são mais específicos para bactérias. Nesta pesquisa, estes testes não foram levados em consideração pelo fato das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas serem recomendadas para processos microbiológicos mais específicos. Trabalhos pertinentes, mostram estudo comparativo da eficácia de corantes usuais na viabilidade celular. STEPHEN (2005). A viabilidade celular representa, o percentual de células vivas em relação ao total da população presente na suspensão.

### 2.6.1 Emprego de Técnicas de Preservação de leveduras

Muitas universidades e laboratórios de pesquisa mantêm coleções específicas de grupos microbianos. A manutenção e preservação de culturas puras de leveduras pode ser feita de várias formas, dentre as quais: a) Manter em agar inclinado e em geladeira com repiques periódicos, o que exige renovação das células em meios novos a cada 4 meses; b) Cultura seca mantida em sílica ou sob camada de óleo mineral. c) Cultura liofilizada mantida em ampola; d) Criopreservação de culturas puras em invólucros adequados. Este método requer o uso de ultra-congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ultimamente, substâncias crioprotetoras vêm sendo largamente utilizadas com o objetivo de assegurar uma maior viabilidade (MARIANO, 2006).

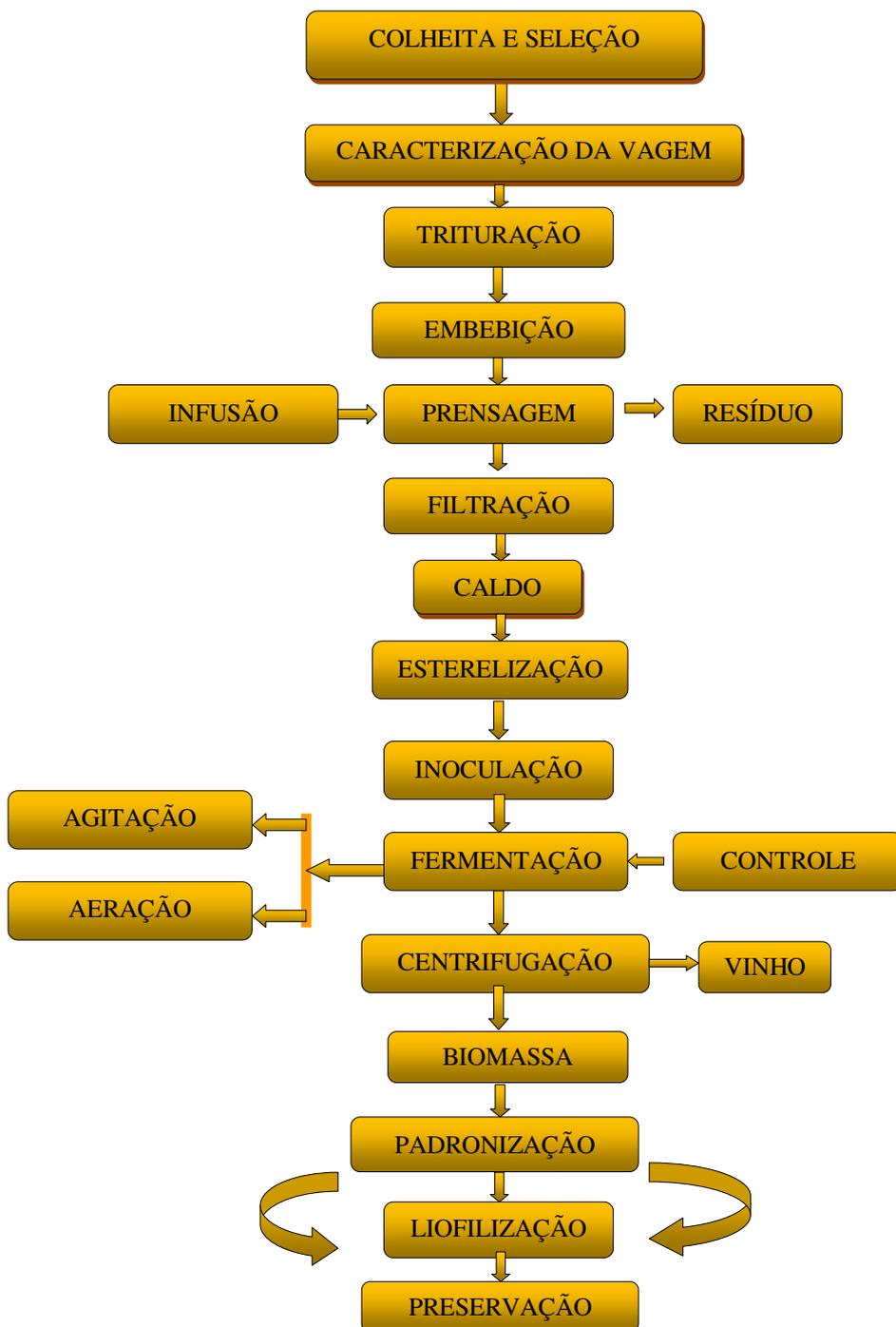
Ainda dentro desses métodos, HICKEY (1980) também realizou estudos de conservação de leveduras usando sorbato em spray como forma de proteção desses microrganismos. Dentre os fatores a serem considerados em um processo de conservação, destacam-se: o tipo de célula, idade da cultura, concentração celular e condições de cultivo.

Há outras técnicas não menos importantes e usadas amplamente nas instituições de pesquisas e nos meios empresariais, como a preservação em meio sólido, óleo mineral, água destilada estéril, congelamento em glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$  e secagem em sílica gel (SETTE, 2003).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos do Núcleo de Pesquisa e Processamento de Alimentos – NUPPA da Universidade Federal da Paraíba e na Universidade Federal de Alagoas.

As etapas de produção do fermento biológico acham-se contidas no fluxograma da Figura 8.



**Figura 8** - Fluxograma de Produção do Fermento de Algaroba.

Descrição do processo produtivo:

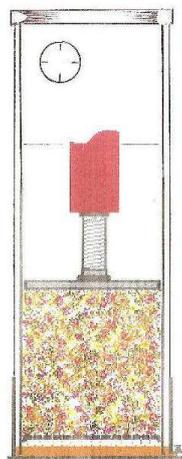
**Seleção da vagem** – após a colheita, a primeira etapa do processo consistiu na seleção e caracterização das vagens a partir de amostragem da região do semi-árido. Depois de acondicioná-las adequadamente evitando sempre que possível, contaminação por parte de microrganismos e perda de açúcar, foi feita a análise química e físico-química das vagens para então dar início ao processo.

**Trituração** – A vagem foi triturada manualmente em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 cm, uma vez que a trituração mecânica, usando liquidificador industrial, resultou no esmagamento da semente. Por esse motivo, foi recomendado posteriormente o uso de moinho de martelo.

**Embebição** – A vagem triturada foi então embebida em água tratada na proporção de 1:3 ou seja, 1kg de vagem para 3 litros de água.

**Infusão** – O volume correspondente às vagens embebidas foi submetido a um aquecimento brando de 70°C por 20 minutos com o objetivo de eliminar as toxinas e substâncias indesejáveis ao processo. Esse procedimento, possibilitou a extração dos açúcares.

**Prensagem** – Por processo inteiramente físico, o material proveniente da infusão foi prensado a uma pressão de 25,5 kgf/cm<sup>2</sup>. A Figura 9 contém o tipo de prensa usado na extração do caldo de algaroba.



**Figura 9** – Prensa hidráulica

A prensa usada na extração do caldo foi do tipo cilíndrica Modelo Skay, 331F, com capacidade para 15 toneladas-força de pressão. O material prensado resultou em uma torta que foi pesada e por diferença, foi obtida a quantidade de açúcares solúveis contida no caldo.

**Resíduo** – Parte sólida resultante do processo extrativo. O material semi-sólido na forma de resíduo foi analisado quanto aos teores de fibra e de água., conforme metodologia da A.O.A.C. (2000).

**Filtração** – O caldo foi filtrado adequadamente para separação de bagacilhos e demais materiais em suspensão, pois estes podem inibir o processo de fermentação. Este procedimento foi levado a efeito com o auxílio de um funil de Bukner sinterizado e bomba de vácuo, (CHAUD, 2006).

**Caldo** - O caldo límpido e puro foi usado como meio de fermentação ou meio de crescimento. O °Brix foi corrigido para dar partida ao processo. Como a faixa recomendada para o crescimento de leveduras está compreendida entre 7 a 10 °Brix (HERNANDEZ, 2003) o caldo foi corrigido para 10 °Brix com uso de refratômetro de campo com escala de 0 a 30 °Brix, usando água destilada. Também foi usado o método da densidade sendo corrigida em tabela apropriada para esse fim. O pH foi medido em potenciômetros analógico e digital durante o acompanhamento do processo de fermentação. Por se tratar de um produto orgânico de caráter alimentar, a acidez foi corrigida por meio de caldo de frutas cítricas.

**Esterilização** - Além de filtrado, o caldo foi esterilizado para evitar a presença de microrganismos contaminantes no meio. Esta operação permite trabalhar com um meio de cultivo mais adequado e seguro o que pode garantir uma boa fermentação ( MORITZ, 1980)

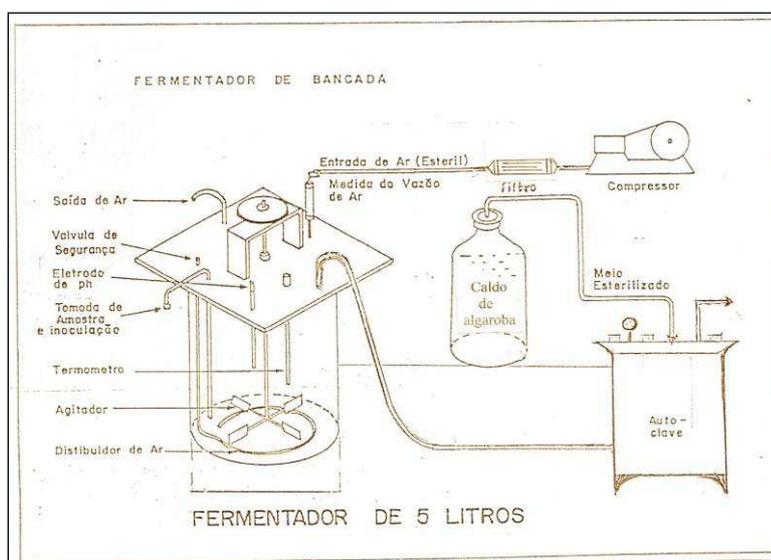
**Inoculação** – O caldo pronto para ser fermentado, foi inoculado com uma concentração conhecida de leveduras, considerado instante inicial do processo fermentativo. Essa quantidade foi equivalente a aproximadamente 2%, do fermento natural em base úmida.

**Fermentação** – Principal etapa do processo. Foram atribuídas as condições ambientais de cultivo como pH, temperatura e concentração ideal de substrato na forma de açúcares redutores totais, conforme recomendação de BORZANI (1999). A fermentação mostrou bom desempenho com ajuste de pH de 5,2 para 4,5; temperatura de 30° C e concentração de

A.R.T. de 25 g/litro. As determinações de açúcares redutores totais, A.R.T. e açúcares totais, A.T., foram feitas com base em procedimentos analíticos específicos como os de Fehling e Somogyi respectivamente, e os demais componentes e nutrientes essenciais como proteína e nitrogênio foram analisados sob o aspecto quantitativo com base na metodologia oficial da A.O.A.C. (2000).

**Agitação** – Operação com função específica no processo de produção de leveduras. Foi controlada durante todo o processo com velocidade de agitação de 250 r.p.m. por ser esta, a velocidade recomendada para volumes inferiores 5 litros, (HISS, 1993).

**Aeração** – Operação considerada indispensável no crescimento de leveduras. A aeração forneceu o suprimento de oxigênio necessário para o metabolismo das leveduras selvagens. O oxigênio foi alimentado por injeção de ar a partir de um mini-compressor, com o objetivo de suprir a quantidade ideal para que as células de leveduras pudessem exercer suas funções metabólicas normais, (PEREIRA, 1999). O biorreator usado na produção de fermento dispõe de acessórios que permitiram o controle da agitação e aeração acoplados em sistema programado para esse fim. A Figura 10 contém o tipo biorreator utilizado na produção de leveduras.



**Figura 10** - Bio-reator de mistura homogênea

**Controle** – Os ensaios de fermentação foram realizados em bio-reator de mistura homogênea, com capacidade para 5 litros e devidamente programado para atender as condições do cultivo de leveduras. O monitoramento do cultivo microbiano bem como o

controle da fermentação foi feito de acordo com recomendação de AMORIM (2005)

**Centrifugação** - Esta, também se constituiu em uma das principais operações do processo cuja finalidade, foi separar os produtos formados durante a fermentação. O vinho e a biomassa foram separados por meio de uma centrífuga refrigerada e de alta rotação, cerca de 5.000 r.p.m., marca FANEM, Modelo 0103b provida de tubos de aço-inox com capacidade para 500 ml de meio fermentado. O tempo de centrifugação foi de 15 minutos. Tanto o vinho como a biomassa foram analisados nesta etapa do processo. A separadora centrífuga determina o volume ocupado pela massa de células, também chamado volume centrifugado.

**Vinho** - Porção sobrenadante resultante da centrifugação. No vinho, foi analisado o teor alcoólico com Alcoômetro de Gay-Lussac disponível em escala de 1 a 100 °GL, por ser o álcool um produto que se forma paralelamente nesse processo. O teor alcoólico também foi determinado com o auxílio de um ebuliômetro ou microdestilador.

**Separação da biomassa que constitui o fermento** – A biomassa, depois de centrifugada por um período de 15 minutos foi determinada a sua concentração celular pelo método de massa seca de células por unidade de volume. O fermento, nessa etapa, foi ressuspenso em água por sucessivas vezes para se obter um produto mais límpido e puro. Esses procedimentos foram efetuados conforme normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). A biomassa foi obtida na forma de fermento úmido.

**Pureza e clarificação do fermento** – A filtração tangencial também foi usada periodicamente nesse processo. O objetivo dessa operação foi determinar a pureza microbiana do fermento por meio do uso de membranas sintéticas microporosas (MP) e de ultrafiltração (UF), as quais podem conferir, de forma eficaz, a textura e a cor desejáveis, conforme recomendado por GAMBRINI, (1997). Testes de estabilidade e pureza microbiana foram feitos com base em análises química e microbiológica do fermento, (COSTA (2005).

**Secagem do fermento por liofilização** - O fermento úmido obtido foi liofilizado em um equipamento Marca Terroni Fauvel, Modelo LB 1500, usando temperatura e pressão fixas. Para essa etapa, foram recomendados congelamentos prévios de -40 °C, -170° e -196 °C, usando respectivamente ultra-congelador, vapor de nitrogênio e nitrogênio líquido, por imersão da amostra, nesses dois últimos.

Depois de submetido a essas temperaturas, o fermento foi imediatamente conduzido ao processo de secagem por liofilização. Na Figura 11 acha-se o tipo de liofilizador usado na secagem do fermento de algaroba.



**Figura 11** – Liofilizador utilizado neste trabalho.

Para o monitoramento do liofilizador, foi acionada a chave geral e imediatamente, ligada a do frio que em média, durou 20 minutos para estabilizar. Após esse período, o fermento foi colocado já congelado em bandejas, cada uma contendo 40 g de da amostra e a partir daí, o vácuo foi acionado, dando início ao processo de liofilização propriamente dito.

**Padronização** – Depois dos tratamentos finais, o fermento produzido, foi analisado para efeito de padronização. As análises físico-químicas tiveram a finalidade de caracterizar o fermento tanto na forma úmida quanto na liofilizada, principalmente em relação às quantidades de proteínas, fibras e carboidratos além da umidade ou massa de água. Esta última, obtida por aquecimento a 105°C até peso constante, conforme procedimentos e normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

**Preservação ou estocagem** – as culturas foram conservadas desde a maneira tradicional em tubos de ensaio, contendo agar inclinado, sob refrigeração a – 5°C e com renovações sucessivas e periódicas até a obtenção de culturas liofilizadas preservadas em temperatura ambiente, segundo técnica recomendada por SETTE (2003).

### 3.1 Metodologia de produção do fermento biológico de algaroba:

A produção de fermento biológico de algaroba foi desenvolvida em duas etapas: uma, relacionada com a seleção de leveduras selvagens do próprio caldo e outra, com a produção, por meio de processos descontínuos ou em batelada.

#### 3.1.1. Colheita e seleção das vagens de algaroba

As vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*, (Sw,DC) utilizadas nesse trabalho foram procedentes das regiões do cariri e sertão paraibanos, especificamente das cidades de Serra Branca, Sumé e Patos. A colheita das vagens foi realizada manualmente e acondicionada em sacos plásticos de polietileno. Essas vagens foram colhidas na forma “in natura” e em estágio de maturação semi-madura.

Depois da colheita as vagens foram divididas em amostras, e estas foram devidamente acondicionadas e armazenadas objetivando atender a programação dos ensaios e experimentos.

#### 3.1.2 Caracterização química e físico-química da vagem de algaroba

A análise de caracterização dentro da amostragem compreendendo a região do semi-árido foi feita com base na metodologia oficial da A.O.A.C. (2000), em relação a umidade, proteína e fibra bruta.

Para os lipídios, resíduo mineral fixo (cinzas), açúcares redutores totais e açúcares totais, foram usados os procedimentos analíticos do INSTITUTO ADOLFO LUTZ, (1985), conforme métodos específicos.

A umidade foi determinada por gravimetria usando temperatura de 105° C. A proteína bruta foi calculada com base no nitrogênio total dosado por volumetria de acordo com o método Micro Kjeldhal para quantificação de proteínas contidas na vagem.

A fibra bruta foi obtida por processo gravimétrico após hidrólise ácida e alcalina da

amostra de algaroba. Os lipídios, por sua vez, foram obtidos através de extração com éter de petróleo em aparelho extrator tipo “Soxhlet” conforme normas do método.

O resíduo mineral fixo ou cinzas foi determinado por gravimetria após incineração da amostra de algaroba a 550° C em mufla. Os carboidratos, foram calculados por diferença a partir das frações precedentes: [ 100 – (umidade + proteínas + lipídios + cinzas)].

Os percentuais de açúcares redutores totais e açúcares totais foram determinados pelo método de Fehling e Somogyi, conforme A.O.A.C., (2000).

## 3.2 Metodologia de seleção e isolamento de Leveduras da algaroba

### 3.2.1 Agente fermentativo

As leveduras usadas nesta pesquisa foram selecionadas e isoladas do próprio caldo de algaroba. Foram isoladas 5 (cinco) leveduras selvagens denominadas: ALG-1, ALG-2, ALG-3, ALG-4 e ALG-5. Essas linhagens depois de selecionadas e isoladas, foram mantidas sob refrigeração a – 4°C de acordo com as técnicas usuais de conservação de microrganismos recomendadas por SETTE (2003), para uso direto nos processos. Dentre as 5 (cinco) leveduras selecionadas 2 (duas), a ALG-3 e ALG-4 foram analisadas com o objetivo de caracterizar e identificar geneticamente os seus gêneros e espécies. O critério de escolha foi aplicado para as linhagens identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.2.2 Preparo do caldo

A algaroba depois de selecionada foi triturada e embebida em água quente a 70°C por 20 minutos e em seguida, prensada com o objetivo de extrair o caldo. A vagem depois de embebida e prensada, gerou um caldo com grau superior a 40 °Brix, o qual foi corrigido a partir da “regra das misturas”. Nessa correção, foi determinada a diluição ideal para facilitar a extração dos açúcares e, ao mesmo tempo, proporcionar uma eficiência mais confiável do processo extrativo.

A concentração dos açúcares teve a medida do °Brix como referência. O °Brix do meio

foi determinado em refratômetro manual e de bancada, ou por meio da massa específica corrigida em tabela específica para se determinar a densidade real. Além de refratômetros utilizados que medem ao mesmo tempo o índice de refração e o °Brix, também foi usado brixímetro (densímetro) aferido com escala de 1 - 30 °Brix. Esses instrumentos tem sido usualmente recomendados para determinação de dados mais precisos e confiáveis.

### **3.2.3 Preparo do xarope de algaroba**

Inicialmente foi preparado o meio de crescimento a partir do caldo de algaroba. Em seguida, por refratometria, foi medido o °Brix inicial, sendo ajustado a 40 °Brix. Não foi necessário fazer suplementação de outra fonte de açúcar pelo fato do caldo de já conter, naturalmente, quantidades suficientes de açúcares para esse fim.

Mediu-se o teor de açúcares totais e a partir desses dados, o xarope foi obtido por processo inteiramente físico, por meio de evaporação, concentrando-se o caldo até 70 °Brix a uma temperatura de 90 °C. O xarope assim obtido, contendo principalmente A.R.T. e sacarose não cristalizada, serviu para alimentar o processo de propagação ou de multiplicação de leveduras a cada 24 horas, período em que se constatou, o esgotamento quase que total de açúcares, observado pela queda do °Brix, medida com refratômetro.

### **3.2.4 Preparo dos meios de crescimento e de isolamento**

Os meios de crescimento foram preparados a partir do caldo de algaroba, partindo de um °Brix inicial igual a 7, medido em refratômetro de campo. Ao final de 72 horas foi adicionado xarope de algaroba, e medido o teor alcoólico com alcoômetro de Gay-Lussac com escala de 0 a 100 °GL. Daí em diante, a cada 24 horas adicionava-se xarope e, o °Brix e o teor alcoólico, foram medidos até estabilizar e se tornar invariável o regime.

### **3.2.5 Meio usado no isolamento e manutenção de leveduras: Meio completo**

Os meios sintéticos ou artificiais para o isolamento foram preparados em tubos e placas a partir de meio completo, conforme se segue:

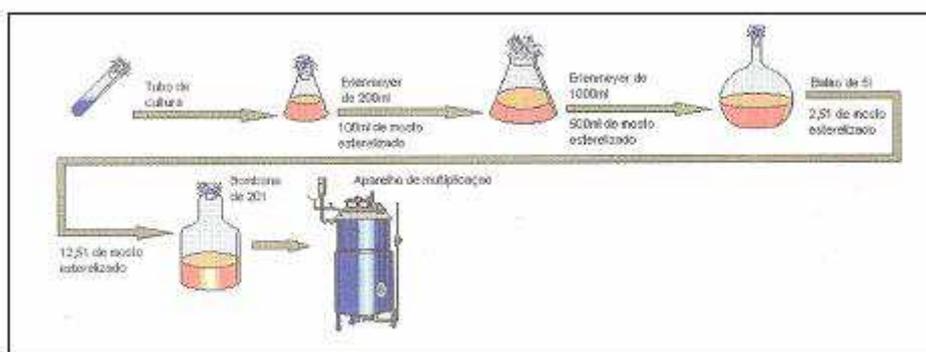
Peptona, 10g; Extrato de levedura, 10 g;  $K_2HPO_4$ , 0,5 g; Dextrose, 20 g; Agar, 20 g; Água destilada ----- 1.000 ml

pH = 4,5. Esterilizar a 121°C / 15 minutos

### 3.2.6 Fases de propagação e de isolamento

O meio, originalmente preparado, foi submetido a um tempo de incubação de 72 horas a temperatura controlada de 32°C. Durante esse tempo, observou-se ao longo da fermentação, uma redução do °Brix, chegando próximo de zero. No final de 7 dias de acompanhamento ininterrupto, observou-se o predomínio de algumas leveduras que resistiram às concentrações adicionais de açúcares. Essas leveduras foram submetidas a uma série de diluições, em ordem crescente, até alcançar o limite de uma suspensão a mais diluída possível. A Figura 12 mostra a fase de multiplicação das leveduras selvagens da algaroba.

Para melhor adaptação e afinidade das leveduras, o meio completo como descrito no item 3.2.5 foi acrescido de caldo de algaroba previamente esterilizado. Esse procedimento foi feito usando vapor fluente, (Temperatura  $\leq 100$  °C). E a partir dessa etapa, foram feitos estudos microbiológicos de seleção e isolamento das leveduras selvagens presentes no caldo de algaroba. Em relação à propagação e seleção de leveduras no caldo foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas como contagem em contador de colônias digital, pureza microbiana e nitrogênio total na levedura e no meio, açúcares totais, açúcares redutores totais e carboidratos além pH e acidez. A Figura 12 mostra o processo de multiplicação celular.



**Figura 12** – Inoculação e propagação de leveduras selvagens

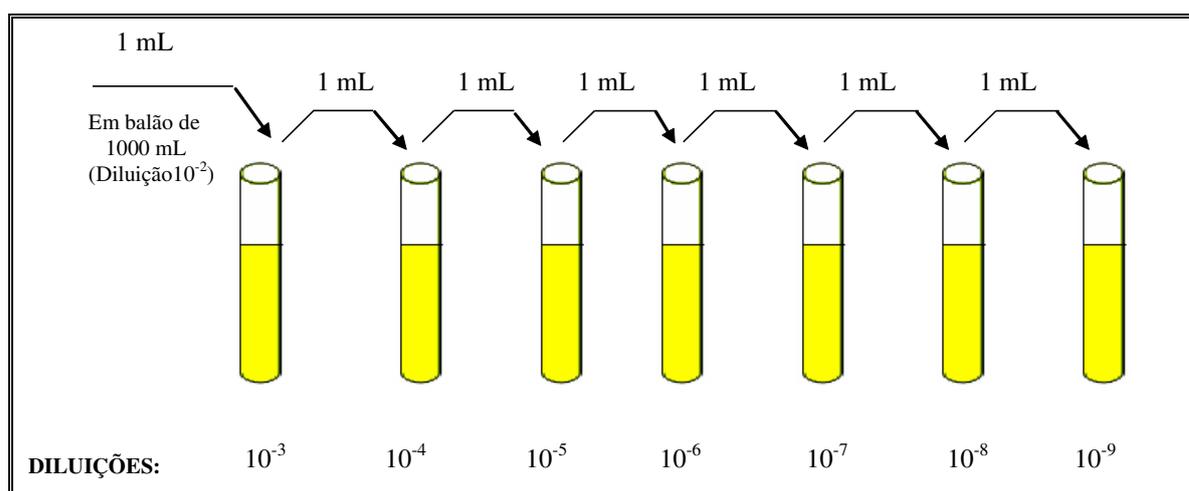
A propagação foi efetuada em balão de 1000 ml, contendo 500 ml de meio, à base de caldo de algaroba. Foi usada a seguir a técnica das diluições seqüenciais por transferência de 1 ml das células crescidas para 9 ml de meio visando a obtenção de colônias isoladas em placas de Petri.

Com base nesses procedimentos, as células foram semeadas nas placas com o auxílio de uma alça de platina para tubos de ensaio. Depois dessa etapa, as culturas foram finalmente conservadas para uso nos cultivos programados.

### 3.2.7 Metodologia de seleção e isolamento de leveduras.

A análise microbiológica se restringiu a contagem de unidades formadoras de colônias, métodos de diluição e de transferência de células. Foi usada a técnica de diluição em série ou diluições sequenciais para obtenção de unidades de colônias isoladas em placas de Petri. Esses procedimentos foram efetuados, conforme metodologia baseada nos princípios da microbiologia (OLIVEIRA, 2005).

Em geral, para esse tipo de procedimento, são utilizadas suspensões celulares muito diluídas preparadas a partir de diluições sucessivas ou sequenciais. Cada uma das diluições em série, foi transferida assepticamente para placas de Petri por meio de sementeira de onde foram observadas as unidades formadoras de colônias. Essas unidades foram quantificadas em contador de colônias digital, Marca Micronal, modelo 125 LG. A metodologia de seleção e o isolamento das linhagens de leveduras contidas no caldo de algaroba utilizado nesse trabalho, pode ser visto na Figura 13.



**Figura 13.** Fase de seleção e isolamento de leveduras do caldo de algaroba.

Da placa onde se desenvolveu o menor número de colônias, foi feita a transferência para

tubos de ensaios contendo agar em tubo inclinado. Durante o período de 48 a 72 horas, em temperatura controlada a 32° C, foi observado o desenvolvimento das culturas em tubos, dentro de condições similares as das placas.

As culturas foram enfim colecionadas e serviram para dar partida aos processos de fermentação conduzidos por cultivo descontínuo, em nível de bancada. A seleção e o isolamento das leveduras selvagens, já na forma de cultura pura, conduziram à metodologia de contagem em câmara de Neubauer como meio para expressar a viabilidade celular (REINA, 2003).

### **3.2.8 Análise genética de identificação de leveduras da algaroba**

Quanto à confirmação da tipagem genética das leveduras isoladas, foi usado metodologia de amplificação de **DNA** por eletroforese, usando como iniciador (GTG)<sub>5</sub> segundo SCAVUZZI (2006).

Para identificar genéticamente as leveduras foram preparadas 10 amostras (isolados), dos quais 5 (cinco) referentes à linhagem *ALG -3* e 5 (cinco) referentes à *ALG - 4*, por serem recomendadas para o desenvolvimento da pesquisa.

As culturas mantidas em estoque, sob refrigeração a -4° C, foram analisadas sob o ponto de vista genético por meio de análise de amplificação de DNA para confirmar o gênero e a espécie das leveduras selecionadas conforme metodologia de RAMALHO NETO (2005).

## **3.3 Monitoramento do cultivo de leveduras - produção de fermento**

A produção de fermento biológico foi analisada de acordo com as condições ambientais exigidas para o processo. O substrato inicial na forma de açúcares redutores totais (A.R.T.) foi analisado conforme descrito no Item 3.2.2. O meio líquido assim preparado, foi corrigido sempre que necessário, a partir da “regra das misturas”. O caldo assim obtido serviu de meio de crescimento, mediante as condições de cultivo exigidas para o processo de multiplicação e propagação de leveduras. O meio recomendado para o processo seleção e isolamento de leveduras foi feito diferentemente do processo de propagação, por se tratar de meio seletivo

específico ligado aos procedimentos microbiológicos básicos para o cultivo em superfície.

No vinho também foi feita análise cromatográfica para se ter uma informação a mais a respeito de outros componentes. O crescimento de leveduras foi determinado em massa de células secas por litro, ou seja, em concentração celular, por meio do uso direto de calor.

O cultivo natural foi analisado sob dois aspectos: biomássico e populacional. Este último, sendo quantificado desde o instante da inoculação até o término da fermentação, por contagem direta ao microscópio.

Não foi necessário fazer correção de quaisquer elementos ou nutrientes pelo fato de já haver no caldo esses elementos em quantidades suficientes para atender as exigências das leveduras.

### **3.3.1 Cultivo de leveduras aplicando os parâmetros de produção.**

O pH, temperatura e concentração de substrato, foram analisados dentro das faixas ótimas desses parâmetros segundo ARAUJO (2005). Inicialmente, foram desenvolvidos alguns testes, apenas com fermentação sem agitação e sem aeração, ou seja a partir de fermentação natural. A agitação ficou por conta do borbulhamento natural decorrente da atividade microbiana momentânea. Os demais cultivos foram analisados sob a influência da agitação e da aeração pelo fato desses parâmetros operacionais serem considerados importantes para o crescimento de leveduras.

Tanto a agitação quanto a aeração foram monitoradas em separado e de forma simultânea, uma vez que se trata de operações que estão intimamente ligadas a produção de leveduras. A velocidade de agitação foi controlada em 250 r.p.m., medida em um rotâmetro acoplado ao bio-reator e a taxa de aeração em 0,5 v.v.m. (Volume de ar por volume de meio por minuto) correspondente a uma demanda de 7 mg de O<sub>2</sub>/litro (LALUCE, 2006).

Dada a importância do oxigênio no processo, foi medida a concentração de oxigênio dissolvido, segundo LUDWIG et al. (2001). A concentração de oxigênio dissolvido foi medida em oxímetro digital (Medidor de oxigênio) que mediu a taxa de aeração relacionada com o suprimento e demanda de oxigênio. Esses parâmetros operacionais são recomendados

para produção de leveduras, por BORZANI (1999).

### 3.4 Cultivo das linhagens selecionadas em caldo de cana-de-açúcar

As leveduras selecionadas e isoladas foram testadas em caldo de cana admitindo-se as mesmas condições do cultivo com o caldo de algaroba, de acordo com OLIVEIRA (2005) para observação do comportamento e desempenho das novas linhagens. Além das variáveis operacionais, foram monitoradas as variáveis cinéticas como: velocidade de crescimento celular,  $v_x = dX/dt$ ; velocidade de consumo de substrato,  $v_s = -dS/dt$ ; e de formação de etanol,  $v_p = dP/dt$ ; sendo este, determinado somente no final do processo.

A concentração celular ( $X$ ) foi determinada pelo método usual que relaciona a massa de célula seca por unidade de volume segundo metodologia da A.O.A.C. (2000),

O substrato, analisado na forma de Açúcares Redutores Totais – A.R.T. foi determinado conforme normas e procedimentos analíticos do Instituto ADOLFO LUTZ (1985).

A quantidade de etanol no vinho foi determinada em ebuliômetro e alcoômetro mediante recomendação de BORZANI (1999). Além dessas determinações, o pH foi medido a cada intervalo de 2 horas, durante o processo de fermentação em todas as formas de cultivos adotadas neste trabalho.

As mesmas análises também foram efetuadas para o cultivo envolvendo leveduras comerciais, tipo fermento Fleischmann.

O desempenho das linhagens ALG -1, ALG-2, ALG-3, ALG-4 e ALG-5 foi analisado sob o ponto de vista de eficiência bioquímica e eficiência de processo.

### 3.5. Separação e padronização do fermento

- Centrifugação – fermento úmido
- Liofilização - fermento seco

**3.5.1 Centrifugação** – a maneira mais comum e mais prática de separar a massa celular é por meio de centrifugação. A capacidade de separação da centrífuga utilizada foi suficiente para obter o fermento com o teor de água ideal para ser padronizado. Além desse processo de separação, a filtração tangencial, também foi usada periodicamente, por meio de membranas sintéticas do tipo microporosas (MP) e de ultrafiltração (UF), as quais podem conferir melhor, a textura e cor desejáveis, conforme recomendado por GAMBRINI, (1997).

**3.5.2 Liofilização** - O fermento úmido depois de centrifugado com 74% de teor de água, foi submetido a um processo de desidratação por liofilização. Esta operação teve duplo objetivo: manter as características das células de leveduras (Fermento) fisiologicamente inalteradas e a preservar sobretudo, a viabilidade celular por longo período. O congelamento é uma etapa que faz parte da liofilização. DELAZARI (1999) recomenda que essa operação deve ser efetuada da forma mais rápida quanto possível para que não haja perda e sejam mantidas as características originais do produto bem como permanecer intacta a estrutura da célula.

### 3.6 Análises de Viabilidade celular

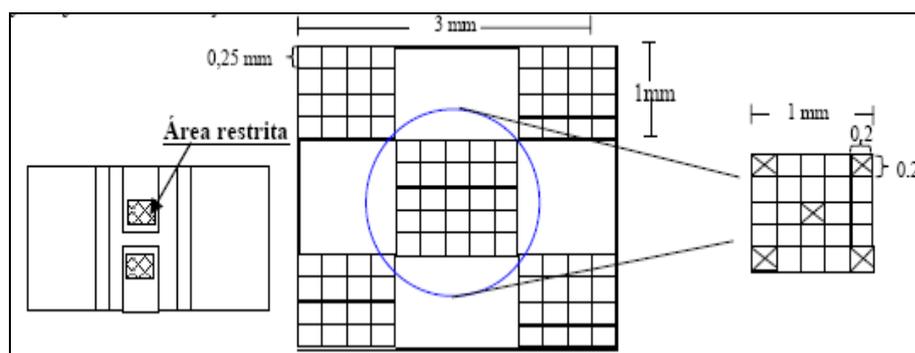
O crescimento microbiano foi quantificado em câmara de Neubauer segundo metodologia recomendada por LOPES (2005). A viabilidade celular foi determinada por meio de contagem diretamente ao microscópio com um aumento de 600 vezes, em câmara de Neubauer.

A quantificação de leveduras foi feita em função da totalidade de células presentes na suspensão. A viabilidade celular consiste do percentual de células viáveis ou vivas em relação ao número total de células (Células vivas + células mortas). Trata-se de um método simples e fácil que consiste no uso de uma pipeta de Pasteur que serve para aspergir diretamente uma gotícula da amostra sobre a câmara que é recoberta com uma lamínula. O azul de metileno é usado apenas para corar as células e facilitar o processo de quantificação.

Testes de pureza microbiana também foram feitos no fermento, por meio de análise qualitativa, com o objetivo de se observar a estabilidade da cultura em relação à presença de microrganismos contaminantes (STEPHEN, 2005). Segundo esse mesmo autor, para quantificação de células, são usadas pipetas de Pasteur para transpor a gotícula para o centro

da câmara que, é coberta com uma lamínula. A técnica mais usual recomenda o uso de corante azul para distinguir as células vivas ou viáveis das não viáveis.

A câmara usada foi do tipo FUCHS- ROSENTHAL Double Ruling, melhorada com um espelhamento de ródio e com 0,2 mm de profundidade, conforme a ilustração da Figura 14, onde pode ser visto o campo de contagem.



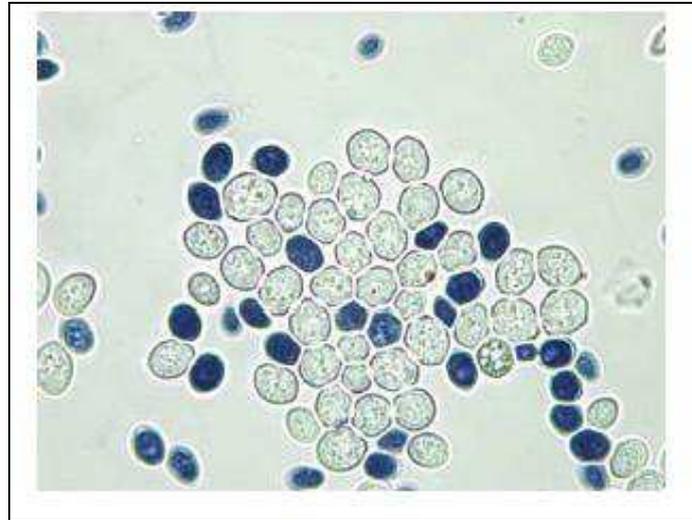
**Figura 14.** - Vista do campo de observação da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem (área restrita) aumento de 600x

Há outros métodos de quantificação de células porém, optou-se pelo método mais prático e usual que permite um grau de confiabilidade maior. Esse método define um campo bastante amplo de visualização contendo um quadrado, posicionado na parte central da câmara, com 25 quadradinhos que facilita a contagem das células. As áreas são realçadas pelo ródio quando a luz atinge a câmara. Pela alteração do contraste, as imagens das áreas podem ser vistas claras ou escuras.

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se azul de metileno, sendo viáveis as que não absorvem o corante e inviáveis aquelas que o absorvem, apresentando coloração azul, (REINA, 2003).

Esse método de contagem inclui os microrganismos vivos ou viáveis e mortos, denominada de contagem total de células. Este é o método mais prático e confiável para o acompanhamento do crescimento microbiano. COSTA (2004) mostra como esse procedimento é vantajoso em relação aos outros métodos.

As células mortas e vivas ou viáveis são bastante distintas. A Figura 15 ilustra de forma clara, as células que são consideradas vivas ou viáveis e as células mortas, onde estas, são bem destacadas pela coloração azul.



**Figura 15** - Observação microscópica da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* (aumento de 600x)

O resultado da contagem foi expresso em número de células/ml de acordo com a população quantificada a partir da fórmula que se segue:

$$N^{\circ} \text{ de Cels} = \frac{\text{Céls}}{\text{ml}} = \frac{n \cdot f_d \cdot 1000}{0,004}$$

em que,

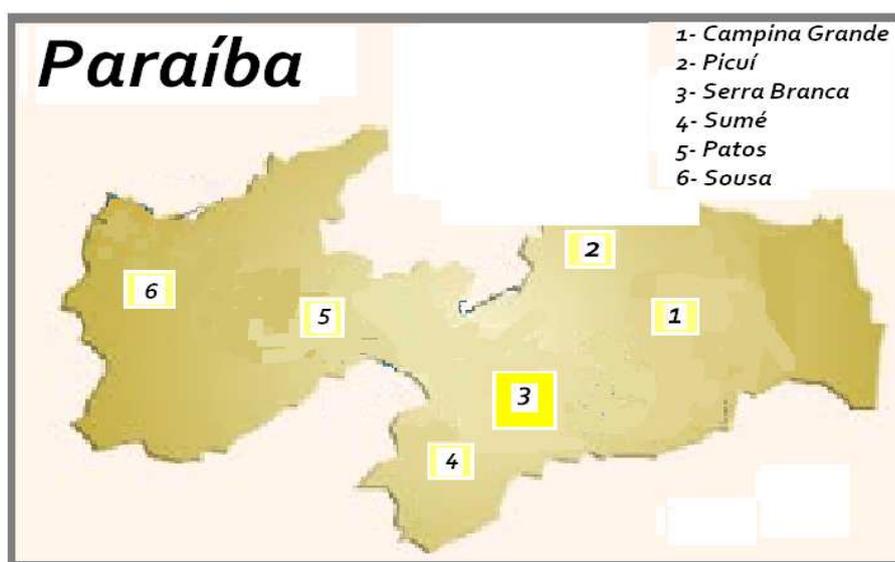
n = média do número de células

f<sub>d</sub> = fator de diluição

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterização e avaliação das vagens de algaroba

Foram analisadas neste trabalho, as vagens de algaroba das principais localidades produtoras do semi-árido do Estado da Paraíba. O mapeamento agrícola delimitado por microrregiões consideradas importantes do ponto de vista de produção, permitiu selecionar a vagem de composição mais adequada para atender o desenvolvimento desta pesquisa. Essas microrregiões abrangem principalmente as áreas do Curimataú, Sertão e Cariri paraibano. A Figura 16 mostra o mapa do Estado da Paraíba onde se localizam os principais municípios produtores de algaroba onde, numericamente, podem ser vistos, de forma destacada, aqueles que foram escolhidos para suprir as necessidades de matéria prima deste trabalho.



**Figura 16** – Mapa do Semi-Árido do Estado da Paraíba

Embora todos os componentes sejam importantes para o processo de crescimento de leveduras, na Tabela 2 encontra-se uma análise estatística simplificada correspondente aos principais componentes químicos de interesse para o processo de produção, embora nas Tabelas 3 e 4 constatem-se diferenças significativas entre cada componente químico e físico-químico das vagens de algaroba por município.

**Tabela 2** – Análise estatística simplificada dos principais componentes químicos das vagens de algaroba.

Tratamentos	Teste F	DMS - Desvio mínimo significativo	CV Coeficiente de Variação
-------------	---------	--------------------------------------	-------------------------------

<b>Umidade</b>	5053.10**	0,19585	0,59828
<b>Proteína bruta</b>	42926.14**	0,06810	0,06012
<b>Extrato Etéreo</b>	1621.4333**	0.08227	1.68067
<b>Acidez</b>	73.70**	0,3232	0,4961
<b>Resíduo Mineral</b>	251.5470**	0.19984	1.88697
<b>Carboidratos</b>	21184.2433**	0.11796	0.05863
<b>Fibra Bruta</b>	1371.3319**	0.07675	0.18541
<b>Açúcares Redutores - ART</b>	230.55**	0,55627	2,01609
<b>Açúcares não Redutores - ANT</b>	63526.6857**	0.05131	0.04865
<b>Açúcares Totais - AT</b>	536.12**	0.07140	0,91312
<b>V.C.T.</b>	90077.1295**	0.17878	0.01875

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 < p < 0,05$ )

ns não significativo ( $p > 0,05$ )

Embora, as vagens de algaroba coletadas nos demais municípios tenham apresentado valores próximos aos encontrados na literatura observa-se que estes são significativamente diferentes, Tabelas 3 e 4. Na Tabela 3 encontra-se a composição centesimal das vagens, onde os maiores teores de proteínas, que são componentes de interesse para o crescimento de leveduras, foram obtidos nos municípios de Patos e Serra Branca.

Na Tabela 4 pode ser vista a composição química complementar das vagens de algaroba, onde se observa que as vagens do município de Serra Branca foram as que apresentaram a maior quantidade de açúcares totais alcançando um valor da ordem de 44,35%. Consta-se também que os açúcares redutores totais atingiram um percentual de 3,05%, quantidade ideal para atender o processo de fermentação e produção de leveduras.

Esses percentuais encontram-se dentro das faixas exigidas para o desdobramento do substrato em produtos, (TAVARES, 2004).

Os percentuais seguido das letras a, b, c, d, e e e representam as variações correspondentes à análise estatística de cada componente da vagem dos diversos municípios.

**Tabela 3** - Composição centesimal de vagens da algarobeira de diversas microrregiões do Semi-Árido Paraibano

Localidade	Teor de água %TA	Proteína Bruta %PB	Extrato Etéreo %EE	Resíduo Mineral % RMF	Carboidratos %CH
<b>C. Grande</b>	15,03 a	10,63 c	2,21 c	2,35 c	69,78 f
<b>Picuí</b>	14,91 a	7,68 e	2,34 b	3,23 e	71,84 e
<b>S. Branca</b>	10,30 d	11,42 b	1,90 d	3,30 d	73,10 c
<b>Patos</b>	10,70 c	12,50 a	2,43 a	3,25 e	71,12 d
<b>Souza</b>	13,10 b	9,20 d	0,90 e	2,50 b	74,30 b
<b>Sumé</b>	7,58 e	8,93 d	0,93 e	2,55 a	80,01 a

**Legenda:**

Teor de água = %TA, base úmida

Proteína Bruta = %, PB (g/100g) x 100

Extrato Etéreo, (Lipídios) = %EE, (g/100g) x 100

Resíduo Mineral Fixo (Cinzas) = %RMF, (g/100g) x 100

Carboidratos = %CH, (g/100g) x 100

**Tabela 4** - Composição química complementar e físico-química das vagens de algaroba

Localidade	Acidez	FB	ART	ANT	AT	V.C.T.
<b>C. Grande</b>	2,45 a	15,94 a	3,21 a	38,14 c	41,35 d	361,50 a
<b>Picuí</b>	2,40 b	15,24 c	2,58 d	37,34 d	39,92 e	331,20 f
<b>S. Branca</b>	2,39 b	15,02 d	3,05 b	41,30 a	44,35 a	349,15 c
<b>Patos</b>	2,40 b	14,52 e	2,86 c	41,20 a	44,06 b	343,20 d
<b>Souza</b>	2,30 c	15,50 b	2,30 e	34,00 e	36,30 f	342,10 e
<b>Sumé</b>	2,31 c	14,35 f	3,10 b	38,74 b	41,84 c	358,73 b

Acidez = Normal (%)

FB = Fibra Bruta, %, FB (g/100g) x 100

ART = Açúcares Redutores Totais, %, ART(g.glicose/100ml) x 100

ANT = Açúcares não Redutores, %, ANT (g.sacarose/100ml) x 100

AT = Açúcares Totais, % (ART + ANT)

VCT = Valor Calórico Total, calorias

Contudo, a análise de caracterização das vagens de algaroba produzida no município de Patos apresentou resultados bem próximos aos do município de Serra Branca, onde a quantidade de açúcares totais foi 44,06% e a de açúcares redutores totais foi 2,86%. São percentuais de açúcares que se encontram nas faixas ótimas para utilização em processos de fermentação (ARRUDA, 1994).

O município escolhido para fornecer vagens de algaroba a esta pesquisa foi o município de Serra Branca em função da composição química das vagens de algaroba, onde se observa que

esses valores estão mais próximos dos valores encontrados na literatura, cujos dados acham-se compilados na Tabela 1. Outro motivo para a escolha do município de Serra Branca como fonte fornecedora de matéria prima para o projeto é a disponibilidade constante desse material encontrado nesta cidade, uma vez que os outros municípios nem sempre dispunham, a todo o momento, de vagens para suprir o desenvolvimento da pesquisa

Paralelamente, componentes de interesse para outros fins, como a dextrina e o amido, contidos nas vagens, foram analisados apenas qualitativamente, tendo em vista que, para esse processo especificamente, essas substâncias podem comprometer o rendimento, como foi observado em experimentos preliminares. Na Tabela 5 podem ser vistos os testes confirmativos feitos com etanol hidratado e com Lugol (iodo), cujos solventes serviram para confirmar a presença de dextrina e de amido respectivamente.

**Tabela 5** - Testes qualitativos para comprovação da presença de dextrina e amido no caldo de algaroba.

Suspensão celular	Solvente	Coloração	Confirmação
Fermento + Caldo (a)	Etanol hidratado	Amarela	Presença de dextrina
Fermento + Caldo(b)	Lugol (iodo)	Azul	Presença de amido

A vagem de algaroba selecionada e de composição definida, foi trabalhada no sentido de extrair seu caldo que resultou em um meio líquido natural que ofereceu condições ambientais e favoráveis para o cultivo de leveduras.

#### **4.2 Seleção e isolamento de linhagens de leveduras do caldo de algaroba.**

A seleção de leveduras selvagens feita com base nos princípios microbiológicos (OLIVEIRA, 2003) e genéticos (SCAVUZZI, 2007) resultou no isolamento de 5 (cinco) linhagens, dentre as quais, duas se sobressaíram, apresentando bom desempenho na produção de fermento biológico. Estas, além de serem usadas no cultivo em caldo de algaroba, foram utilizadas com as demais, na fermentação alcoólica em caldo de cana que também apresentaram bom rendimento quando comparadas com o fermento comercial.

O fato de não ser necessário realizar correção de pH, temperatura e concentração de substrato no caldo da algaroba já demonstra uma grande vantagem em relação a outros processos que requerem o controle desses parâmetros.

As condições ambientais mantendo pH 5,0 e a temperatura ambiente de 28 °C foram suficientes para que as leveduras presentes no meio apresentassem um bom desempenho durante o cultivo. Os aspectos fisiológico e microbiológico, como formação de espumas e reprodução assexuada em forma de brotos observados nas condições oferecidas, mostraram que a biomassa produzida no caldo de algaroba tem todas as características e o mesmo comportamento de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

O caldo, em última análise, mostrou ser um meio altamente seletivo, onde a seqüência de diluições concorreu para que houvesse maior competitividade entre as leveduras expostas no meio. Tanto é que, algumas leveduras, por uma questão de sobrevivência, suportaram concentrações muito diluídas entre  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  mostradas anteriormente na Figura 10, por meio de tubos com diluições em série. No entanto, nas placas a partir das diluições  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  a quantidade de unidades formadoras de colônias foi diminuindo onde o meio foi se tornando cada vez mais seletivo. Isto permite inferir que nessas diluições, algumas leveduras selvagens alcançaram maior poder de tolerância às concentrações de açúcar e álcool contidas no meio, o que se atribui à resistência e capacidade de absorção dessas substâncias enquanto outras não resistiram.

Este é, um processo natural de seleção em que grande parte das leveduras são eliminadas pelo aumento gradativo de diluições, enquanto outras, vão se sobressaindo até permanecer no meio apenas aquelas com alto poder de tolerância.

Nesse método de seleção, a de concentração mais diluída que foi  $10^{-9}$ , foi observado somente o crescimento de uma única unidade formadora de colônias, de onde foram isoladas as 5 (cinco) leveduras para este trabalho. As leveduras resultantes dessa etapa, foram transferidas para meio completo YEPD (Extrato de lêvedo, peptona e dextrose) onde mostraram boas perspectivas de crescimento em placas, que foram corroboradas quando transferidas diretamente para tubos de ensaio.

As leveduras isoladas, apresentaram um crescimento uniforme e bem destacado no tubo contendo agar inclinado, o que indica a sua afinidade com o meio utilizado. Porém, o meio completo quando foi acrescido de caldo de algaroba, o crescimento observado foi ainda maior. A adição de meios naturais a meios sintéticos contribui para uma melhor adaptação do

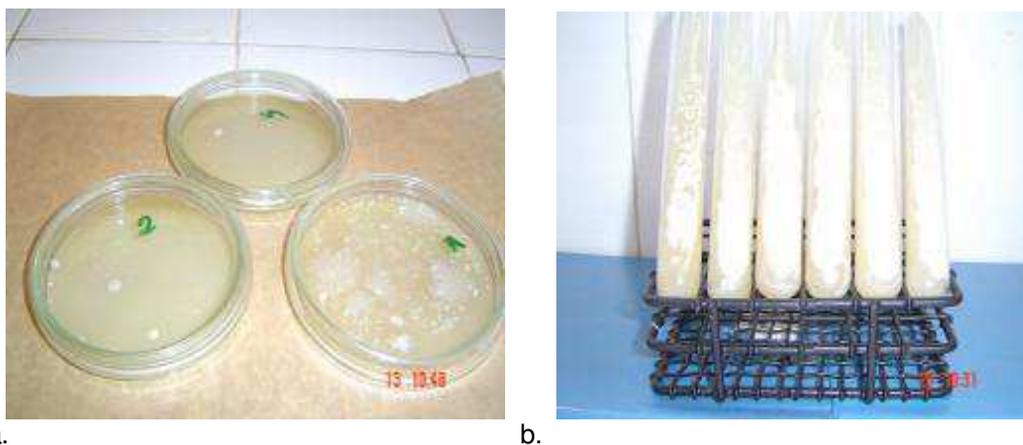
microrganismo com o meio a ser utilizado, segundo TAUKE (1982).

As culturas puras isoladas, foram conservadas em tubos de ensaio para atender o desenvolvimento da pesquisa propriamente dito. Desta forma, foram dadas definitivamente denominações especiais às linhagens isoladas do caldo de algaroba: *ALG-01*, *ALG-02*, *ALG-03*, *ALG-04* e *ALG-05*. As leveduras selvagens foram microbiologicamente caracterizadas pelas suas peculiaridades como por exemplo, a forma de reprodução e o aspecto morfológico onde se observou a todo instante a presença de células-filhas.

Pelas características observadas, pôde-se comprovar que essas novas linhagens pesquisadas, taxonomicamente, apresentaram morfologia própria das leveduras. Das cinco linhagens, duas a *ALG-03* e *ALG-04* foram selecionadas para o processo de produção de fermento por apresentarem bom desempenho nos experimentos preliminares. A *ALG-03* por ser mais floculenta do que a *ALG-04* acarretou um crescimento mais rápido, o que na prática, é recomendável para produção de fermento, enquanto a menos floculenta mostrou particularidades mais voltadas para a fermentação alcoólica.

Nesta última, foi observado um aspecto pulverulento, onde se observou uma velocidade de sedimentação mais lenta, ocasionada pela formação de floculos mais leves. Estas e outras características representam especificidades intimamente ligadas às leveduras que, as classificam como linhagens ou cepas. Todavia, essas diferenças podem possibilitar o surgimento de uma variedade dessas linhagens, porque além da capacidade de fermentar tem também a habilidade de flocular.

As características morfológicas observadas no cultivo usando caldo de algaroba foram bem próprias das leveduras, cujo princípio de reprodução por brotação foi observado. As leveduras selvagens são de aspecto rugoso e bordas irregulares, como são conhecidas, enquanto as leveduras puras apresentaram bordas regulares e lisas. Na Figura 17 pode ser observado o crescimento de leveduras selecionadas em placas e em tubos



**Figura 17** - Colônias de leveduras formadas sobre a superfície do meio sólido em placas (a) e Crescimento de leveduras em tubos de ensaio (b).

A tipagem genética foi restrita apenas a análise de DNA das duas linhagens que se sobressaíram nos testes preliminares, a ALG-3 e ALG-4. Nessa análise, foi feita a identificação do perfil genético das leveduras selvagens originárias do caldo de algaroba.

Dentro da amostragem analisada, 5 (cinco) isolados da linhagem ALG-03 foram identificadas como sendo *Saccharomyces cerevisiae* e 5 (cinco) da linhagem ALG-4 como Não-*Saccharomyces*.

Na Tabela 6 pode ser visto, a identificação e a tipagem genética das linhagens ALG-3 e ALG-4, do caldo de algaroba.

**Tabela 6** - Amplificação de DNA – iniciador (GTG)<sub>5</sub>

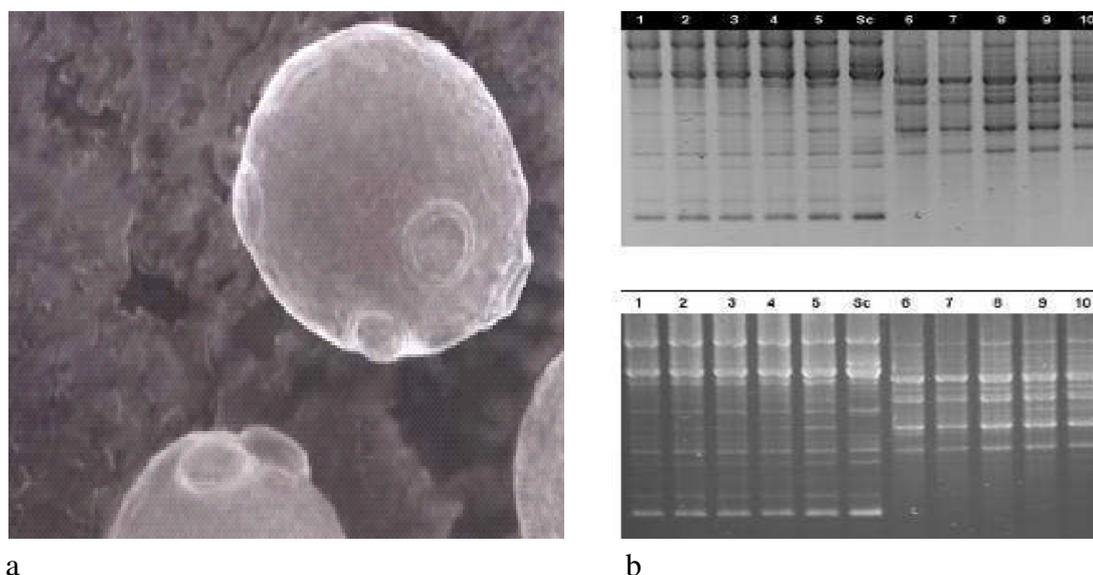
Isolado	Morfologia da colônia	Tipagem Genética
ALG3 01	Rugosa e pequena	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P1
ALG3 02	Rugosa e pequena	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P1
ALG3 03	Rugosa e pequena	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P1
ALG3 04	Rugosa e pequena	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P1
ALG3 05	Rugosa e pequena	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> P1
ALG4 06	Lisa e pequena	Não- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALG4 07	Lisa e pequena	Não- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALG4 08	Lisa e pequena	Não- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALG4 09	Lisa e pequena	Não- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ALG4 10	Lisa e pequena	Não- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

A linhagem ALG-4 embora não sendo do gênero *Saccharomyces*, possui atributos de

outros tipos de leveduras que, também conduzem naturalmente à fermentação. As não-*Saccharomyces* foram identificadas posteriormente como sendo do gênero *Zygosaccharomyces*. Este gênero é encontrado comumente nas fermentações com grau alcoólico abaixo de 7 °GL e, quando se tem uma acidez total acima do normal. Essas características são percebidas nos processos que usam caldo de cana irrigada com vinhaça e atacada pela cigarrinha, (RAMALHO NETO, 2005).

A tipagem genética foi determinada a partir de uma levedura pura, da espécie *Saccharomyces cerevisiae* como padrão para a efetiva identificação por eletroforese, podendo ser visto na Figura 18.

A fluorescência observada a partir da levedura padrão localizada na parte central, mostra da esquerda para direita, a semelhança e igualdade da levedura pura com as leveduras selvagens denominadas ALG-3, do caldo de algaroba. É fácil constatar que se trata de leveduras do mesmo gênero pela similaridade do aspecto apresentado



**Figura 18** - Levedura *Saccharomyces cerevisiae* padrão (a) Tipagem genética das leveduras selvagens do caldo de algaroba (b)

A tipagem genética apenas confirmou que as leveduras observadas diretamente no microscópio, eram realmente do gênero *Saccharomyces*, cuja espécie foi comprovada a partir da linhagem ALG-3. O mais importante é que as Não-*Saccharomyces* identificadas, comprovaram o que havia sido observado experimentalmente, em relação a sua função de produzir aroma e sabor agradável durante a fermentação.

Esta levuriforme é encontrada geralmente em zonas litorâneas e várzeas, conforme SCAVUZZI (2005). As análises morfológicas e genéticas serviram para identificar inicialmente as linhagens selecionadas e isoladas do caldo de algaroba.

Surpreendentemente, o resultado da identificação genética da linhagem ALG-4, dentro das amostras analisadas, mostrou a possibilidade de que sejam as primeiras leveduras desse gênero, descrito em zonas do semi-árido.

Espécies desse gênero foram encontrados na literatura como descrito por alguns estudiosos, segundo a sua taxonomia como a *Zigosaccharomyces baili* identificada por Guilliermond em 1912, *Z. bisporus* por Naganishi em 1917, *Z. cidri* por Yahoow em 1977, *Z. fermentati* por Naganishi em 1928, *Z. florentinus* por Castelli em 1960, *Z. mellis* por Fabrian & Quinet em 1928, *Z. microellipsoides* por Osterwalder em 1977, *Z. mrakii* por Capriotti em 1958 e *Z. rouxii* por Yarrow em 1977. (HERNANDEZ, 2003; ROTHMANN, 1987).

As encontradas na vagem da algaroba são da espécie *Zigosaccharomyces mellis*, segundo BARNETT et al. (1998).

O mais importante é que as leveduras selecionadas de linhagem denominada ALG-3 são realmente, do gênero/especie *Saccharomyces cerevisiae* conforme foi confirmada por meio de análise de amplificação de DNA, conferindo assim, a identidade genética da levedura usada neste trabalho.

Partindo do principio de que uma boa fermentação depende exclusivamente da qualidade da levedura e dos componentes nutricionais do meio, as fontes energéticas da algaroba e as leveduras selecionadas do seu próprio caldo, fizeram com que essa combinação culminasse com um bom resultado. A partir desta etapa as culturas selecionadas foram transferidas para tubos de ensaios, contendo meio de conservação, onde foram mantidas para uso posterior.

O cultivo “*in vitro*” já na forma de cultura estoque, e preservada sob refrigeração, apresentou todas as características possíveis, como idade da cultura e viabilidade celular dentre outras, para serem aproveitadas nos processos de fermentação.

### **4.3 Avaliação do fermento produzido a partir das leveduras selecionadas**

A produção de fermento biológico foi avaliada sobre dois aspectos: um em relação a produção de biomassa, partindo dos dados de experimentos preliminares e outro, em relação à população de células de leveduras. Este, por ser um procedimento mais confiável, foi avaliado sob quatro formas de condução do processo.

#### **Formas de cultivo adotadas:**

- a.) Crescimento em Produção de biomassa
- b.) Crescimento em População microbiana
  - 1 Cultivo sem agitação e sem aeração;
  - 2 Cultivo de leveduras com agitação – processo agitado;
  - 3 Cultivo de leveduras com aeração – processo aerado;
  - 4 Cultivo de leveduras com agitação e aeração – processo agitado e aerado.

#### **4.3.1 Cultivo natural de leveduras**

Nesse cultivo, a oxigenação do meio fica por conta do borbulhamento natural que fornece a concentração de oxigênio dentro das exigências das leveduras para cumprir o seu metabolismo.

A concentração de oxigênio dissolvido de 7 miligramas por litro, medida durante o cultivo, corresponde a quantidade que se encontra dentro da faixa de trabalho das leveduras, conforme ANDRIETTA, (2005) para suprir as necessidades das células ao longo do processo de biotransformação.

Nesses testes, foi considerada apenas a reprodução celular por meio de multiplicação, com o objetivo de produzir biomassa a partir de leveduras naturais selecionadas. Para atingir certa produção, o cultivo microbiano foi controlado, de maneira a obter uma boa eficiência de fermentação.

As condições de cultivo oferecidas ao microambiente, tais como pH, temperatura e concentração de substrato forneceram dados para avaliar o crescimento celular tanto em

termos de produção de biomassa quanto em população microbiana.

Na Tabela 7 encontram-se os dados referentes ao crescimento gradativo em biomassa durante o cultivo natural usando leveduras selvagens. Nesses testes, foi considerada apenas a reprodução celular por meio de multiplicação, com o objetivo de produzir biomassa a partir de leveduras naturais selecionadas.

**Tabela 7** – Crescimento de leveduras selvagens da algaroba

Tempo (hora)	Massa-seca de céls.(g/litro)	$\Delta M/\Delta t$	$\Delta M/\Delta t$	$\Delta M/\Delta t$
0	0,04			
1	0,40	0,36		
2	0,75	0,35		
3	1,25	0,5	0,5	
4	2,65	1,4	1,4	1,4
5	3,72	1,07	1,07	1,07
6	5,12	1,4	1,4	1,4
7	6,56	1,44	1,44	1,44
8	7,45	0,89	0,89	0,89
9	8,10	0,65	0,65	
10	8,57	0,47		
11	8,58	0,01		
12	8,58	0		
Média		0,36	1,05	1,24

Para atingir certa produção, o cultivo microbiano foi controlado, de maneira a obter uma boa eficiência de fermentação. As condições de cultivo oferecidas ao microambiente, tais como pH, temperatura e concentração de substrato forneceram dados para avaliar o crescimento celular tanto em termos de produção de biomassa quanto em população microbiana. Observa-se nesta Tabela 7 que a porção reta do crescimento da levedura se dá, aproximadamente, no intervalo entre 2 horas e 9 horas. Se assim for considerado pode-se dizer que a cada uma hora são acrescido, em média, 1,05 g/L de matéria seca de células. No entanto, se for considerado que a porção reta do crescimento celular se dá entre 3 e 7 horas constata-se que, em média, a cada uma hora são acrescidos 1,24 g/L de matéria seca de células.

O caldo de algaroba por conter quantidades bem mais elevadas de proteínas e de açúcar, apresentou um comportamento semelhante ao do caldo de cana. Segundo BORZANI (1999),

esses componentes são vitais e indispensáveis e contribuem diretamente com o crescimento microbiano.

O cultivo microbiano teve como objetivo, avaliar o comportamento das leveduras que foram isoladas do próprio caldo relacionado com a biomassa e o crescimento populacional microbiano, por serem estes, os principais objetivos desta investigação científica. O crescimento das leveduras selvagens ocorreu por meio de multiplicação ou propagação de celular, com base no conceito de reprodução binária, (LOPES, 2005), ou seja, cada célula tem a capacidade de duplicar a sua massa associada a um tempo de geração.

Como pode ser observado, a produção de biomassa alcançou em um período de 10 horas, uma concentração de células de 8,57 g por litro. Essa concentração foi obtida a partir de um inóculo de 0,04 g por litro que correspondente à concentração inicial de células que garantiu o desenvolvimento do processo de fermentação

Os dados quando plotados serviram para avaliar as principais fases do crescimento microbiano, principalmente, as de maior produção de células. A fase “Lag”, de adaptação ou de indução, foi pequena, embora seja considerada importante, na qual, ocorre inicialmente, um rearranjo do sistema enzimático das leveduras.

Na fase intermediária se observou um aumento gradativo da concentração celular, passando diretamente para fase “Log” ou exponencial, considerada a principal fase do processo.

Como a fase exponencial tem a distribuição de uma reta, a velocidade específica de crescimento celular é constante e máxima,  $\log X - \log X_0 = \mu (t - t_0)$ . Considerando os pontos extremos compreendidos entre 2 e 9 resultou a equação:  $y = 0,8568x - 1,2558$ .

Nesta fase, houve maior produtividade uma vez que as células já estavam adaptadas ao meio, velocidade de crescimento elevada e maior consumo de substrato. Como se trata de uma fase de interesse prático, os dados referentes a essa fase, foram distribuídos em coordenadas semi-logarítmicas com o objetivo de determinar a velocidade específica de crescimento celular, expressa por:

$$\mu = \frac{d(\ln X)}{dt} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu \quad (8)$$

ou ainda,  $\ln X = \ln X_0 + \mu (t - t_i)$ , equação que expressa o crescimento microbiano. Esta variável foi usada para calcular o tempo de geração ou tempo de duplicação da massa celular.

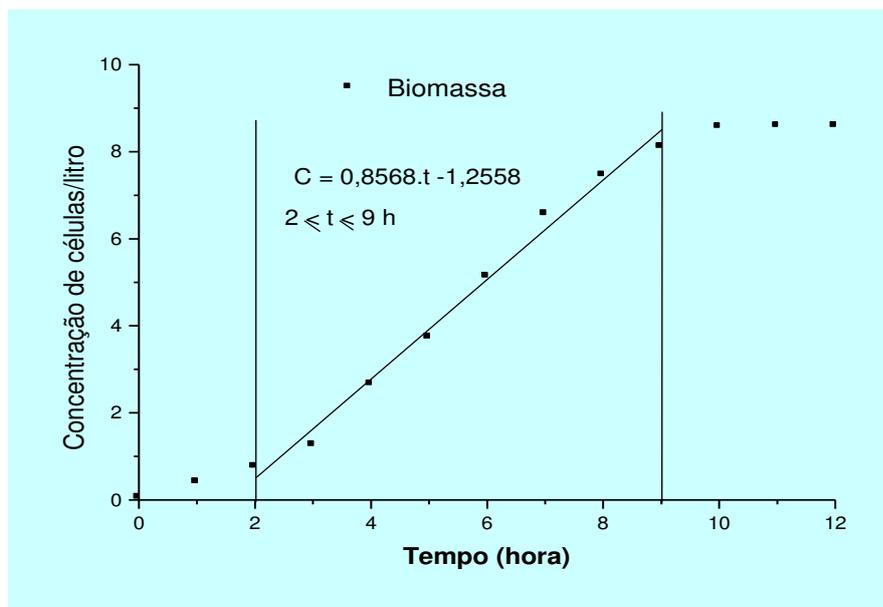
$$X = 2X_0 \quad \text{---} \rightarrow T_{dup} = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (9)$$

Na prática, esse tempo significa maior produtividade em células, porque a velocidade de crescimento celular aumenta à medida que diminui o tempo de duplicação, o que pode ser compreendido por meio da equação (9). Por outro lado, a produtividade está implícita na equação (8) que pode ser expressa por,  $\mu \cdot X = dX/dt$ , [g/litro.hora].

O crescimento microbiano foi avaliado em função da velocidade específica de crescimento celular em  $[h^{-1}]$ , que é um parâmetro importante para definir o processo de fermentação. O valor de  $\mu = \ln 2/t_d$  permitiu o cálculo do tempo de geração das leveduras que foi de 0,85 h.

No cultivo da levedura em caldo de algaroba, esse tempo ficou em torno de 48 minutos e 32,4 segundos, considerado positivo quando comparado com o tempo de duplicação das leveduras comerciais que está na faixa compreendida entre 1,0 e 1,5 hora, conforme MORETTI, (2006). Isto explica a afinidade desses microrganismos com o meio de cultivo pesquisado, razão porque se trata de um parâmetro de grande valor cinético para o cálculo do tempo de geração ou de duplicação da massa celular. A biomassa foi determinada em massa seca de células por unidade de volume.

Na Figura 19 se encontra a curva que representa o perfil cinético de produção de leveduras, expressa em concentração celular correspondente ao cultivo natural usando linhagens selvagens selecionadas.



**Figura 19.** Cinética do crescimento microbiano

A fase de redução de velocidade ou desaceleração do crescimento foi observado pela diminuição de substrato limitante e acúmulo de produto(s) no meio que ocorreu por volta de 10<sup>a</sup> hora de cultivo. A fase estacionária naturalmente foi observada pelo término do substrato limitante contido no caldo e a concentração celular constante em seu valor máximo.

#### 4.3.2 Produção de leveduras em Número de Células

As potencialidades biotecnológicas da algaroba ligadas aos seus nutrientes, sobretudo através das suas fontes de carbono e energia, mostraram que o caldo proveniente da vagem de algaroba é realmente um meio de crescimento alternativo, dada a sua importância em induzir naturalmente a formação de flora microbiana.

A presença de bactérias, leveduras e bolores no caldo culminou com a seleção e isolamento de leveduras selvagens que foram utilizadas em todos os cultivos, cujo desempenho foi avaliado nas diversas formas de condução do processo.

Foram analisados sucessivamente, o cultivo natural, isto é, isento de agitação e aeração, o cultivo com agitação, o cultivo com aeração e, o cultivo com agitação e aeração operando de forma simultânea. Estas operações, como se sabe, afetam diretamente o crescimento microbiano e proporcionam melhor eficiência de processos dessa natureza.

Para as condições iniciais de cultivo, foram quantificadas as células de leveduras correspondente ao inoculo como parte da população microbiana que inicia o processo de reprodução.

No cultivo natural, onde  $N_0 = 0,625$  e  $N = 37,12$  a velocidade média do crescimento microbiano foi de  $3,04 \times 10^{-9}$  céls./litro.hora. o que significa um bom desempenho no meio de cultivo pesquisado.

No cultivo com agitação, a população no instante inicial ( $N_0$ ) foi de 0,85 e no término da fermentação atingiu 43,15 permitindo assim, o cálculo da velocidade média de crescimento microbiano de  $3,52 \times 10^{-9}$  céls./litro.hora. Nesse cultivo, houve uma sensível melhora em relação ao cultivo natural. Já no cultivo com aeração, o crescimento iniciou com uma população ( $N_0$ ) de 1,21 chegando no final ( $N$ ) com uma população de 51,21 bilhões de células por litro.

Percebe-se que houve uma melhora expressiva em relação ao cultivo desenvolvido com agitação mecânica onde a velocidade média de crescimento celular foi de  $4,16 \times 10^{-9}$  céls./litro.hora. Porém, o cultivo conduzido com agitação e aeração, ao mesmo tempo, iniciou com uma população ( $N_0$ ) de 1,34 e chegou ao final ( $N$ ) com  $53,10 \times 10^{-9}$  céls./litro. Houve um ligeiro incremento da população microbiana em relação ao cultivo com aeração, chegando a uma velocidade média de crescimento da ordem de  $4,31 \times 10^{-9}$  céls./litro.hora.

Na Tabela 8 podem ser vistos os dados obtidos em relação ao crescimento populacional de leveduras, expresso em números de células  $\times 10^{-9}$ /litro ( $N$ ) nas quatro condições de cultivo adotadas neste trabalho. Esta tabela expressa o crescimento de leveduras selecionadas nas condições estabelecidas para o cultivo microbiano.

**Tabela 8** - Crescimento de leveduras selecionadas do caldo de algaroba

População microbiana de leveduras crescidas em caldo de algaroba ( $N^\circ$ de céls $\times 10^9$ /litro)				
Tempo (h)	Natural	C/Agitação	C/Aeração	Agitação/Aeração
0	0,625	0,85	1,21	1,34

1	0,85	1,96	2,10	2,25
2	1,68	3,76	3,21	3,78
3	3,58	5,65	5,45	8,91
4	5,84	9,35	13,10	14,86
5	8,23	14,85	20,21	21,35
6	12,75	21,41	27,31	28,82
7	15,80	27,43	34,91	36,84
8	19,87	32,50	41,86	43,68
9	25,90	38,90	45,85	47,45
10	31,47	41,85	47,75	49,97
11	35,86	42,88	50,87	51,89
12	37,12	43,15	51,21	53,10

Tanto no cultivo relacionado com a produção de biomassa quanto no cultivo em que foi avaliada a população de leveduras, foram usadas as linhagens selecionadas **ALG – 3**.

No cultivo natural, agitação e aeração ocorreram graças à atividade metabólica das células envolvidas no processo.

O cultivo natural iniciou com (So) 2,75% e chegou ao término da fermentação com (S) 0,52 de onde se observa que não houve consumo total de açúcares redutores. No cultivo desenvolvido com agitação, o substrato inicial na forma de A.R.T. (So) foi de 3,12 e finalizou com (S) 0,53 pontos percentuais, representando assim, os açúcares residuais. No cultivo com aeração, a concentração de açúcar inicial (So) foi de 2,85 chegando ao final com (S) 0,44 pontos percentuais.

E finalmente, o consumo no cultivo com as duas operações, agitação e aeração, de forma conjunta, iniciou com uma concentração de (So) 2,80 e no final da fermentação, este valor foi subtraído para 0,56 pontos percentuais. Observa-se que nesse e nos demais cultivos, os açúcares iniciais presentes no meio não foram totalmente consumidos.

Na Tabela 9 estão os dados relativos ao consumo de açúcares na forma de Açúcares Redutores Totais (A.R.T.) obtido nos cultivos desenvolvidos nas quatro formas de condução.

**Tabela 9** - Consumo de Açúcares Redutores Totais (%) referente ao cultivo de leveduras

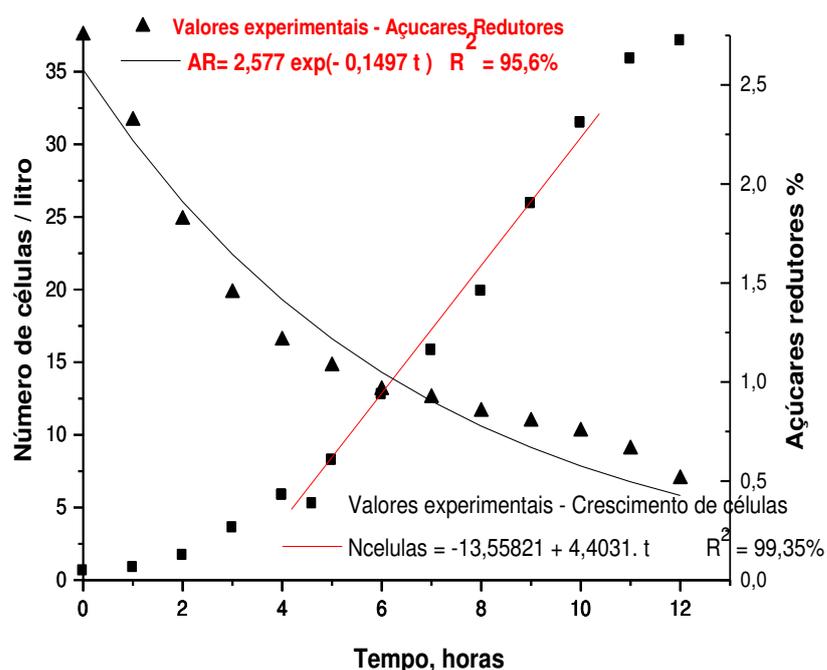
em caldo de algaroba

Tempo (h)	Natural	C/Agitação	C/Aeração	Agitação/Aeração
0	2,75	3,12	2,85	2,80
1	2,32	3,01	2,46	2,41
2	1,82	2,94	2,22	2,23
3	1,45	2,78	2,16	2,08
4	1,21	2,45	2,08	1,94
5	1,08	2,12	1,96	1,61
6	0,96	1,95	1,77	1,40
7	0,92	1,65	1,31	1,20
8	0,85	1,21	1,22	1,13
9	0,80	1,08	1,14	0,95
10	0,75	0,94	0,92	0,72
11	0,66	0,72	0,68	0,63
12	0,52	0,53	0,44	0,56

#### 4.3.2.1 Cinética de produção do fermento de algaroba - Cultivo natural

Com relação a esse processo de produção, foram atribuídas condições de cultivo similares aos processos tradicionais de produção de fermento como controle de pH, temperatura e concentração de substrato, este último na forma de açúcares redutores totais.

O crescimento, por meio de cultivo natural, foi levado a efeito sem agitação e sem aeração mecânicas. O crescimento ocorreu dentro das condições naturais, onde a produção em população microbiana alcançou 37 bilhões de células, produção considerada boa em função do meio natural utilizado. Vale ressaltar que a produção de fermento em caldo de algaroba não foi completamente isento de agitação, pois esta operação foi realizada manualmente em um intervalo de 4 horas. Essa população corresponde a uma biomassa com uma concentração de células de 8,50 g/litro visto que se trata de cultivo inteiramente associado com perfil populacional das leveduras. Na Figura 20 encontra-se a cinética de crescimento da levedura ALG 03 cultivada em meio natural, ou seja, no caldo de algaroba.



**Figura 20 - Cultivo Natural em caldo de algaroba.**

A etapa de maior produtividade ocorreu entre 4 e 10 horas em que se destaca a fase exponencial, cujo comportamento foi expresso em uma porção reta cujo coeficiente de determinação foi de 0,9935. Nesse cultivo, houve um consumo gradativo de açúcares redutores, no qual a cada hora, cerca de 0,1497 da massa de ART foi consumida.

Este valor corresponde à velocidade específica de consumo de substrato. O comportamento cinético relativo ao consumo de açúcar resultou em uma equação exponencial com um coeficiente de determinação de 0,956. Pode-se observar que o consumo de açúcares foi incompleto, o que obviamente se trata de açúcares não assimilados pelas leveduras presentes no meio (BRAZ et al. 1999).

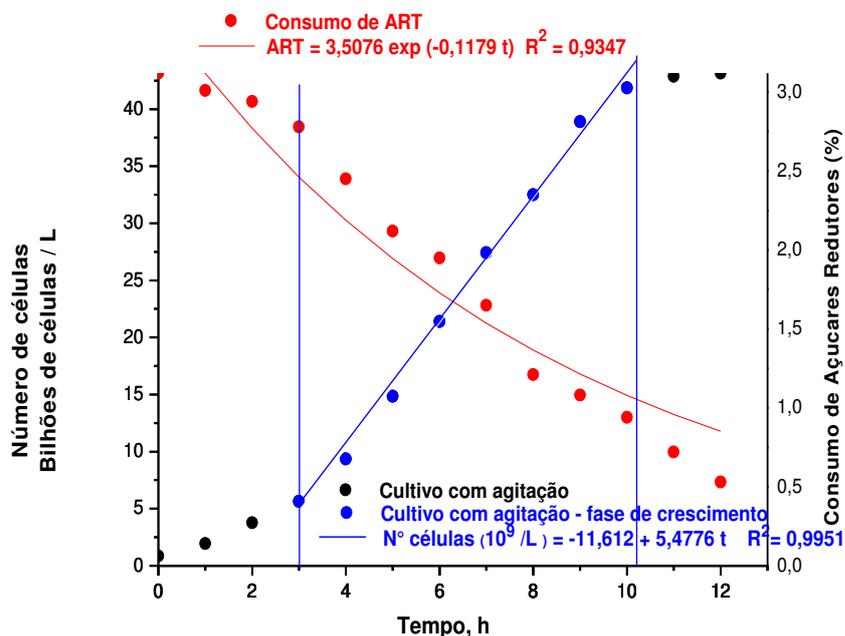
De acordo com a experiência industrial, uma população superior a 30 bilhões de células já recomenda o uso direto em processos de fermentação (LALUCE, 2004). Essa população é constituída do inóculo, que por sua vez, representa a suspensão de células necessária para garantir e dar partida ao processo de fermentação. Do ponto de vista técnico e científico, se pode deduzir que as leveduras selecionadas e isoladas crescidas no caldo de algaroba, são inteiramente viáveis.

#### **4.3.2.2 Cinética de produção do fermento biológico de algaroba - Com agitação**

O cultivo desenvolvido com agitação constante, forneceu dados que resultaram em um crescimento mais expressivo, visto que esta operação, na prática, tem algumas finalidades de caráter importante e que afetam diretamente o crescimento de microrganismos.

Observa-se na Figura 21 que o crescimento da população microbiana atingiu um valor bem mais elevado que o cultivo natural. As células chegaram a um quantitativo populacional de 43 bilhões de células por litro, o que já recomendaria este sistema para a produção de fermento. Essa população representa um aumento de 16,2% em relação ao cultivo natural, o que está associado cineticamente ao aumento do ângulo de inclinação da reta.

A fase de maior produtividade ocorreu entre 3 e 10h correspondente à fase exponencial, cujo comportamento gerou uma equação que representa um crescimento linear com coeficiente de determinação de 0,9951. Neste processo se observa uma sensível melhora em relação ao cultivo natural.



**Figura 21 - Cultivo em caldo de algaroba com agitação.**

Ainda na Figura 21, pode ser observado o consumo de açúcares redutores em função do tempo de produção de leveduras, aonde o açúcar redutor é consumido pela levedura em 12 horas chegando, depois deste período, a um valor residual de 0,5%. Isto significa dizer que o principal açúcar assimilado pelos microrganismos, no caso das leveduras selvagens, foi quase

que completamente desdobrado na formação do produto desejado, ou seja em fermento biológico.

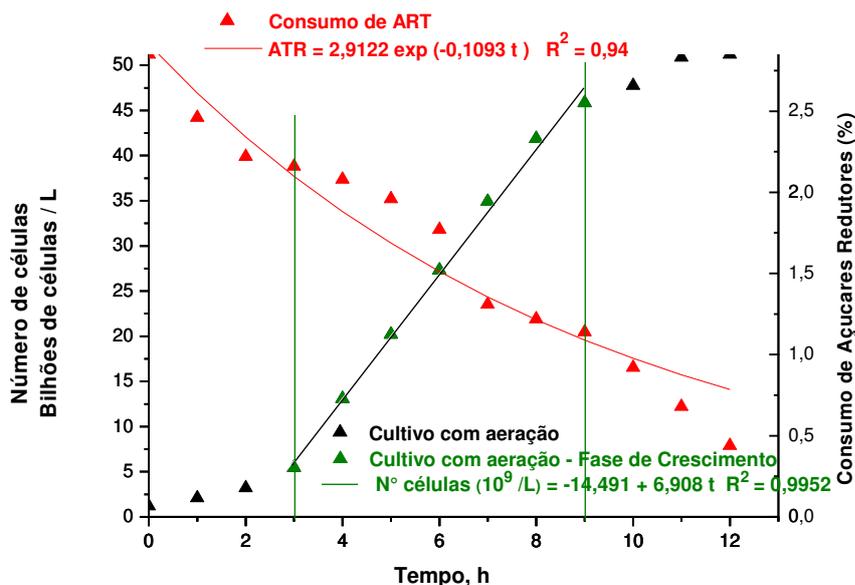
Neste cultivo em que foi usado agitação, a cada hora, o açúcar sofreu uma redução na proporção de 0,1179 da massa de A.R.T. que, por sua vez, corresponde a velocidade específica de consumo de substrato, o que define o desempenho das leveduras neste processo. Esta velocidade está diretamente ligada à atividade microbiana, segundo CONO (1990). Nesse cultivo, a equação que representa o consumo de ART teve um coeficiente de determinação de 0,9347, portanto, menor que no cultivo natural o que também indica que a equação não é satisfatória para representar os dados experimentais.

De acordo com OSZLANYL (1980) dentre as principais funções da agitação no processo de produção de fermento biológico destacam-se: uma melhor homogeneidade do meio; aumento as taxas de transferência de massa e energia tanto em nível intracelular como extracelular e a eliminação de agregados celulares que ficam incrustados nas partes internas do fermentador .

#### **4.3.2.3 Cinética de produção do fermento biológico de algaroba - Com aeração**

No processo de produção de fermento de algaroba com aeração, a velocidade de crescimento celular foi superior aos outros dois processos anteriores. A fase exponencial foi observada em um tempo mais curto.

No intervalo de 3 a 9 horas, a velocidade de crescimento celular foi maior do que o cultivo da levedura feita com agitação, o que significa dizer que houve influência da aeração neste processo. Na Figura 22, pode-se observar o processo de produção desenvolvido com leveduras selecionadas, em cultivo com aeração.



**Figura 22** – Cultivo de leveduras em caldo de algaroba com aeração.

Neste cultivo de fermento de algaroba desenvolvido com aeração, a população atingiu cerca de 51 bilhões de células, um aumento de 18,7% em relação ao cultivo realizado com agitação e de 37,9% em relação ao cultivo natural, o que corresponde a um aumento associado a angulação da reta. A equação linear que representa a fase de crescimento de 3 a 9 horas teve um coeficiente de determinação de 0,9952 o que implica em dizer que esta equação representa satisfatoriamente os dados experimentais.

Por outro lado, a velocidade específica de consumo de substrato, expressa pela tangente da curva, observa-se um perfil, onde o consumo de açúcar foi caindo em uma proporção de 0,1093 da massa disponível em A.R.T. especificamente na fase exponencial.

Nesse cultivo da levedura do caldo da algaroba, embora tenha apresentado um aspecto não muito uniforme da curva, houve também um razoável ajuste em relação aos dados experimentais, onde o coeficiente de determinação alcançou  $(R^2) = 0,940$ . O açúcar disponível no meio, mais uma vez, não foi consumido integralmente, o que indica a presença de outros açúcares como amido e dextrina que impedem o consumo total de açúcares. Estes componentes, em geral, se acham presentes nos meios naturais segundo MALDONADO et al. (1985).

O oxigênio teve participação fundamental nesse processo de acordo com as suas múltiplas funções, dentre as quais, destaca-se como acelerador do crescimento microbiano (FARIA et al. 2002). O oxigênio dissolvido tem a função específica de aumentar a velocidade de crescimento celular em função do aumento das taxas de oxigenação no meio. As células de leveduras, em geral, assimilam o oxigênio com o objetivo de exercer suas funções metabólicas por meio do processo de respiração.

Com aeração mecânica, observou-se um melhor desempenho das leveduras, tendo em vista que a injeção de ar supre a necessidade de oxigênio dissolvido que as células exigem para cumprir o seu mecanismo de metabolização. Nesse processo, especificamente, o suprimento de oxigênio é tido como um fator de ordem inteiramente física enquanto a demanda é um fator de ordem estritamente fisiológica. Uma taxa de aeração de 0,5 v.v.m. (volume de ar por volume de meio por minuto) foi suficiente para aumentar o número de células durante o processo de fermentação, razão pelo qual se atingiu uma população superior ao mesmo processo com agitação. A vazão volumétrica de ar também foi um parâmetro usado no cálculo da taxa de aeração que está relacionada com a velocidade do ar. Nesse cultivo, o ar foi alimentado por meio de uma tubulação de plástico de 0,5 cm de diâmetro, conectada a um mini-compressor. A taxa de aeração calculada resultou em uma concentração de 7 mg/litro de oxigênio dissolvido, quantidade ideal e necessária para atender a demanda relacionada com as atividades metabólicas das leveduras. Os cálculos foram efetuados tomando como base de cálculo as dimensões do fermentador utilizado.

$$V_{ar} = 85 \text{ cm/s} = Q_{ar}/A \quad A = 3,14 \times (0,5 \text{ cm})^2/4 \quad \text{-----} \rightarrow Q_{ar} = 85 \text{ cm/s} \cdot 0,19625 \text{ cm}^2$$

$$\text{Taxa de aeração: } Q_{ar}/V \quad \frac{[\text{Vazão volumétrica de ar}]}{[\text{Volume de meio. minuto}]} \quad (10)$$

$$Q_{ar}/V = \frac{1.000,8 \text{ cm}^3}{2.000,0 \text{ cm}^3 \cdot \text{minuto}} = 0,5 \text{ v.v.m.} [\text{Volume de ar por volume de meio por minuto}]$$

Implicitamente, essa taxa atende a equação usada para o cálculo do suprimento de ar representado na equação (4), que explica o balanço para o oxigênio, em regime permanente, e que equivale á demanda de células no processo de respiração. Essa taxa de aeração supriu o nível de oxigenação do meio, onde na prática, o oxigênio dissolvido

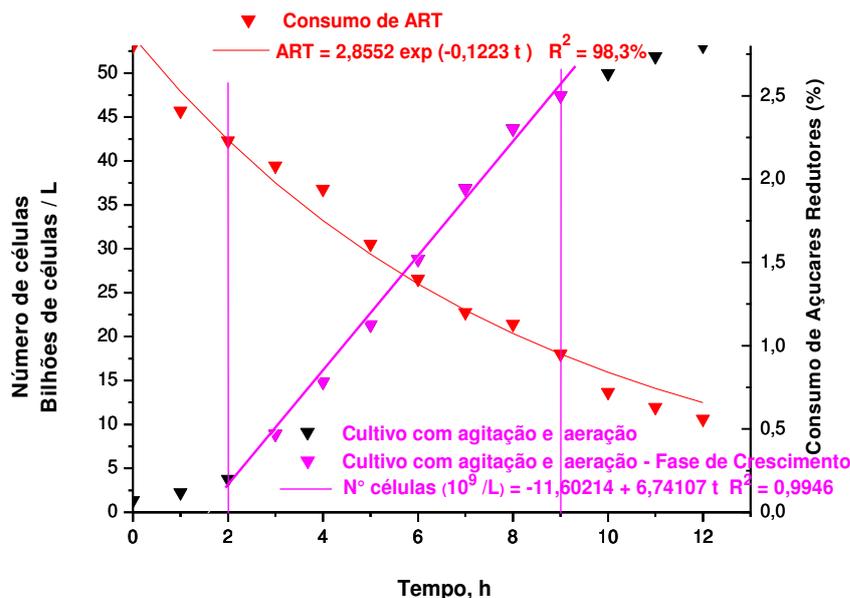
contribuiu para acelerar o crescimento das leveduras. Nessas condições, a população microbiana atingiu um valor dos mais recomendados para uso em processos de produção de leveduras. Portanto, o oxigênio é um dos parâmetros imprescindíveis quando se trata de produção de biomassa. O oxigênio dissolvido tem a função específica de aumentar a velocidade de crescimento celular em função do aumento das taxas de oxigenação no meio. A aeração tem como objetivo produzir bolhas, e estas, por sua vez, são subdivididas em bolhas minúsculas por meio da agitação mecânica, o que aumenta a área de interface facilitando assim, a transferência de massa e energia. As células de leveduras, em geral, assimilam o oxigênio com o objetivo de exercer suas funções metabólicas por meio do processo de respiração (POSIGATE 1981). O aspecto ascendente da curva atingiu um pico que demonstra a influência da aeração neste processo.

O principal papel dessa operação, foi fornecer oxigênio ao meio que é um dos elementos que contribuem diretamente para o aumento da massa celular e/ou população microbiana.

Ainda nesse cultivo, puderam ser observadas algumas características dessas leveduras como a floculação. Das culturas isoladas e identificadas geneticamente, algumas linhagens apresentaram floculação lenta enquanto outras, a floculação foi rápida, principalmente, quando conduzidas sob a influência dessa operação. Estas e outras características são observadas em determinados processos industriais quando são utilizados fermentos selecionados (CHAUD, 2006).

#### **4.3.2.4 Cinética de produção do fermento de algaroba - Com agitação e aeração.**

A Figura 23, apresenta o cultivo desenvolvido com agitação e aeração simultâneas.



**Figura 23 - Cultivo de leveduras com agitação e aeração**

O cultivo microbiano feito no caldo de algaroba com agitação e aeração de forma simultânea e constante mostrou um melhor desempenho do ponto de vista cinético e de produção onde no intervalo de 2 e 9 horas, pode-se observar a fase exponencial de crescimento da levedura. O crescimento microbiano foi de 53 bilhões de células sendo esta população de levedura maior do que todos os outros processos estudados. Isto demonstra a influência da agitação e aeração, nas condições de cultivo provocando um aumento da massa celular. Nesse cultivo, a fase exponencial começou na 2ª hora enquanto que no processo com aeração esta fase iniciou na 3ª hora, embora as produtividades estivessem próximas. Neste processo de cultivo com agitação e aeração houve um incremento de 3,7% em relação ao cultivo com aeração, de 23,05% em relação ao cultivo com agitação e de 43% em relação ao cultivo natural. Em relação ao cultivo com aeração, houve um aumento na inclinação da reta, o que reflete o pequeno aumento da população microbiana. A reta que representa a fase de crescimento das leveduras teve um coeficiente de determinação de 0,9946 que pode ser considerado como um resultado muito bom.

Neste processo de cultivo de levedura com caldo de algaroba, constatou-se que foram consumidos quase que todo substrato o que leva a entender que o principal açúcar foi bem assimilado no processo de desdobramento para a obtenção de fermento. O substrato inicial que foi da ordem de 2,8% ou 28g/litro de Açúcares Redutores Totais chegou ao final do processo com um decréscimo de 0,56% ou 5,6 g/litro de A.R.T. Esse consumo representa

uma redução de 80%. Na prática, esse consumo é considerado bom.

Os açúcares não foram completamente consumidos pelo fato do meio à base de algaroba conter outros carboidratos que interferem diretamente no processo, inibindo o crescimento das leveduras. Essas substâncias embora sejam importantes para outros processos, para produção de leveduras especificamente, não são aproveitadas (OTTO, 1985).

O consumo observado no cultivo com agitação e aeração diminuiu sensivelmente em função da atividade microbiana. A concentração de A.R.T. foi reduzida exponencialmente em uma proporção de 0,1223 a cada hora, valor este, atribuído à velocidade de consumo de substrato, que pode ser expresso pela equação  $y = 2,8552 e^{-0,1223t}$ .

Foi observado também um bom ajuste da equação aos dados experimentais para o cultivo com aeração, havendo pequeno acréscimo de 4,3%, onde nesse cultivo, o coeficiente de determinação foi de ( $R^2$ ) 0,983.

A influência dessas operações tem sido amplamente estudada nos sistemas de bio-produção, em especial, os processos de fermentação. (BORZANI, 1999). Sabe-se que essas operações exercem papel importante em processos de fermentação principalmente quando o objetivo é produzir microrganismos (BELLUCO, 2001). No cultivo com o uso dessas operações, foi observada uma alta produtividade.

A principal fase do processo demonstrou que com essas operações, usadas de forma simultânea, a velocidade de crescimento celular que é traduzida em produtividade foi igual a do cultivo com apenas aeração. Com uma velocidade de agitação de 250 r.p.m. e uma taxa de aeração de apenas 0,5 v.v.m. (volume de ar por volume de meio por minuto) que proporcionou uma concentração de oxigênio de 7,0 mg/litro, pôde-se perceber um aumento no crescimento das leveduras selvagens selecionadas do caldo de algaroba.

De acordo com o perfil apresentado, pode-se observar que houve maior produtividade em células de leveduras quando o processo foi conduzido simultaneamente com agitação e aeração mecânicas. Isto permite concluir que estas operações, quando usadas simultaneamente, proporcionam um aumento tanto de massa celular quanto da população, em número de células (WANG et al. 1997).

#### **4.3.2.5 Cinética representativa do cultivo global**

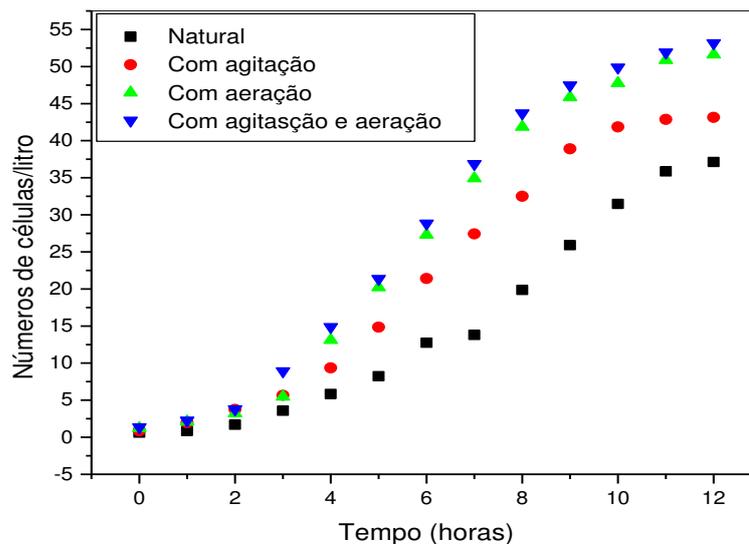
Em síntese, foram avaliadas e comparadas as diversas formas de cultivo em que o caldo de algaroba foi usado como meio de crescimento, assim como as linhagens de leveduras da própria vagem.

A partir do cultivo em que foi adotado agitação, já se observou um crescimento na população microbiana mais elevado. Com o emprego da aeração, operação considerada importante para o crescimento celular, dada a influência do oxigênio, houve como era de se esperar, uma produção de células bem maior.

Isto, na prática, é perfeitamente possível porque o oxigênio atua de diversas maneiras no metabolismo celular, exercendo de certa forma, uma aceleração do crescimento.

Os percentuais obtidos nos dois tipos de fermento serviram para avaliar a estabilidade das culturas de leveduras durante um certo período. Os tratamentos pós-fermentativos consistiram em separar as leveduras crescidas em caldo de algaroba por meio de separadoras centrífugas com o objetivo de obter o fermento úmido. A Figura 24 resume a cinética do crescimento de leveduras selvagens relativa às quatro formas de condução de cultivo desenvolvidas nesta pesquisa.

De acordo com o comportamento dos cultivos realizados, pode-se observar que houve maior produtividade em células de leveduras quando o processo foi conduzido simultaneamente com agitação e aeração mecânicas.



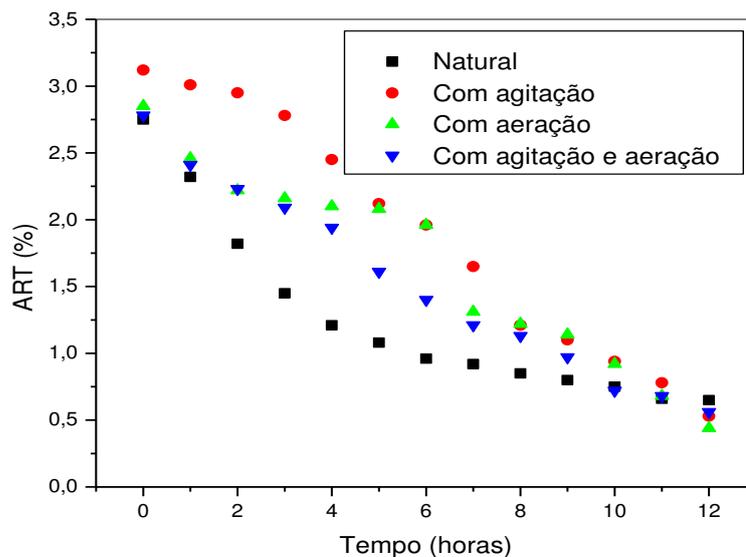
**Figura 24** – Cinética de crescimento dos cultivos realizados

Como se pode observar, o crescimento em que as operações de agitação e aeração foram dispensadas, ou seja, no cultivo natural, foi menos produtivo. Quando a agitação e aeração foram usadas de forma simultânea, foi observado que a população microbiana aumentou ainda mais, atingindo a maior produção dentre os cultivos realizados.

#### 4.3.2.6 Cinética representativa do consumo de Açúcares Redutores Totais

Como as quantidades iniciais de açúcares foram diferentes em todos os cultivos, obviamente, os percentuais de consumo também foram diferenciados. No cultivo natural, o consumo de A.R.T. sofreu uma queda gradativa ao longo da fermentação, onde uma pequena quantidade de açúcar residual ainda foi observada.

Na Figura 25 encontra-se a cinética de consumo do substrato, considerando como substrato os açúcares redutores totais. Preferencialmente, estes açúcares, são assimilados pelas leveduras para que elas possam efetuar, por meio de metabolismo, o desdobramento em produto(s).



**Figura 25** - Cinética de consumo de substrato nos cultivos usados

O maior consumo de açúcares foi de 81,5%. Esse consumo foi proporcional ao substrato inicial que apresentou a menor concentração em relação aos demais cultivos.

No cultivo de leveduras em que foi usada apenas agitação, foram consumidos praticamente 80% dos açúcares na forma de A.R.T. Os açúcares fermentescíveis permaneceram ainda no meio em quantidades residuais mínimas.

Nos processos em que somente a aeração foi posta em prática, pode-se observar a maior queda no que se refere ao consumo de açúcar onde esse consumo foi de 84,5%. A influência do oxigênio no processo de reprodução celular, evidentemente favoreceu o consumo de açúcares dentro da atuação desse elemento que, também funciona como substrato limitante. Isto mostra a influência que tem este elemento no processo de produção de leveduras, mais precisamente em aerobiose.

Observa-se também que nos processos em que foram adotadas agitação e aeração, o consumo de A.R.T. também foi de 80%. A quantidade de açúcar residual se aproximou daquela em que o cultivo foi operacionalizado com agitação.

Em resumo, a queda no consumo de açúcares ficou mais evidenciada no cultivo com aeração, embora em todos os cultivos tenha existido uma queda acentuada dos açúcares redutores. Também pode se observar que os açúcares redutores, durante os cultivos

realizados, não foram inteiramente consumidos, pelas razões explicadas anteriormente.

#### 4.4 Desempenho das linhagens selecionadas em caldo de cana de açúcar

As leveduras selecionadas e isoladas neste trabalho, foram testadas também em caldo de cana de açúcar procedente do Engenho São Paulo, com o propósito de avaliar o desempenho dessas novas linhagens na fermentação alcoólica, usando as mesmas faixas ótimas para o crescimento de leveduras para esse tipo de processo

Na Tabela 10 encontram-se os dados sobre a fermentação alcoólica com diferentes linhagens de leveduras selecionadas e isoladas de vagens da algarobeira e crescidas em caldo de cana de açúcar. Os Açúcares Redutores Totais (A.R.T.) foram determinados analiticamente e expressos em g/100 mL, o Etanol em graus Gay-Lussac, °GL (%vol./vol.) e a concentração celular em g/L (peso seco).

**Tabela 10.** Comportamento de diferentes linhagens de leveduras isoladas de vagens da algarobeira no caldo de cana de açúcar.

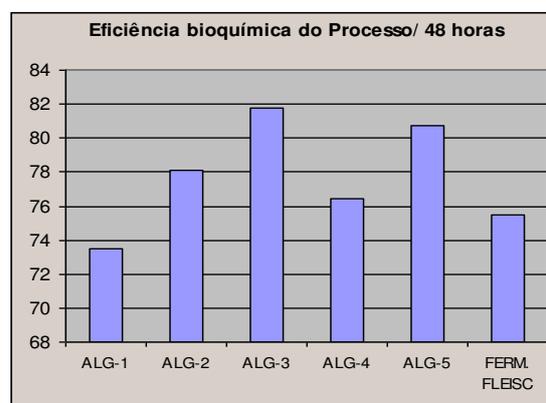
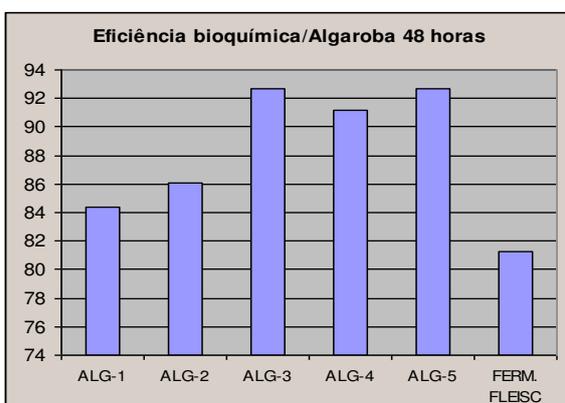
MONITORAMENTO DO CULTIVO		LINHAGENS					
		ALG-1	ALG-2	ALG-3	ALG-4	ALG-5	Fermento Fleischmann
MOSTO	<i>ART</i>	18,5	18,2	18,7	17,8	17,8	18,2
	<i>CONC. CELULAR</i>	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
	<i>pH</i>	5,2	5,3	5,2	5,3	5,3	5,3
MOSTO FERMENTADO POR 48 HORAS	<i>ART</i>	2,4	1,7	2,2	2,9	2,3	1,3
	<i>%ETANOL</i>	8,8	9,2	9,9	8,8	9,3	8,9
	<i>pH</i>	4,0	4,1	4,1	4,3	4,0	4,0
	<i>EFICIÊNCIA BIOQUÍMICA</i>	84,4	86,1	92,7	91,2	92,7	81,3
	<i>EFICIÊNCIA DO PROCESSO</i>	73,5	78,1	81,8	76,4	80,7	75,5
MOSTO FERMENTADO POR 72 HORAS	<i>ART</i>	0,4	0,6	0,2	0,7	0,3	1,1
	<i>%ETANOL</i>	9,6	9,9	10,5	10,2	9,6	9,4
	<i>pH</i>	4,1	4,2	4,1	4,3	4,1	4,0

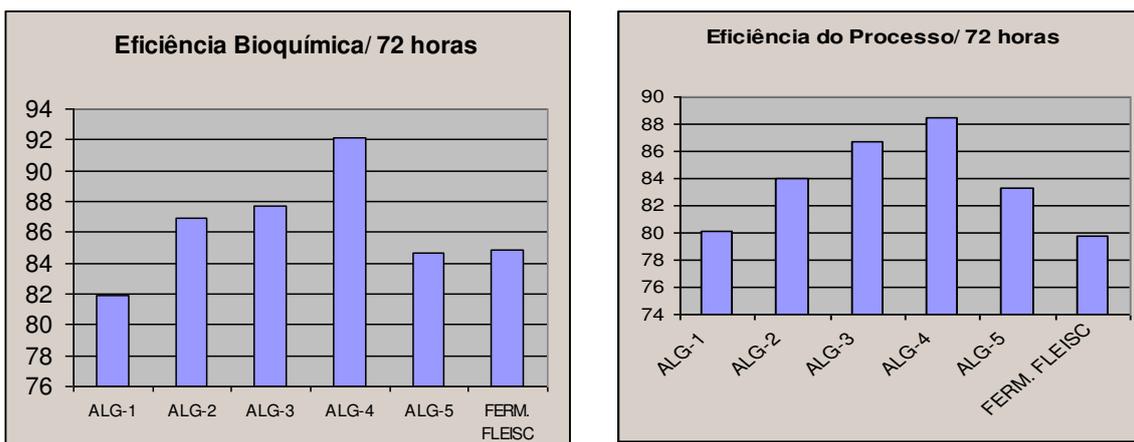
	<b>EFICIÊNCIA BIOQUÍMICA</b>	81,9	86,9	87,7	92,1	84,7	84,9
	<b>EFICIÊNCIA DO PROCESSO</b>	80,15	84,0	86,7	88,5	83,3	79,8

Levedura comercial testada: A levedura *Saccharomyces cerevisia*, (procedência Fleishamn & Royal Ltda; Itaiquara S/A; Mauri, Brasil).

Esses experimentos foram desenvolvidos com o objetivo de realizar estudos comparativos com o fermento usado na fermentação alcoólica tradicional que utiliza caldo de cana-de-açúcar como meio de crescimento e de produção de álcool ao mesmo tempo.

As linhagens ALG-1; ALG-2; ALG-3; ALG-4 e ALG-5 foram isoladas do material previamente preparado (tubos, placa e outros recipientes) e quando testadas em caldo de cana apresentaram excelentes resultados, o que ficou comprovado de acordo com o cálculo das respectivas eficiências e rendimentos do processo de fermentação. Dentre as linhagens selecionadas, observa-se que as leveduras denominadas ALG-3 e ALG-4 foram as que mais se destacaram, inclusive superando bem, a levedura de panificação, comercialmente conhecida como Fermento Fleischmann. Estas linhagens tiveram bom desempenho usando caldo de cana-de-açúcar como meio de fermentação. Os experimentos desenvolvidos com este mio natural, foram conduzidos dentro das condições de cultivo do processo de fermentação tradicional. Apenas, a temperatura foi mantida em 28°C, ou seja, na temperatura ambiente. Na Figura 26 encontra-se o desempenho das linhagens de leveduras selecionadas e cultivadas em caldo de cana.





**Figura 26** - Desempenho das principais linhagens de leveduras selvagens selecionadas e isoladas do caldo de algaroba.

As ilustrações relativas à seqüência dos gráficos acima registram as eficiências e os rendimentos das leveduras selvagens selecionadas e isoladas da vagem da algarobeira, onde se destacam as linhagens ALG-3 e ALG-4, o que certamente, podem ser recomendadas para uso direto nos processos de fermentação alcoólica.

A eficiência dos processos fermentativos depende, entre outros fatores, da qualidade do microrganismo do processo. No caso da fermentação alcoólica, este problema é um pouco mais crítico, pois se trata de um processo de cultura mista. A flora microbiana, constituída principalmente de leveduras e bactérias, é função de muitos fatores, dentre os quais, as características funcionais e dominantes dos microrganismos e a qualidade da cepa ou linhagem.

## 4.5 Cinéticas de congelamento e secagem do fermento biológico

### 4.5.1 Cinética de congelamento

O fermento produzido foi previamente congelado como parte do processo de liofilização. Para a avaliação da cinética de congelamento foram consideradas 03 (três) temperaturas:  $-40^{\circ}\text{C}$ ,  $-170^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ .

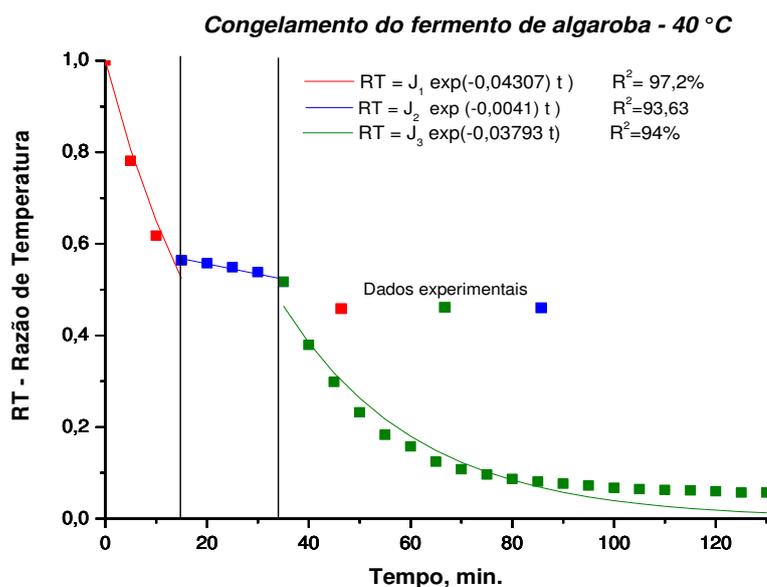
#### 4.5.1.1 Congelamento a temperatura de $-40^{\circ}\text{C}$

Como o fermento biológico contém um teor de água acima de 70% de base úmida, o

comportamento do fermento de algaroba deve ser semelhante ao comportamento da água.

Nesse congelamento, o produto foi submetido a uma temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , embora alguns autores como HICKEY (1980) recomendam para uma boa estabilidade celular o uso de ultra-congelador com temperatura controlada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nessa temperatura, pode-se observar as três fases que envolvem o processo de congelamento da água. O perfil cinético apresentado mostra que, houve uma fase de resfriamento que durou 14 minutos. Dos 14 aos 36 minutos existe a segunda fase onde se configura a cristalização da água, que equivale ao produto ir de uma temperatura de  $0\text{ (Zero)}\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A partir deste ponto ocorre a fase de pós-congelamento que depois de 120 minutos atinge a temperatura de  $-36,2\text{ }^{\circ}\text{C}$  já próxima do equilíbrio. Na Figura 27 encontra-se a cinética de congelamento a uma temperatura de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 27** – Congelamento do fermento de algaroba -  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$

Na Tabela 10 estão os dados dos parâmetros físicos referentes às 3 fases de congelamento do fermento de algaroba. O “J” é um parâmetro físico que representa o fator de atraso do processo de resfriamento. O parâmetro “k” corresponde a um valor que envolve o coeficiente de transferência de calor, conjuntamente com as dimensões da partícula e  $R^2$ , o coeficiente de determinação. Na Tabela 11 constata-se que os coeficiente de correlação variaram de 0,93 a 0,97 o que corresponde a uma equação que representa razoavelmente o fenômeno físico, mas não se pode dizer que esta equação seja satisfatória. Contudo há que se observar que o ajuste

só foi feito para o primeiro termo da série.

**Tabela 11 - Fases de congelamento do fermento a temperatura de – 40°C**

Fases de congelamento do fermento de algaroba a temperatura de – 40°C			
Parâmetros físicos	Resfriamento	Congelamento	Pós-congelamento
J	1,0000	0,603735	1,75155
k	- 0,04307	- 0,0041	-0,03793
R <sup>2</sup>	0,972	0,9363	0,940

De acordo com HICKEY (1980) a boa viabilidade celular pode ser mantida utilizando-se o gelo seco que corresponde a uma temperatura de - 78° C. O congelamento em ultra-congelador a essa temperatura, provoca a indução da dormência do microrganismo, assim como os processos que utilizam temperaturas bem mais baixas. Depois de processadas a essa temperatura, as células podem ser reativadas a qualquer momento para uso direto nos sistemas biológicos de produção (RIBEIRO, 1999).

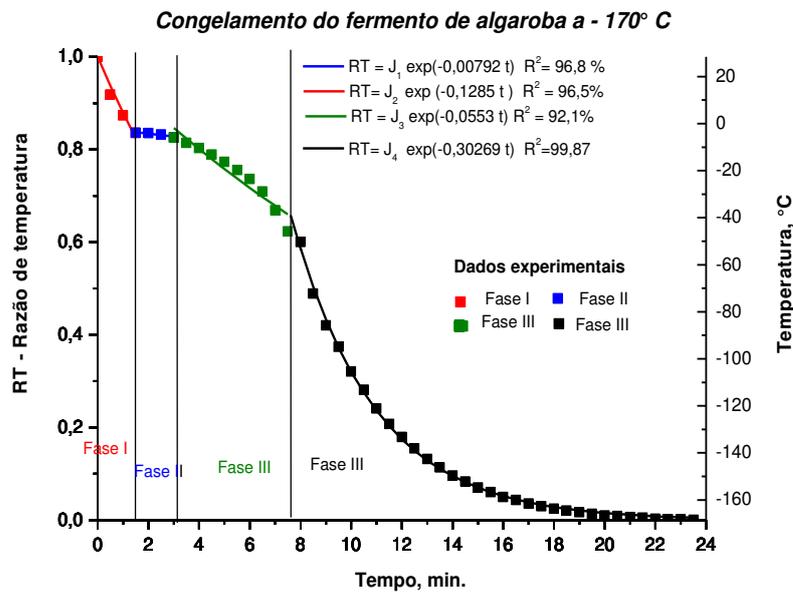
Segundo SETTE (2003) para efeito de preservação de microrganismos, especialmente leveduras, costuma-se usar agentes crioprotetores como o dimetilsufóxido a 10% ou glicerol a 10% ou com concentração um pouco maior para melhorar as condições de estocagem.

Embora, as destilarias obtenham resultados considerados bons, usando congelamento a temperaturas mais baixas, trabalho publicado por SCHUCH (2005) mostra que a temperatura de congelamento ideal para se obter uma boa viabilidade celular são temperaturas inferiores a - 80°C. Ainda assim, para se ter uma maior confiabilidade, fez-se necessário a aplicação de técnicas de conservação mais aprimoradas como a liofilização.

#### **4.5.1.2. Congelamento a temperatura de – 170°C**

A cinética de congelamento a -170 °C pode ser vista na Figura 28, onde se observa as duas primeiras fases, de resfriamento e congelamento, que foram muito rápidas. A terceira fase de pós-congelamento, não apresenta um só comportamento. A fase de resfriamento ocorreu em pouco tempo, aonde a temperatura chegou aos – 3,2 °C em 1,5 minutos. A fase intermediária (cristalização) durou pouco mais de 3 minutos e a partir deste instante, o

processo passou para a fase de pós-congelamento. Pode-se observar ainda que, nessa fase de pós-congelamento, o comportamento cinético pode ser expresso em dois períodos. No primeiro período, pode se constatar um decréscimo da temperatura que apresenta uma concavidade para cima (convexa) e no segundo, o decréscimo de temperatura corresponde a uma concavidade para baixo (côncava). Portanto, esta fase de pós-congelamento foi dividida em dois períodos. O pós-congelamento, até atingir a temperatura próxima a de equilíbrio levou cerca de 23 minutos.



**Figura 28** - Congelamento do Fermento de Algaroba a - 170° C

Na Tabela 12, acham-se os parâmetros físicos relacionados com as fases de congelamento a temperatura de -170°C. As fases de resfriamento e de cristalização foram muito rápidas e a fase de pós-congelamento, foi dividida em duas etapas. É fácil observar nesta fase de pós-congelamento, que a equação proposta representa satisfatoriamente os dados experimentais correspondente à fase final da curva de pós-congelamento (côncava). O coeficiente de determinação para este trecho do período de pós-congelamento foi de 99,87%.

**Tabela 12** - Fases de congelamento do fermento de algaroba a temperatura de - 170°

Fases de congelamento do fermento de algaroba a temperatura de - 170°C				
Parâmetros físicos	Resfriamento	Congelamento	Pós-congelamento	
			1ª Fase	2ª fase
J	1,0000	0,847313	0,999343	6,60603
k	- 0,1285	- 0,00792	- 0,0553	- 0,30269

$R^2$	0,965	0,968	0,921	0,9987
-------	-------	-------	-------	--------

O nitrogênio líquido é um elemento recomendado na crioconservação de microrganismos. Células de leveduras congeladas a essa temperatura apresentam índice de viabilidade variável tendo em vista que grande parte das leveduras são muito sensíveis a baixas temperaturas e acabam não resistindo.

O principio do uso do nitrogênio também leva a indução do processo de dormência do microrganismo. Dentre as vantagens desse processo, destacam-se: condições de estabilidade por longos períodos, estabilidade da cultura, o que pode evitar contaminação e quanto a sua utilização que pode ser instantânea (PODLECH, 1996).

Trabalhos envolvendo preservação de leveduras por liofilização mostram que além da temperatura de congelamento, o produto deve ser mantido preferencialmente em ambiente estéril segundo MORITZ, (1980).

#### **4.5.1.3 Congelamento a temperatura de – 196°C**

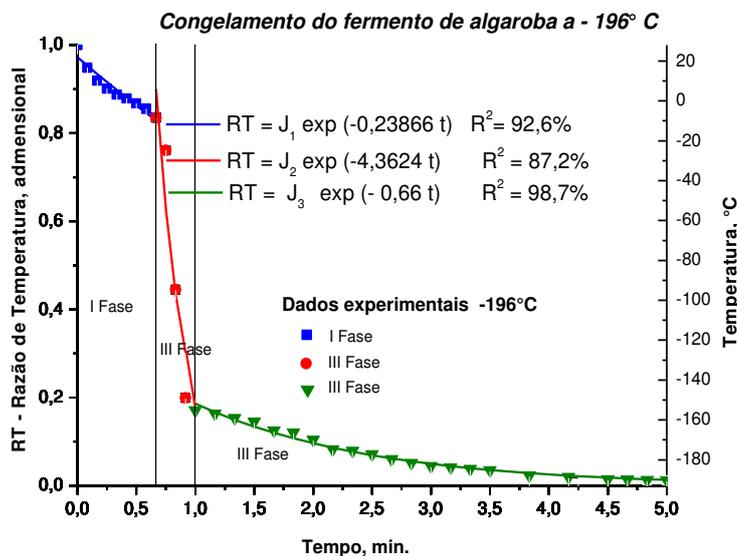
O fermento biológico foi congelado em nitrogênio líquido o que permitiu constatar uma velocidade de congelamento bem mais rápida. Nesse congelamento, observa-se que as fases de resfriamento e cristalização são muito rápidas e não foi percebida sua distinção.

Observa-se a esta temperatura dois momentos; um a partir do instante em que a amostra foi submetida ao nitrogênio líquido durando 0,7 do minuto, e outro, referente ao tempo de permanência do fermento na fase de pós-congelamento. Nesta fase, no entanto observa-se uma queda de temperatura muito brusca, podendo ser observado a existência de duas etapas de pós-congelamento.

O congelamento do fermento a temperatura de -196°C foi bem mais rápida que no processo anterior, o que também era de se esperar, pois o processo de transferência de calor é mais rápido quando em contato com o líquido do que com o gás.

A Figura 29 apresenta a cinética de congelamento a – 196 °C. A amostra que, inicialmente, estava a uma temperatura de 25,8 °C, em frações de minutos, entrou na fase de pós-

congelamento. A fase de resfriamento e cristalização do fermento foi de 42 segundos e o comportamento cinético não permite distinguir essas duas fases. No entanto, o período de pós-congelamento pode ser observado em 2 fases. A primeira, onde existe uma queda muito brusca da temperatura que durou 18 segundos e a segunda fase, que durou apenas 4 minutos, quando o processo de congelamento tende a se estabilizar a  $-194^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 29** - Congelamento do Fermento de Algaroba a  $-196^{\circ}\text{C}$

Segundo LOPES (2005), no caso de conservação de microrganismos, particularmente de leveduras, alguns fatores devem ser considerados como: idade da cultura, concentração celular, tipo de agente crio-protetor utilizado, condições de estocagem e método de descongelamento.

Observando-se o comportamento cinético do congelamento da levedura de algaroba ALG 03 a  $-196^{\circ}\text{C}$ , constata-se que o melhor ajuste da equação foi obtido na 2ª etapa da fase de pós-congelamento, cujos coeficientes de determinação foi de 98,7%. A fase de resfriamento/congelamento foi de 92,6% e a 1ª etapa da fase de pós-resfriamento foi de 87,2%. Na fase de resfriamento, o valor de J correspondente ao fator de atraso, que neste caso foi de 0,972263 que é um valor próximo de um. No entanto o ideal deste processo de congelamento seria obter o valor de 1, contudo vários autores tem encontrado valores de J muito próximos de 1, alguns um pouco baixo de 1 e outros um pouco acima de 1. Esses autores justificam o fator de atraso com o tempo necessário para que o material que está sendo resfriado ou congelado absorva a temperatura do meio e comece a se fazer presente no corpo

onde se está medindo a alteração de sua temperatura (CAVALCANTI MATA, 2004). Na Tabela 13 são encontrados os parâmetros físicos relacionados com as fases deste processo.

Tabela 13 – Fases de congelamento do fermento a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$

<b>Fases de congelamento do fermento de algaroba a uma temperatura de <math>-196^{\circ}\text{C}</math></b>			
Parâmetros físicos	Resfriamento/Congelamento	Pós-congelamento	
		1ª etapa	2ª etapa
J	0,972263	16,4893	0,3611
K	- 0,23866	- 4,3624	- 0,66
R <sup>2</sup>	0,926	0,872	0,987

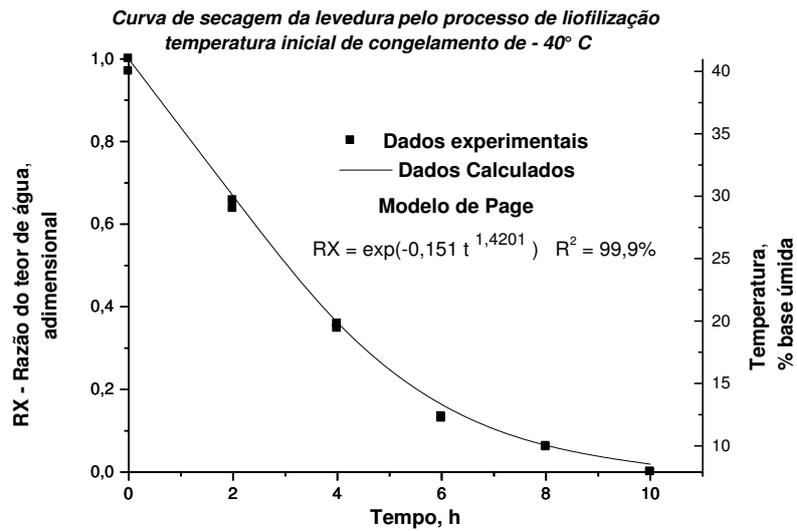
Na prática, o congelamento a  $-196^{\circ}\text{C}$ , apresenta vantagem em relação a muitas espécies que não sobrevivem a essa temperatura, embora seja um processo que exige mão de obra especializada. Em compensação, as leveduras expostas a essa temperatura, apresentam viabilidade em função da sua termorresistividade. Este é um dado importante, usado para selecionar novas cepas ou linhagens criófilas, isto é, as que resistem bem a baixas temperaturas ao contrário daquelas que não resistem segundo COLUCCI (2007). De acordo com BARBOSA et al. (2007) o uso de nitrogênio líquido induz à dormência total das células de leveduras permitindo que as mesmas sejam reativadas depois de um tempo de descongelamento. Nessa situação, corre-se o risco de afetar a membrana celular, por isso, o processo de descongelamento tem que ser feito dentro dos princípios da microbiologia.

#### **4.5.2 Secagem do fermento por liofilização**

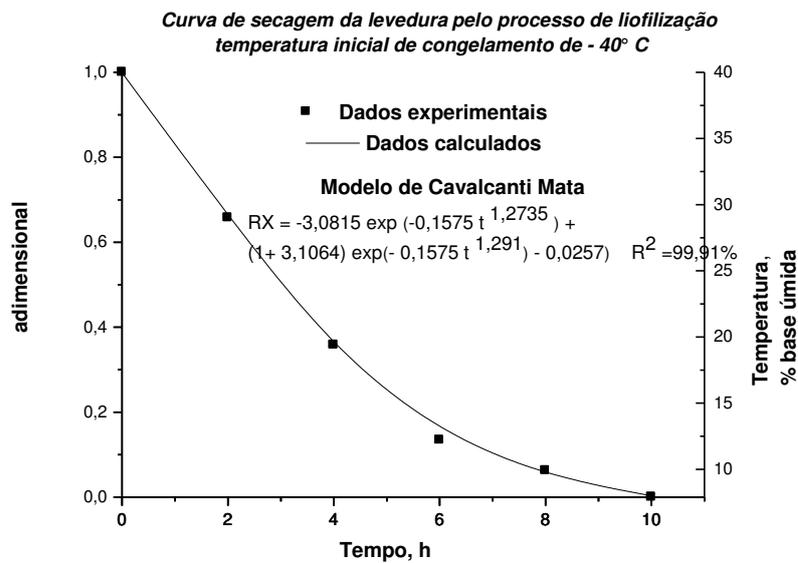
O teor de umidade é um parâmetro importante, pois, se este não estiver dentro das faixas permissíveis de padronização, poderá comprometer o produto, facilitando assim, o processo de decomposição, segundo PARK (2007), daí a importância da liofilização.

##### **4.5.2.1 Liofilização do fermento as temperaturas de $-40$ , $-170$ e $-196^{\circ}\text{C}$ .**

Nas Figuras 30-a e 30-b, 31-a e 31-b, 32-a e 32-b podem ser observadas as cinéticas de secagem por liofilização e os respectivos modelos estudados para as temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$ ,  $-170^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

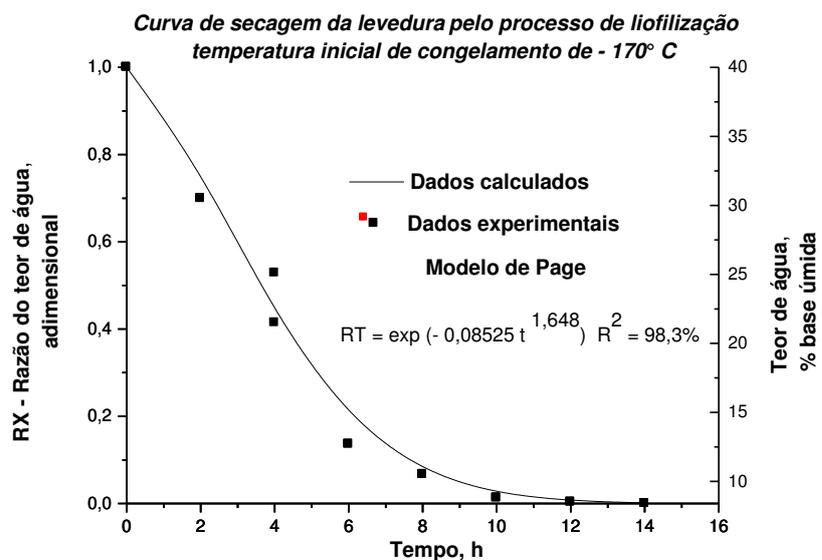


**Figura 30-a** Secagem do fermento por liofilização congelado a -40° C

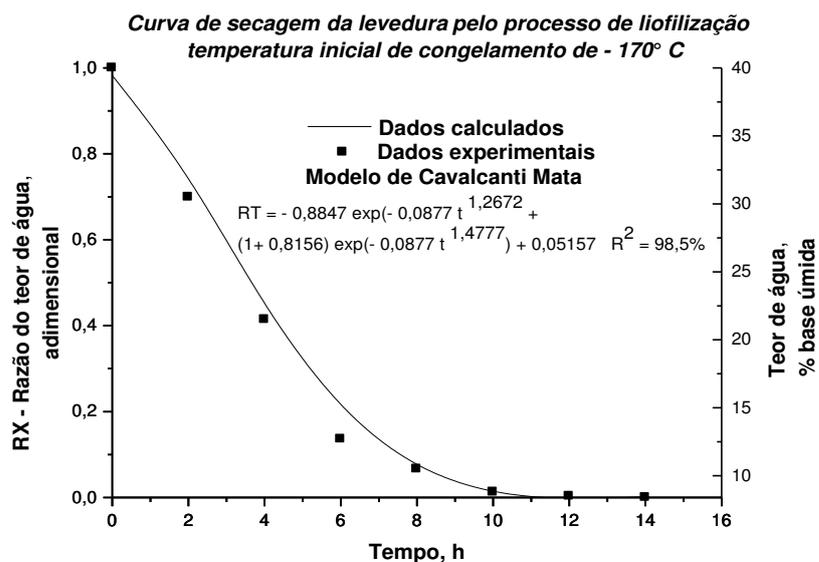


**Figura 30-b** Secagem do fermento por liofilização congelado a -40° C.

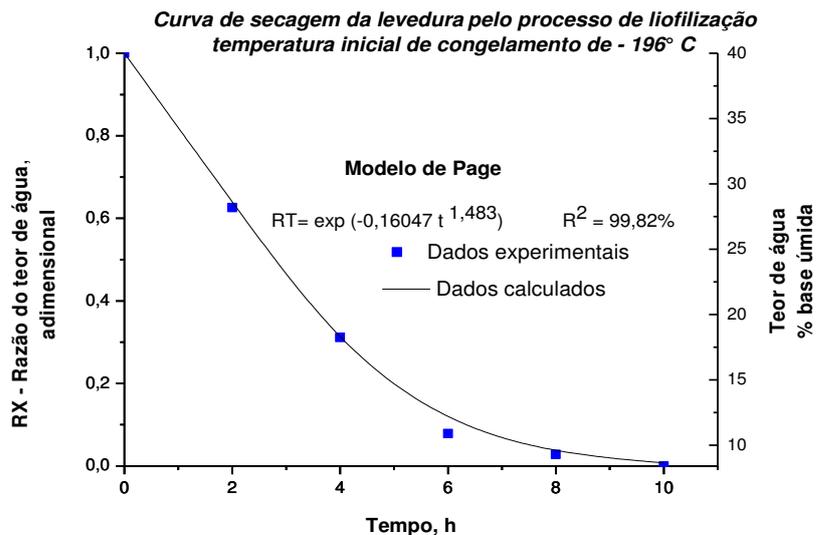
Foram estudados dois modelos: o Modelo de Page e o de Cavalcanti Mata para representar os dados experimentais do processo de secagem. Esses modelos permitiram avaliar melhor a secagem do fermento por liofilização, uma vez que a desidratação desse produto é uma das operações que visam atender às exigências de qualidade para efeito de comercialização.



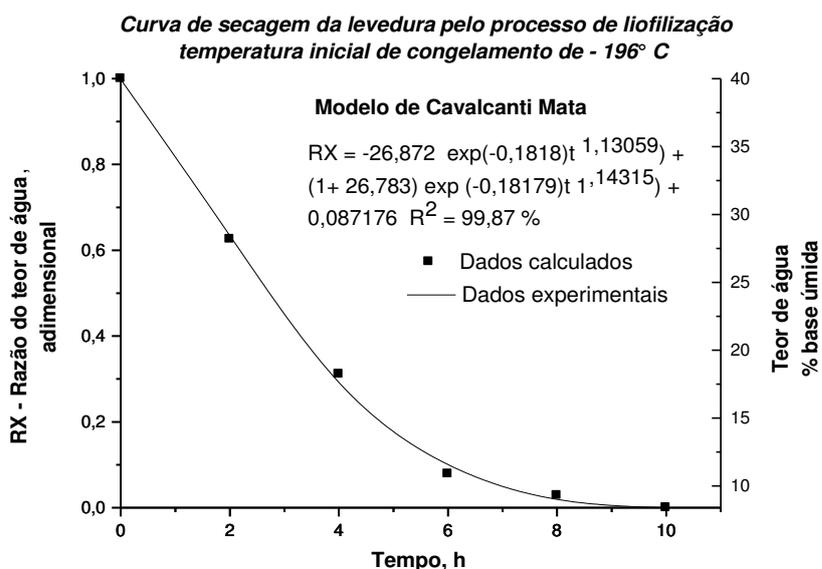
**Figura 31-a** - Secagem do fermento por liofilização congelado a - 170° C.



**Figura 31-b** – Secagem do fermento por liofilização congelado a - 170° C.



**Figura 32-a** Secagem do fermento por liofilização congelado a - 196° C.



**Figura 32-b** – Secagem do fermento por liofilização congelado a - 196° C.

Na Tabela 14 são encontrados os valores dos parâmetros físicos relacionados com os modelos estudados para o processo de secagem do fermento por liofilização. Esses parâmetros se constituíram em fundamentos importantes para o estudo dos Modêlos aplicados.

**Tabela 14** – Coeficientes dos Modelos de Page e Cavalcanti Mata do processo de secagem por liofilização.

MODELO	Temperatura (°C)	Parâmetro K	η	R <sup>2</sup>
--------	---------------------	----------------	---	----------------

PAGE	- 40	-0,1510	1,4201	0,9990
	- 170	-0,08525	1,6480	0,9830
	- 196	-0,16047	1,4830	0,9982
CAVALCANTI MATA	- 40	-0,1575	1,2735	0,9991
	-170	-0,0877	1,2672	0,9850
	-196	-0,1818	1,1306	0,9987

Nesse processo de secagem, o K expressa o coeficiente de secagem, que representa a rapidez com que o produto é seco, ou seja, quanto maior for o coeficiente, em número absoluto, mais rápido se dá a secagem.

No entanto, observa-se que para os valores de K e de  $\eta$  para as leveduras nas temperaturas iniciais de  $-40$  e  $-196^{\circ}\text{C}$  no processo de secagem por liofilização são muito próximos, onde o processo de secagem ocorre em 10 horas, indicando que essas temperaturas não influenciam no tempo de secagem.

Como pode ser observado nas Figuras 30-a e 30-b, na temperatura de  $-170^{\circ}\text{C}$ , existem mais dois pontos já no nível de estabilidade do processo que modificaram os valores de K e N. Contudo se nesse processo, fosse considerado o término da secagem em 10 horas, provavelmente os valores de K e  $\eta$  da Equação de Page estariam próximos aos valores observados no processo de liofilização as temperaturas de  $-40$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **1. Secagem do fermento por liofilização congelado a temperatura de $-40^{\circ}\text{C}$**

De acordo com os resultados obtidos experimentalmente, o Modelo de Page assim como o Modelo de Cavalcanti Mata apresentam um coeficiente de determinação superior a 0,99 o que significa dizer que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais e que expressam satisfatoriamente o processo de secagem por liofilização a temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$ .

O modelo de Page que é uma simplificação do modelo de Fick e tem sido sugerida para secagem de produtos agrícolas (PARK et al. 2007), onde nada impede que o fermento seja incluso nesse processo.

A liofilização do fermento nessa temperatura foi suficiente para diminuir de forma

expressiva a massa de água do fermento de algaroba, chegando a reduzir até 76 % da massa original. A secagem do fermento por liofilização quando este foi submetido a um congelamento prévio de  $-40^{\circ}\text{C}$  ocorreu em 10 horas.

O coeficiente de determinação para o Modelo de Page especificamente, para essa temperatura foi de ( $R^2$ ) 0,9990 enquanto o de Cavalcanti Mata foi de 0,9991 portanto, o modelo proposto por Cavalcanti Mata mostrou uma pequena diferença no coeficiente de determinação observando-se um pequeno incremento no coeficiente que ocorre na quarta casa decimal, implicando em dizer que esses modelos propostos se equivalem.

## **2. Secagem do fermento por liofilização congelado a temperatura de $-170^{\circ}\text{C}$**

O modelo de Page, mais uma vez, ajustou-se de forma expressiva aos dados da secagem por liofilização para a levedura com temperatura inicial de  $-170^{\circ}\text{C}$ . O coeficiente de determinação foi 0,983. O modelo de **Cavalcanti Mata** apresentou um pequeno incremento no coeficiente de determinação, alcançando 0,985 que pode considerado praticamente, igual ao modelo de **Page**.

Sabe-se que a liofilização quando processada com temperatura de congelamento superior a  $-100^{\circ}\text{C}$  aumenta a vida útil dos alimentos e principalmente microrganismos, por alguns anos.

O teor de água alcançado no produto final foi de 7,84 % que também se encontra dentro da faixa com que é comercializado o fermento. Remover a água do fermento ou de qualquer outro produto, principalmente alimento, significa longo período de estabilidade e de conservação. Nesse caso, a água é uma substancia importante, pois quando ela se acha presente, a ação de microrganismos como as bactérias pode favorecer a sua decomposição. Além disso, as enzimas naturais podem reagir com o oxigênio provocando efeitos indesejáveis ( MARIANO, 2006).

## **3. Secagem do fermento por liofilização congelado a temperatura de $-196^{\circ}\text{C}$**

Em relação aos modelos propostos, o de Page apresentou um excelente ajuste onde o coeficiente de determinação foi 0,9982 enquanto o modelo de Cavalcanti Mata esse coeficiente chegou a ( $R^2$ ) 0,9987. Em resumo, os modelos usados para secagem do fermento

se ajustaram muito bem aos dados experimentais da pesquisa. Cabe ressaltar que como as diferenças existentes entre os modelos foi muito pequena e esta na quarta casa decimal em favor do modelo proposto por Cavalcanti Mata, para todos os processos de secagem, pode-se concluir que esses modelos são equivalentes.

#### 4.6 Viabilidade celular do fermento produzido

Dentre as vantagens da liofilização podem se destacar: vedação total do produto, longa viabilidade, estabilidade elevada em muitas espécies, produção em larga escala, não requer armazenamento especial apenas o abrigo da luz, além permitir que o produto tenha uma fácil distribuição e um custo de transporte reduzido.

Este processo permite garantir uma maior sobrevivência, estabilidade e pureza microbiana. Em presença de água elas se re-hidratam e, se houver nutrientes, passam a se multiplicar. Perdem pouca atividade biológica durante anos de estocagem. A liofilização tende a danificar menos o tecido que está sendo desidratado do que outros métodos da desidratação, que envolvem temperaturas mais altas.

A secagem por liofilização, neste trabalho, foi usada tanto para avaliar a estabilidade das células como para o uso de estudos cinéticos como acima descritos. No processo de liofilização utilizaram-se na operação de congelamento as temperaturas de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  que serviram para identificar qual a forma de congelamento ideal para o fermento de algaroba obtido. Na Tabela 15 encontra-se o resultado da viabilidade do fermento de algaroba atribuída as temperaturas utilizadas no processo de secagem por liofilização.

**Tabela 15** – Viabilidade do fermento liofilizado em relação nas três temperaturas pesquisadas neste trabalho

	Fermento liofilizado	
	Viabilidade celular (%)	Redução (%)
$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	95,15	0,45
$-170\text{ }^{\circ}\text{C}$	26,5	72,15
$-196\text{ }^{\circ}\text{C}$	21,8	77,10

A viabilidade celular do fermento liofilizado não foi a que se esperava principalmente para as temperaturas de  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por alguma razão, houve uma redução expressiva da

população microbiana. Portanto, diante dos experimentos realizados com as operações de congelamento e secagem, para efeito de preservação, ficou comprovado que o congelamento a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  foi o mais recomendável para a preservação da viabilidade celular e dos demais componentes do fermento de algaroba. Nessa temperatura, o fermento alcançou uma viabilidade de **95,15%** de células viáveis, o que representa um grau de pureza dentro dos padrões recomendados.

Isto mostra que esses microrganismos (leveduras) são altamente sensíveis a temperaturas muito baixas, permanecendo apenas os mais resistentes. Na temperatura de  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as células viáveis atingiram um nível de resistência térmica onde a população microbiana atingiu somente **26,5%**, percentual considerado baixo, mas ainda dentro da faixa de valores encontrada na literatura (PODLECH et al. 1996). Isto explica o nível de sobrevivência das leveduras quando expostas a essa temperatura.

Vale acrescentar que a perda em massa do fermento foi menor, embora parte dela, seja aproveitável. E por último, quando a temperatura foi de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a viabilidade celular atingiu o menor percentual, chegando a **21,8%**. Mais uma vez, ficou comprovado que boa parte das leveduras não resiste a temperaturas abaixo de  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Da mesma forma que as leveduras são destruídas termicamente no processo de esterilização, onde a temperatura é acima de  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , também é possível que não resistam a temperaturas muito baixas.

Dentre as técnicas de preservação de microrganismos, pode-se afirmar que a liofilização é considerada a mais eficiente porque as propriedades biológicas são mantidas em sua forma original sem quaisquer alterações de ordem biológica ou fisiológica. Como o princípio do processo é a remoção da água por sublimação, para reativar as leveduras é necessário apenas adicionar água e submetê-las ao processo. Os fatores a serem considerados são: tipo de células, idade da cultura, concentração celular, agentes crioprotetores, condições de estocagem e método de re-hidratação.

Depois de estudada a melhor temperatura de congelamento para realizar o processo de liofilização da levedura de algaroba, estudou-se a perda de sua viabilidade celular durante um período de armazenagem de 4 meses a temperatura ambiente ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) comparando-a com a levedura úmida armazenada a temperatura de  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na Tabela 16 encontram-se os dados referentes à análise estatística dos fermentos úmido e liofilizado durante o período de 4 meses. Esses dados mostram que existem diferenças significativas entre os dois tipos de fermento.

**Tabela 16** - Análise estatística do fatorial

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	1	1147.99788	1147.99788	176615.06**
Período de armazenamento	4	532.68618	133.17155	20487.9300**
Tratamento x período	9	2172.06708	241.34079	37129.3518**
Resíduo	20	0.13000	0.00650	
Total	29	2172.19708		

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < .01$ )

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $.01 \leq p < .05$ )

ns não significativo ( $p \geq .05$ )

Na Tabela 17 encontra-se a comparação entre médias do fermento úmido e do fermento liofilizado ao longo desses 4 meses de armazenamento as temperaturas respectivas de  $-5^{\circ}\text{C}$  e temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Observa-se ainda nessa tabela que o fermento úmido perde significativamente sua viabilidade celular ao longo do armazenamento, sendo esta perda da ordem de 24,61 % ao final de 4 meses.

**Tabela 17** - Viabilidade celular dos fermentos úmido e liofilizado

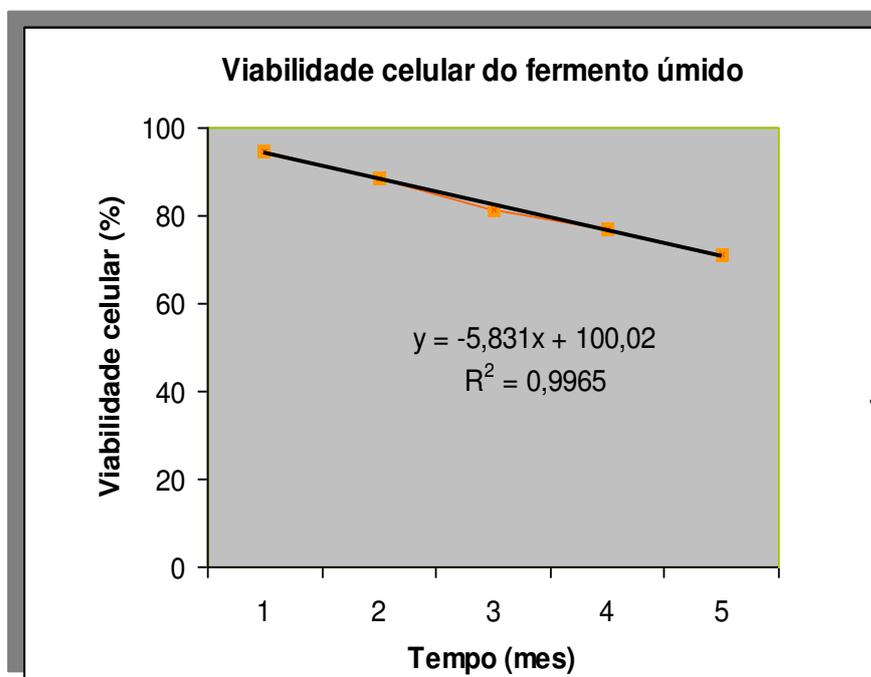
Tempo (mês)	Fermento Úmido	Fermento Liofilizado
0	94,45 a	95,15a
1	88,61 b	95,02 ab
2	81,55 c	94,85 bc
3	76,80 d	94,75 c
4	71,20 e	94,70 c

Ainda na Tabela 16 observa-se que a viabilidade celular do fermento de algaroba que foi liofilizado e armazenado por 4 meses, também perde significativamente uma determinada viabilidade, no entanto em muito menor intensidade, pois no período de 4 meses a perda foi de 0,45 pontos percentuais. De acordo com a avaliação considerando o instante inicial a contagem de células vivas atingiu um percentual de 94,7%.

Com relação ao fermento úmido observa-se que passado um mês, a viabilidade celular do fermento sofreu uma queda considerável que chegou a atingir 88,61%, diminuição causada pela perda das atividades metabólicas das células associado ao consumo gradual de nutrientes de que é constituído o meio de conservação. Abaixo desses valores, recomenda-se a necessidade de se renovar as culturas em novo meio, segundo COSTA (2004).

A manutenção das culturas de leveduras, na forma úmida por longos períodos, pode provocar contaminação, perda de viabilidade e mutação e principalmente, perda das características fisiológicas. Nesses 4 meses, as perdas de atividade celular podem ser explicadas como uma consequência que se atribui a baixas temperaturas, até porque se trata de microrganismos termossensíveis, onde o congelamento faz com que haja rompimento da membrana, afetando diretamente a estrutura da célula (CHAUD, 2006).

Na Figura 33 encontram-se as variações da viabilidade celular do fermento úmido de algaroba durante o período de 4 meses, onde se pode observar uma queda representada pela equação:  $y = -5,831x + 100,02$  que gerou um coeficiente de determinação de 0,9965.

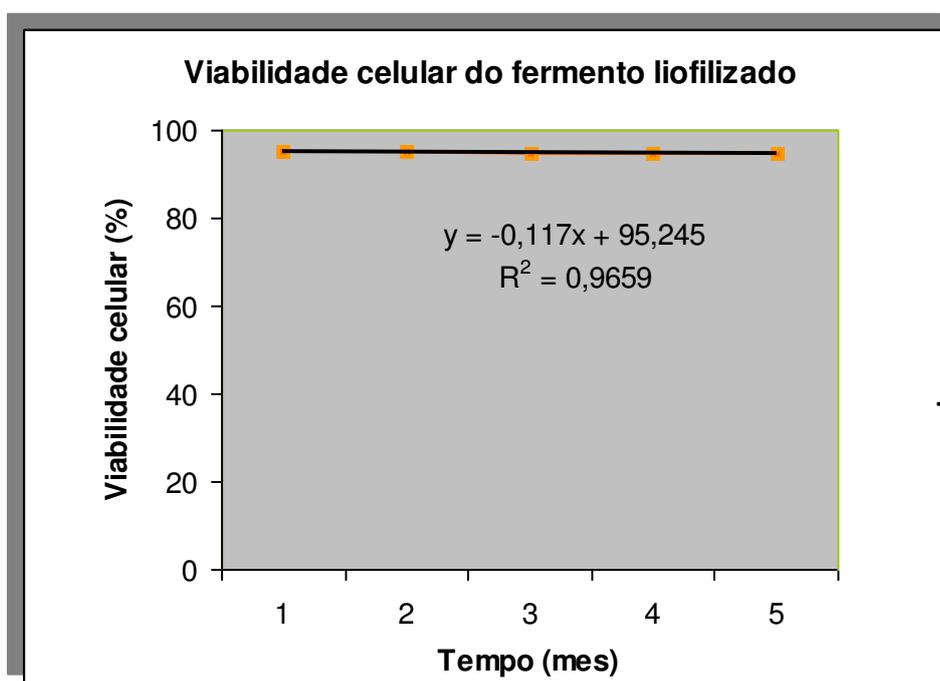


**Figura 33** – Equação representativa da viabilidade celular do fermento úmido de algaroba pelo período de 4 meses de armazenamento a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Ao se comparar os dois processos de armazenagem, verifica-se na Tabela 16 que o produto armazenado na forma de liofilizado é estatisticamente diferente do produto armazenado úmido a  $-5^{\circ}\text{C}$ , ao longo dos 4 meses. A viabilidade testada no instante considerado inicial foi de 95,15 % e se manteve praticamente estável perdendo apenas 0,45 pontos percentuais de sua viabilidade celular durante o tempo de armazenamento, embora essa diferença seja considerada estatisticamente significativa.

A importância deste processo de liofilização é que o produto é mantido a temperatura ambiente, dispensando, portanto, as formas de conservação por refrigeração e a sua duração é superior a 3 anos.

Na Figura 34 encontram-se as variações da viabilidade celular do fermento liofilizado de algaroba durante o período de 4 meses. Esta perda é expressa por uma equação do tipo  $y = -0,117x + 95,245$  cujo coeficiente de determinação foi da ordem de 0,9659.



**Figura 34** – Equação representativa da viabilidade celular do fermento liofilizado de algaroba por período de 4 meses de armazenamento a  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ .

Observa-se nessa figura que as perdas embora significativas são pequenas, pois visualmente essa equação apresenta uma reta de pequena inclinação.

Ao final dos 4 meses, foi feito novo teste de crescimento onde o fermento foi submetido a novos cultivos depois da sua re-hidratação. Essas leveduras quando testadas em caldo de cana-de-açúcar, demonstraram eficiências bioquímica e de processo comparativamente superiores as do fermento úmido (em tabletes) comercial, tradicionalmente usado nos processos de fermentação. Portanto, ficou comprovado que para esse período de armazenagem grande parte da população microbiana sobrevive e mantém sua eficiência bioquímica. A estabilidade celular se deve ao grau de desidratação que resulta em um longo tempo de estocagem.

O objetivo máximo de qualquer processamento é a manutenção da qualidade do produto. O fermento liofilizado de algaroba comporta todas essas exigências, para assegurar um tempo de estocagem maior. Com esse procedimento, as culturas isoladas do caldo de algaroba atendem as exigências do tempo de estocagem, que em geral, é superior a 3 (três) anos. Seguramente esse é um produto mais confiável do que as leveduras comerciais, uma vez que estas, não apresentam um grau de pureza e estabilidade desejáveis.

Na Tabela 18 encontra-se a análise química dos componentes do fermento úmido e do fermento liofilizado de algaroba.

**Tabela 18 - Análise do Produto Final (Fermento Biológico)**

<b>Componentes</b>	<b>Fermento Úmido (%)</b>	<b>Fermento Liofilizado (%)</b>
<b>Teor de água</b>	73,95	5,75
<b>Acidez</b>	5,90	7,45
<b>Proteína bruta</b>	10,46	30,30*
<b>Lipídios</b>	3,20	6,50
<b>Cinzas</b>	1,36	2,15
<b>Carboidratos</b>	11,03	55,30
<b>Valor Calórico Total</b>	113,56	413,30

(\*) Produto considerado de suma importância para a área de alimentos

Nessa tabela o fermento biológico obtido, depois da liofilização, apresenta um aumento considerável de concentração do teor de proteína e carboidratos, chegando a triplicar a concentração de proteína e quintuplicar a proporção de carboidratos. Observa-se também que os demais componentes, tiveram aumento de sua concentração só que em menores proporções.

A análise final do fermento liofilizado a temperatura de  $-40^{\circ}\text{C}$  mostra que com esta operação serviu para concentrar os principais componentes deste produto e reduzir o teor de água. O teor de água final de 5,75 % encontra-se dentro da faixa do fermento que é atualmente comercializado, cuja faixa está compreendida entre 5 e 15%. (THORN 1991). O fermento obtido nessas condições, atende plenamente as especificações de mercado.

O teor de água que foi extremamente reduzido, resultou no efeito desejado que é evitar a ação de microorganismos e de enzimas que afetam diretamente produtos hidratados, a exemplo do fermento biológico, objeto deste trabalho.

No fermento liofilizado onde o congelamento foi de  $-40^{\circ}\text{C}$ , o teor máximo de proteína bruta alcançado foi de 30,30 %, percentual este, que representa um aumento considerável não só de proteína como de nitrogênio

O que foi congelado a  $-170^{\circ}\text{C}$  alcançou cerca de 26,93% enquanto o que foi submetido a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  chegou apenas a 20,44%. Os valores correspondentes as duas últimas temperaturas se restringem a análises de proteínas. Os demais componentes não foram analisados.

## 5. CONCLUSÕES

Como a pesquisa teve duas finalidades: uma ligada à seleção e isolamento de leveduras e outra, em relação à produção de fermento biológico, pode-se concluir que:

- ✓ O caldo de algaroba, pelas condições nutricionais constatadas, o confere como um meio de cultivo alternativo comparável aos meios tradicionais de fermentação;
- ✓ As leveduras selecionadas e isoladas do caldo de algaroba pelo que pôde ser identificado geneticamente são dos gêneros *Saccharomyces* e *Zigossaccharomyces*, ambas com funções distintas, e largamente usadas nos processos de fermentação;
- ✓ Os cultivos desenvolvidos com leveduras selecionadas do próprio caldo de algaroba mostram que a produção de fermento biológico a partir dessa cultura é tecnicamente viável, podendo ser inclusive, estendido em bioprodução comercial;
- ✓ O fato de superar o fermento comercial (Fleischmann) no cultivo em caldo de cana de

açúcar, de acordo com as eficiências comprovadas, pode tornar o fermento de algaroba um produto altamente competitivo junto à agroindústria sucro-alcooleira;

- ✓ As cinéticas de congelamento e de liofilização serviram para avaliar a estabilidade celular do fermento produzido para efeito de armazenamento;
- ✓ O fermento liofilizado a uma temperatura de - 40°C resultou em uma maior estabilidade celular do fermento ao longo de 4 meses, o que garantiu uma viabilidade praticamente inalterada nesse período.

## **6. RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES**

- Como o fermento liofilizado apresentou uma viabilidade alta e estável, recomenda-se que a sua embalagem seja feita a vácuo como forma de assegurar um tempo de estocagem maior e assim preservar melhor as características originais desse produto;
- Como os dados sobre a produção de algaroba por hectare ainda são imprecisos, sugere-se que sejam efetuados estudos mais aprimorados sobre tratos culturais e cultivo planejado, preferencialmente, usando técnicas de raleamento que possam aumentar a produtividade;
- Para que a algaroba venha a se tornar uma matéria-prima competitiva no que concerne a produção de fermento, sugere-se que sejam levantados os custos de produção para que possa tornar o processo economicamente viável.

## 6- RERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIDE, G. N. Considerações sobre a algaroba. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.17, n.1, p.1-27 Jan./Jun., 1987.

ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade celular de leveduras. **Scientia Agrícola**, v.2, n.5, p.13-18, 1996.

ALLEN, R. Immobilized biocatalysts. Working party of engineering, **Microbiology and Technology**. v.1, n.5, p.304-315, 1993.

AMORIM, H. V. Seleção e identificação de leveduras do caldo de cana de açúcar. **Revista Fermentec News**. Piracicaba, SP, v.1, p.1-12, 2005.

ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos. Faculdade de Engenharia de Alimentos/Unicamp 2005 Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/extensao>. Acesso em: 2005

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16a edição New York, USA, p.211-289, 2000.

ARAUJO, A.N. Biotecnologia: Tecnologia baseada nas células e em moléculas biológicas. **Revista Ciência e Tecnologia Jovem**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Novembro, 2005.

ARRUDA, D. T. **Viabilidade técnico-econômica da produção de etanol e ração a partir da algaroba no semi-árido da Paraíba**. 1994. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB.

AZEVEDO, C. F. **Algarobeira na alimentação animal e humana** Empresa de Pesquisa Agro-Pecuária do Rio Grande do Norte – EMPARN Natal, 1999, 63p.(Informativo Técnico).

BAGUENA, R.S.B.; MARTINEZ-ANAYA, M.I.T. Identificación e propiedades funcionales de microrganismos de masas madre industriales. **Revista Agro-química e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.4, p.552-561, 1983.

BARBOSA, F. A.; FARIA, G. A.; VILELA, H. **Leveduras vivas na nutrição de Bovinos**. Portal da Ciência e Tecnologia 2007, 168p.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. Cambridge, University Press 1998, 69p.

BARROS, N. A. M. T. **Algarobeira – Importante forrageira para o nordeste**. Natal, 1982. 41p. (Boletim Técnico).

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Acompanhamento e seleção de leveduras

do processo fermentativo pela técnica de cariotipagem. In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”. **Relatório Anual de Pesquisa em Fermentação** Piracicaba. 1995. p.1-46

BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ **Portal do Conhecimento** – Piracicaba,SP , 2001.

BORZANI, W. Definições e cálculos de velocidades específicas em processos fermentativos. **Revista Desenvolvimento Biotecnológico**. Joinville/SC, v.2, n.1. p.9-15, 1999

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**. Mossoró, Rio Grande do Norte: Associação Brasileira de Algaroba., 1987, 62p. (Boletim Técnico).

BRAZ, A.A.; SANTIAGO, A.M.; TORRANO, A.D.M. Elaboração de meio de cultura alternativo para determinação de bolores e leveduras em alimentos. **Revista do Centro de Tecnologia**, João Pessoa, v.4, n.1.p.3-12 ,1999.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica do Estado de São Paulo. **Scientia Agrícola**. v.56, n.1, p.1-12, 2000.

CAMPELO, R. **Algarobeira: Alternativa para o semi-árido Brasileiro**. Editora da Universidade Federal de Alagoas-EdiUFAL Maceió/AL, 1984. 58p.

CANHOS, V. P. **Estudo da diversidade microbiana: Bactérias, fungos filamentosos e leveduras**. Fundação Tropical/Instituto de Botânica-SP 1997.

CARL-GÖRAN, H.; ILLÉNI, T. **New approaches to the identification of microorganisms**. Stockholm: Techniques in Pure and Applied Microbiology. Karolinska Institute, 1980. 102p.

CHANG, L. T.; ELANDER, R. P. Long-term preservation of industrially important microorganisms. In: DEMAIN, A.L.; SOLOMON, N. A., (Ed) **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Washington: CRC Press, 1996. Cap.5, p.49-55.

CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e das frações glicana, manana e glicoproteína **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.26, n.2, p.369-379, 2006.

CONO, T.; ASAI, T. Kinetics of fermentation processes. **Biotechnology and Bioengineering**. Osaka/Japan, v.11 (3) p.293-311, 1990

COOK, P. E. Fermented food as biotechnological resource food. **Research International**. v. 4, n. 2. p.309-316, 1994.

COSTA, G. F. **Manual de Microbiologia: Técnica de plaqueamento “Streak-Plate”** Recife, 2004, 47 p. (Boletim Informativo da AMBEV).

COLUCCI, I. **Levedura de Cerveja** Rio de Janeiro, 2004, 121p. (Boletim de Ciência e Tecnologia) Disponível em: [www.homeopatiaveterinaria.com.br](http://www.homeopatiaveterinaria.com.br).

CRAIG, D. B. Life and death of a single enzyme molecule. **Analytical Chemists New & Features**. New York, v.1, p.39-46, 1998.

CROWE, J.H.; PANEK, A.D.; CROWE, L.M.; ARAÚJO, P.S. Trealose transport in yeast cell. **Biochemistry International**. v.24, n.4, p.721-730, 1996.

CRUEGER, W. & CRUEGER, A. Biotecnologia – **Manual de microbiologia**. Division of Microbiology, **Bayer**, 1997. 567p.

DELAZARI, I; YOKOYA, F.; LEITÃO, M. F. F. Conservação de leveduras por liofilização **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP v. 4, n.2, p.23-29, 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. Biocombustíveis – a utilização de combustíveis biológicos ou bioenergéticos. Portal Biotecnologia. **Revista Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n.1. p.21-24, 2003.

ESTRELA, C.; PÉCOR, J.C. Caracterização de microrganismos. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.3, n.11, p.1-6, 2003. Disponível em: serviços. Acesso em: 16 de Novembro de 2006.

FARIA, L.F.F.; GIMENES, M.A.P.; NOBREGA, R. & PEREIRA JR., N. Influence of oxygen availability over cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry & Biotechnology**, v.8, n.10, p.449-458, 2002.

FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2.ed. Brasília; Embrapa/Cenargen, 1996. 220p.

FIGUEIREDO, P. **Algaroba e seus aspectos econômicos** . Rio de Janeiro, 1984. 32p. Associação Brasileira de Algaroba, (Boletim Técnico)

FREGUGLIA, R. M. O.; HORII, J. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum*. **Scientia Agrícola** v.55, n.3, p. 123-132 1998.

GAMBRINI, E. T. **Tangential flow filtration** – Filtração Tangencial.São Paulo, 1997. 46p. (Boletim Técnico da Millipore do Brasil).

GOMES, P. **Algarobeira: Uma Planta Altamente Nectarífera**. Rio de Janeiro, 1991, 82p. Ministério da Agricultura, (Informativo Técnico).

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agrícola** Piracicaba v. 50 n.3, p.464 – 472, 1993.

HERNANDEZ, I. L. C.; TRAVENSOLO, R. Microbiologia e Bioquímica Industrial. In: TORTORA, G. J. **Microrganismos industriais:Características e aplicações**. Porto Alegre. Artmed, 2003, p.1- 43.

HICKEY, C. J. Sorbate Spray Application for Protecting Yeast. **The Bakers Digest**. v. 20, n.2, p.36-41, 1980.

HISS, H.; BORZANI, W. A generalized kinetics model for the study of microbial growth. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 25 n.6, p.379-387, 1993.

HUGH, J. S. **Biotecnologia de la cerveza y malta**. Editorial ACRIBIA, S. A., Zaragoza-Espanha.1983, 269p.

HUMPHREY, A. E. Kinetics and engineering of medium sterilization. **Engineering Microbiology and Technology**. v.16, n.7, p.138-146, 1991.

INETI/IBOTA-**Produção de levedura seca ativa**. Portugal, Instituto de Biotecnologia de Portugal, Universidade de Lisboa 1997, 21p. (Boletim da Divisão de Microbiologia Industrial).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - **Normas e procedimentos analíticos**. São Paulo, 1985.

KREGER, van R. J. N. The yeasts: Taxonomic study. **Elsevier Science**. Amsterdam, v. 9, n. 4, p.239-251, 1994.

LALUCE, C. **Fermentação alcoólica: Ciência e Tecnologia** Fermentec Editora/ Fermentec News. Rio Claro, SP. 2004, 298p.

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R.; Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **Journal of Bacteriology**. v. 143, p.1384-1394, 1989.

LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S. Biotecnologia a serviço da enologia. **Revista Investigação e Desenvolvimento Tecnológico**. v.1, n.4, p. 1-8, 2004.

LOPES, M. L. **Seleção de leveduras e seu monitoramento**. Piracicaba, 2005, 65p. (Informativo da Fermentec News).

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; De ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência Tecnologia de e Alimentos**. Campinas v. 21, n.1,Jan./Abr., 2001.

MALDONADO, H. L.; ROLZ, C.; SCHNEIDER, C. S. Wine and vinegar production from tropical fruits. **Journal of Food Science**. v.40, n.2, p. 262-271, 1985.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção de compostos majoritários da fermentação de mostos de uva por leveduras isoladas da região da Serra Gaúcha.(RS). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Caxias do Sul, v.24, n.3, p.453 – 458 Jul./Set., 2004.

MARIANO, P.L.S.A. **Diferentes processos de armazenamento de leveduras: estudos sobre viabilidade fenotípica e genotípica**. 2006. 104f. Tese. (Doutorado em Biologia), Biblioteca Digital da UNICAMP. Universidade Estadual de Campinas, SP.

MATA, M. E.R.M. C.; SILVA, F. D. DUARTE, M. E.; SILVA, Y. C.. Desidratação osmótica de banana da terra (*musa sapientum*) aplicação de modelos matemáticos. **Revista Brasileira**

**de Produtos Agroindustriais.** Campina Grande, Especial, n.1, p.69-76, 2003.

MATIENZO, P. A. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares.** 2002. 97p. Dissertação. ( Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ. Universidade de São Paulo. Piracicaba/SP.

MENDES, B. V. **Plantas das caatingas.** Fundação Guimarães Duque/Fundação Vingtun Rosado. Coleção Mossoroense, Serie “C”, v.12, 2001.192p.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P. Isolamento e identificação de leveduras e fungos filamentosos em iogurtes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.2, p.117-122 Abr./Jun. 2001.

MORETTI, P. E. Crescimento populacional. **Revista Ciência e Desenvolvimento.** v. 2, n.4, p.11-17, 2006.

MORITZ, V. **Esterilização em fermentação.** Departamento de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1980. 37p.

MOSHY, R. J. Impact of biotechnology in food product development. **Food Technology.** v. 21, n.2, p.113-117, 1987.

NAGODAWITHANA, T. Yeast derived flavor and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology.** v. 20, n.1, p. 241-247, 1994.

NASSER, S. Fermento Como Medicamento Para a Cura da AIDS. Publicação do Centro de Especialidades. Universidade Federal do Paraná/UFPR(1993).

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da região amazônica para produção de protease extracelular. ( Screening of yeasts from Amazon region for extracellular protease production ) **ACTA Amazônica – Biotecnologia**, v.1, n.3, p.12-15, 2006.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*. cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Campinas v.27, n.1 Jan.Mar.2007.

NOGUEIRA, A.; SANTOS, L. D.; PAGANINI, C.; WOSIACKI, G. Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã./Evaluation of the alcoholic fermentation of aqueous extract of the apple pomace. **Revista Ciências Agrárias.** Londrina, v. 26,n.2, p. 187-194. Abr./Jun., .2005.

OLIVA, P.; CRUZ, R. Desenvolvimento biotecnológico de novos açúcares: Açúcar líquido, isomaltulose e neosugar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** Rio Claro, SP v.1, n.6, p.1-6, 2005.

OLIVEIRA, E. G. **Isolamento de leveduras selvagens de vagens da algarobeira.** Maceió, AL 2003, 12p. ( Informativo do Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas – UFAL)

OTTO, K. F. Sucrose any fermentation difference. **The Bakers Digest**. v.12, n.3, p.10-14, 1985.

OSZLANYL, A. G. Instant yeast GB - Fermentation industries. **The Bakers Digest** v.4, n.1, p.23-27, 1980.

OWEN, P. W. **Biotecnología de la fermentación**. Editorial ACRIBIA S. A. Zaragoza-Espanha 1996, 456p.

PALLONE, J. A. L.; CATHARINO, R. R.; GODOY, H. T. Avaliação do comportamento do ácido fólico no processamento de leites enriquecidos. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, SP. v.9, n.1, p.57-62, Jan./Mar. 2006.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C.; OLIVEIRA, R. A.; PARK, K. J. B. **Conceitos de processo e equipamentos de secagem**. Campinas, SP 2007. 121p.

PANTOJA, L. **Seleção e aproveitamento biotecnológico de frutos encontrados na amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada**. 2006. 167p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

PELLON, J. R. **La Ingenieria Genética y Sus Aplicaciones**. University of London England, 1995, 167p.

PEREGO, L.; MAGALHÃES, M. M. A.; BORZANI, W. Response of a continue anaerobic culture to variation in the feeding rate. **Biotechnology and Bioengineering** v. 19, n.3, p. 595-598, 1981.

PEREIRA, JR. N. **Efeito do Grau de Aeração na Produção de Xilitol por Bioconversão**. 1999. 117f. Tese (Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Produtos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PODLECH, P. A. S.; TREML, J.; PLOTON, A.; LUNA, M. F. Avaliação de diferentes crioprotetores na conservação de *Saccharomyces boulardii* por liofilização. In: SIMPOSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO. 11., São Carlos, 1996. **Trabalhos apresentados**. Sociedade Brasileira de Microbiologia. v.2, p. 752-755

POSIGATE, J. Microbes and biological productivity. Cambridge University. **Cambridge University Press** v.23, n.2, p. 287-291, 1981.

PÚGLIA, A. L. **Desempenho de leveduras selvagens com potencial de produção de enzimas amilolíticas em processo fermentativos**. 2006. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Jaboticabal-SP

QUAGLIA, G. **Ciencia y tecnologia de la panificación**. Roma-Itália, 1991, 123p. (Informativo do Instituto Nacional de Nutrição de Roma).

RAMALHO NETO, C. E. **Caracterização e identificação genética de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* usada na produção de álcool**. Maceió, AL, 2005. 21p.

(Informativo Laboratório de Biotecnologia Avançada da UFAL)

REBOUÇAS, N. A.; GOMES, M. D. Hibridização subtrativa seguida de PCR com leveduras. **Revista Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. Portal Biotecnologia, v.11, p.1-5, 2003.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencialidades de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agricola**. Piracicaba, SP v.56, n.2, p. 234 – 239, 1999.

REINA, M. **Técnicas de contagem celular**. Beckmann, 2003, 32p. (Boletim Técnico da Beckmann/Coulter, Co.)

ROBINSON, D. S. - **Bioquímica y valor nutritivo de las levaduras**. University of Leeds. Department of Food Science, 1997. 163p.

ROSEVEAR, A. Immobilized Yeast Technology. **Engineering Microbiology and Technology**. v. 5, n.2, p.304-321, 1993.

ROTHMANN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia aplicada**. São Paulo, Editora Manole Ltda 1987, p.105-135.

RUSSEL, I.; STEWART, G. G. – Contribution of yeast and immobilization technology to flavor development in fermented beverages. **Cereal Food World**. v.22, n.3, p.321-340, 1996

SETTE, L. D. **Técnicas de Preservação de Microrganismos**. Campinas, SP 2003. 21 p. (Informativo CBMAI-CPQBA/UNICAMP).

SCAVUZZI, J. A. **Cariotipagem de Leveduras Oriundas da Fermentação Alcoólica**. Recife, 2007, 21p. (Boletim Bioprodutividade/Incubação e Inovação Tecnológica).

SCHUCH, D.M.T. **Controle de processos em microbiologia, proficiência em microbiologia**. Lara/RS, 2005 (Informativo do Ministério da Agricultura e Abastecimento).

SILVA, C. G. **Desenvolvimento de um sistema micro-industrial para obtenção de aguardente bidestilada de algaroba (*Prosopis juliflora Sw DC*)** 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB.

SZETELA, R. V.; VINNICK, T. Z. A Novel Method for Determining the Parameters of Microbial Kinetics. **Biochemistry and Bioengineering**. v.23, n.5, p.485-490, 1989.

STEPHEN, E. S. **Comparação da eficácia dos diversos corantes para viabilidade de leveduras**. Beckmann, 2005, 12p (Boletim do Centro de Desenvolvimento de Aplicações). Beckmann/Coulter, Mai. 2005.

SUASSUNA, J. **Algarobeira – produção e produtividade**. Recife, 2007, 6p. (Boletim da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA 2007)

TABOSA, I.M. **Intoxicação experimental de vagens de algaroba *Prosopis juliflora Sw***.

**DC) em caprinos.** 2000. 121f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TAVARES, F. C. A. **Genética de microrganismos aplicado as leveduras.** 2003. USP. Sistemas Fenixweb. Disponível em: <http://www.sistemas.usp.br>. Acesso em: 20 de Novembro de 2004.

TAUK, S. M.; GAMBALE, V. Efeito da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de biomassa de *Candida guilliermondii* em meios de vinhaça e melaço. **Revista Brasileira de Microbiologia.** v.13, n.2: p.12-21, 1982.

THIEMANN, J.E. Processos Biotecnológicos - da pesquisa à implantação. Informativo da Bioferm. **Pesquisa & Desenvolvimento,** Montes Claros. MG, v.3, n.1. p.12-17, 1998.

THORN, J. A.; REED, G. Active dry yeast. **Cereal Science Today.** v. 4, n.7, p. 198-213, 1991

TOSTA, C. D. **Biotipagem de leveduras industriais através do sistema Killer.** 2006. 123 f. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba.

WANG, D. I. C.; DEMAINE, A. L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A. E.; LILLY, M. D. Fermentation and enzyme Technology. In: COONEY, C. H. **Aeration and agitation.** New York-USA: John Wiley & Sons. 1997, p.157-193.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAVASLSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research,** v.12. n.18, p.351-539, 1990.

WINTER, L. M. F.; WINTER, C. E. DNA Recombinante: A engenharia da vida. **Revista Brasileira de Tecnologia,** v. 19, n.2, p. 17-21, 1989.

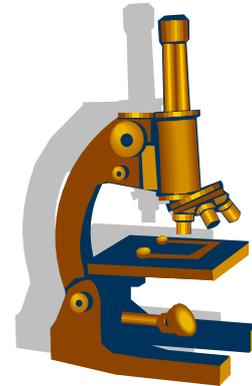
# ANEXOS

Universidade Federal de Campina Grande  
Programa de pós-graduação em engenharia de processos

Centro de Ciências e Tecnologia



DEQ/DEMA/DEAG



**Titulo do Trabalho:**

**Potencialidades Biotecnológicas da Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC): Para Produção de Fermento Biológico**

*Manoel Ferreira Alves*

**Área de concentração: Desenvolvimento de processos**

**Desmembramento do Trabalho de Pesquisa Para Possíveis Publicações Envolvendo Biotecnologia de Leveduras**

1. Isolamento e Caracterização Genética de Leveduras Selvagens a Partir do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC);
2. Avaliação da Viabilidade Celular do Fermento de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC) Liofilizado;
3. Produção de Leveduras de Alta Densidade Celular a Partir do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC);
4. Extração do Ácido Fólico de Leveduras Isoladas do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC);
5. Cinética de Liofilização de Fermento Produzido a Partir do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* Sw, DC).

Março/2008

### Calculo da Extração do Caldo:

Extração: 1 kg de algaroba para 2 litros de água diluição: 1:2  
1 litro de caldo corresponde a 1,074 kg Base de cálculo: 3,148 kg

$$\begin{aligned} 3,148 \text{ kg} & \text{-----} 100\% \\ 1,920 \text{ litros} \times 1,074 & \text{-----} \times \quad \quad \quad x = 65,50 \% \\ \text{Densidade} = \text{massa/volume} \quad \rho & = 1,074 \text{ kg}/1,000 \text{ litro} \quad \gg \quad 1,074 \text{ kg/litro} \end{aligned}$$

### Calculo das eficiências

Os cálculos das Eficiências foram feitos utilizando as seguintes relações:

(a)- Eficiência Bioquímica = [%Etanol / (ART do Mosto – ART do Mosto Fermentado)] / 0,6474 x 100

(b)- Eficiência do Processo = (%Etanol / ART do Mosto) / 0,6474 x 100

### Relação estequiométrica de Gay-Lussac



$$\begin{aligned} \text{Peso molecular da glicose} & \quad \quad \quad \text{Peso molecular do álcool etílico} \\ 180 \text{ g} & \text{-----} 2 \times 46 (=92 \text{ g}) \\ 1 \text{ g} & \text{-----} \times \quad \quad \quad x = 0,511 \text{ g} \end{aligned}$$

Densidade do álcool: $\delta = 0,7893$ densidade = $\frac{\text{massa(g)}}{\text{Volume}}$
--

$$\text{Volume} = \frac{\text{massa}}{\text{Densidade}} \quad \quad \quad 0,511/0,7893 = 0,6474$$

### Eficiência da Fermentação ou Eficiência Bioquímica:

$Y_{P/S} = \text{Etanol}/\text{ART no mosto} - \text{ART no mosto fermentado}/0,6474 \times 100$
--

### Eficiência do Processo ou Rendimento do Processo

$Y_{P/S} = [\% \text{Etanol}]/\text{ART do mosto}/0,6474 \times 100$
--

### Cálculo da Eficiência Bioquímica em 48 horas

ALG-1 %Etanol = 8,8; So = 18,5 -----> S= 2,4 €% = 84,4 %

ALG-2 %Etanol = 9,2; So = 18,2 -----> S = 1,7 €% = 86,1

ALG-3 %Etanol = 9,9; So = 18,7 ----->S = 2,2 €% = 92,7

ALG-4 %Etanol = 8,8; So = 17,8 -----> S =2,9 €% = 91,2

ALG-5 %Etanol = 9,3; So = 17,8 -----> S = 2,3 €% = 92,7

Fermento Fleischmann: %Etanol = 8,9 So=18,2 -----> S=1,3; €% = 81,3

### Cálculo da Eficiência do Processo em 48 horas

ALG 1 %Etanol = 8,8 So = 18,5 -----> €% = 73,5

ALG 2 %Etanol = 9,2; So = 18,2 -----> €% = 78,1

ALG 3 %Etanol = 9,9 So = 18,7 -----> €% = 81,8

ALG 4 %Etanol = 8,8 So = 17,8 -----> €% = 76,4

ALG 5 %Etanol = 9,3 So = 17,8 -----> €% = 80,7

Fermento Fleischmann %Etanol = 8,9 So = 18,2; -----> €% = 75,5

### Calculo da Eficiência Bioquímica em 72 horas

ALG-1 %Etanol = 8,8; So = 18,5 -----> S = 0,4 €% = 81,9%

ALG-2 %Etanol = 9,2; So = 18,2 -----> S = 0,6 €% = 86,9

ALG-3 %Etanol = 9,9; So = 18,7 -----> S = 0,2 €% = 87,7

ALG-4 %Etanol = 8,8; So = 17,8 -----> S = 0,7 €% = 92,1

ALG-5 %Etanol = 9,3; So = 17,8 -----> S = 0,3 €% = 84,7

Fermento Fleischmann: %Etanol = 8,9 So=18,2 -----> S=1,1; €% = 84,9

### Calculo de Eficiência do Processo em 72 horas

ALG-1 %Etanol = 8,8; So = 18,5 -----> €% = 80,15%

ALG-2 %Etanol = 9,2; So = 18,2 -----> €% = 84,0

ALG-3 %Etanol = 9,9; So = 18,7 -----> €% = 86,7

ALG-4 %Etanol = 8,8; So = 17,8 -----> €% = 88,5

ALG-5 %Etanol = 9,3; So = 17,8 -----> €% = 83,3

Fermento Fleischmann: %Etanol = 8,9 So=18,2 -----> €% = 7

## Rendimento da Fermentação Alcoólica : Cálculo

$$R\% = \frac{(V.v. \times G.v.) - (V.f. \times G.f.)}{(V.v. \times V.f.) - (A.T. - A.I.)} \times 100$$

**V.v.** = Volume de vinho na dorna

**V.f.** = Volume de fermento

**G.v.** = Grau alcoólico no vinho

**G.f.** = Grau alcoólico do fermento

**A.T.** = Açúcares Totais no mosto

**A.I.** = Açúcares Infermentescíveis

Contagem de células em câmara de Neubauer:

### Prensagem p/Extração do Caldo

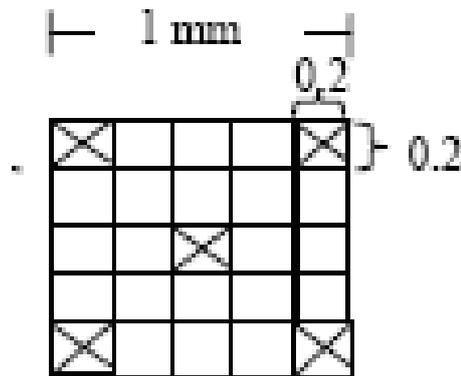
$$P = \frac{F}{A} \quad 8 \text{ ton.} = \frac{8000 \text{ kg}}{3,14 (20 \text{ cm})^2} \quad \text{-----} \rightarrow 25,5 \text{ kgf/cm}^2$$

4

Contagem de células em câmara de Neubauer:

$$\text{Céls/ml} = n \times \text{fd} \frac{1000}{0,004}$$

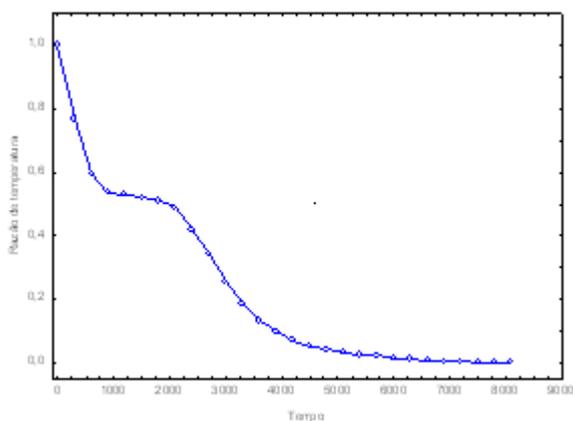
n = média do número de células  
fd = fator de diluição



Campo de contagem de células

**Tabelas de acompanhamento dos experimentos de Congelamento e Secagem**  
**Congelamento do fermento a - 40° C**

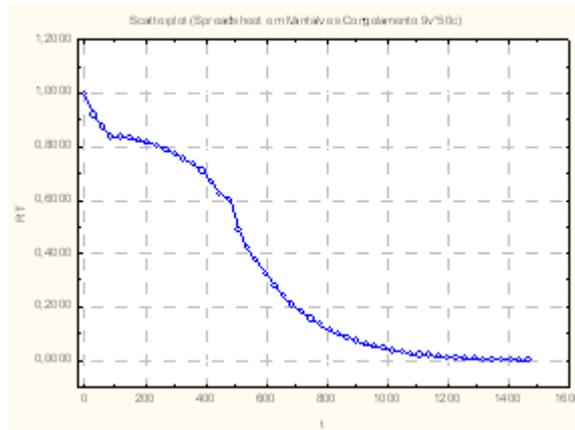
0	26,7	1,0000	0	26,7			
300	12,1	0,7679	300	12,1			
600	1,2	0,5946	600	1,2			
900	-2,4	0,5374	900	-2,4			
1200	-2,8	0,5310	1200	-2,8			
1500	-3,4	0,5215			1200	-2,8	
1800	-4,1	0,5103			1500	-3,4	
2100	-5,5	0,4881			1800	-4,1	
2400	-9,8	0,4197			2100	-5,5	
2700	-14,7	0,3418			2400	-9,8	
3000	-20,1	0,2560				2400	-9,8
3300	-24,5	0,1860				2700	-14,7
3600	-27,8	0,1335				3000	-20,1
3900	-31,8	0,0970				3300	-24,5
4200	-31,7	0,0715				3600	-27,8
4500	-32,8	0,0541				3900	-30,1
4800	-33,6	0,0413				4200	-31,7
5100	-34,2	0,0318				4500	-32,8
5400	-34,6	0,0254				4800	-33,6
5700	-34,9	0,0207				5100	-34,2
6000	-35,2	0,0159				5400	-34,6
6300	-35,5	0,0111				5700	-34,9
6600	-35,7	0,0079				6000	-35,2
6900	-35,8	0,0064				6300	-35,5
7200	-35,9	0,0048				6600	-35,7
7500	-36,1	0,0032				6900	-35,8
7800	-36,2	0,0000				7200	-35,9
8100	-36,2	0,0000				7500	-36,1
						7800	-36,2



**Perfil cinético do congelamento a -40°C**

### Congelamento do fermento a – 170°C

0	28,4	1,0000	0	28,4		
30	12,4	0,9188	30	12,4		
60	3,5	0,8736	60	3,5		
90	-3,9	0,8360	90	-3,9	Fase II	
120	-4,1	0,8350			90	-3,9
150	-4,6	0,8325			120	-4,1
180	-5,9	0,8259			150	-4,6
210	-8,2	0,8142			180	-5,9
240	-10,4	0,8030			210	-8,2
270	-13,2	0,7888			240	-10,4
300	-16,3	0,7731			270	-13,2
330	-19,7	0,7558			300	-16,3
360	-23,6	0,7360			330	-19,7
390	-28,9	0,7091			360	-23,6
420	-36,8	0,6690			390	-28,9
450	-45,8	0,6234			420	-36,8
480	-50,4	0,6000			450	-45,8
510	-72,3	0,4888			480	-50,4
540	-85,8	0,4203				
570	-94,9	0,3741			Fase III	
600	-105,4	0,3208			480	-50,4
630	-113,2	0,2812			510	-72,3
660	-121,1	0,2411			540	-85,8
690	-127,7	0,2076			570	-94,9
720	-133,3	0,1792			600	-105,4
750	-138,1	0,1548			630	-113,2
780	-142,6	0,1320			660	-121,1
810	-146,2	0,1137			690	-127,7
840	-149,7	0,0959			720	-133,3
870	-152,2	0,0832			750	-138,1
900	-154,8	0,0701			780	-142,6
930	-156,7	0,0604			810	-146,2
960	-158,8	0,0497			840	-149,7
990	-160,7	0,0437			870	-152,2
1020	-161,6	0,0355			900	-154,8
1050	-162,7	0,0299			930	-156,7
1080	-163,7	0,0249			960	-158,8
1110	-164,6	0,0203			990	-160,1
1140	-165,3	0,0168			1020	-161,6
1170	-165,9	0,0137			1050	-162,7
1200	-166,6	0,0102			1080	-163,7
1230	-166,9	0,0086			1110	-164,6
1290	-167,4	0,0051			1140	-165,3
1320	-168,5	0,0030			1200	-166,6
1350	-168,5	0,0020			1230	-166,9
1380	-168,3	0,0015			1260	-167,3
1410	-168,5	0,0005			1290	-167,6
1440	-168,6	0,0000			1320	-168,6
1470	-168,6	0,0000			1350	-168,2



Perfil cinético do congelamento a  $-170^{\circ}\text{C}$

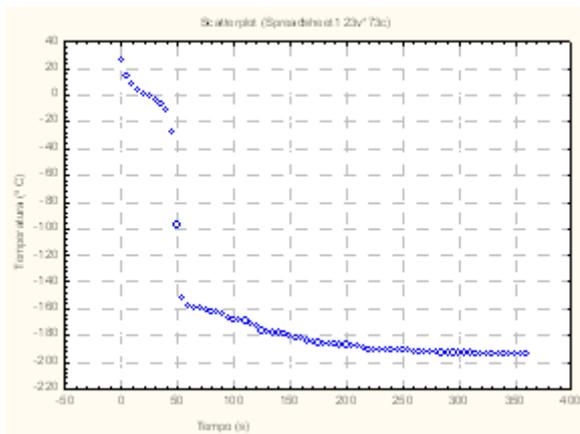
**Congelamento do fermento a  $-196^{\circ}\text{C}$   
(Imersão em Nitrogênio líquido)**

0	25,8
5	14,3
10	7,8
15	3,8
20	0,8
25	-1,1
30	-3,6
35	-6,3

40	-10,7
45	-27,2
50	-97,3

60	-158,1
65	-159,4
70	-159,7
75	-160,8
80	-161,9
85	-162,8
90	-163,8
95	-166,9
100	-168,2
105	-168,8
110	-169,2
115	-171,3
120	-172,8
125	-176,5
130	-177,7
135	-178,1
140	-178,5
145	-178,9
150	-180,1

155	-181,2
160	-182,6
165	-183,7
170	-184,6
175	-185,5
180	-186,1
185	-186,5
190	-186,8
195	-187,2
200	-187,5
205	-187,8
210	-188,2
215	-189,3
220	-190,2
225	-190,5
230	-190,8
235	-191,1
240	-191,2
245	-191,4
250	-191,6
255	-192,2
260	-192,4
265	-192,5
270	-192,7
275	-192,8
280	-192,9
285	-193,2
290	-193,2
295	-193,3
300	-193,3



**Perfil cinético do congelamento a -196°C**

### Secagem do fermento a -40° C

0	40	1
2	29	0,657320872
4	19,4	0,358255452
6	12,2	0,133956386
8	9,9	0,062305296
10	7,9	0

### Secagem do Fermento a – 170°C

0	40	1
2	28,1	0,625786164
4	18,1	0,311320755
6	10,7	0,0786163522
8	9,1	0,0283018868
10	8,2	0

### Secagem do Fermento a -196°C

0	40	1
2	30,5	0,699367
4	25,1	0,528481
6	12,7	0,136076
8	10,5	0,066456
310	8,8	0,012658
12	8,5	0,003165
14	8,4	0

Aplicação do Modelo de Page:

$$RU = \frac{U - U_e}{U_o - U_e} = \exp(-kt^\eta)$$

U = Teor de água, base seca

U<sub>o</sub> = Teor de água inicial, base seca

U<sub>e</sub> = Teor de água de equilíbrio, base seca

K = Coeficiente de transferência de calor

t = Temperatura (°C)

η = Coeficiente do modelo de Page

# **METODOLOGIA DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS**

## **ISOLAMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS DE VAGENS DA ALGAROBEIRA**

### **FASE DE PROPAGAÇÃO:**

1. Triturar, em liquidificador industrial, 1 Kg de vagens de algaroba um 1 litro de água;
2. Filtrar, para retirada do material fibroso, e determinar o brix;
3. Diluir a cerca de 7° brix;
4. Em erlenmeyer de 1000 mL, tomar 500 mL do meio líquido, tampar com algodão e deixar fermentar, por 48 a 72 horas em estufa controlada a 32°C, agitando de vez em quando;
5. Observar o final da fermentação (pelo final na produção de CO<sub>2</sub>) e adicionar, a cada 24 horas 50 gramas de mel de algaroba, preparado conforme descrição abaixo;
6. Antes de cada adição de mel de algaroba, medir o teor alcoólico até atingir a máxima concentração, cerca de 15°GL.
7. O isolamento para meio de manutenção é feito conforme a descrição apresentada em “fase de isolamento”.
8. O meio utilizado no isolamento deverá ser o meio completo para manutenção de leveduras.

### **MEIO USADO NO ISOLAMENTO E MANUTENÇÃO:**

- Peptona, 10g; Extrato de levedura, 10g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g; Glicose, 20g; Agar, 20g; Água destilada, 1000 mL. pH = 4,5. Esterilizar a 121°C / 15 minutos.

### **PREPARO DO XAROPE DE ALGAROBA:**

Aproveita-se o período do crescimento celular (fermentação) para preparar o xarope que irá ser utilizado na alimentação do meio em fermentação, visando obter-se a máxima concentração de etanol.

- Triturar, em liquidificador industrial, 2 Kg de vagens de algaroba em 2 litros de

água

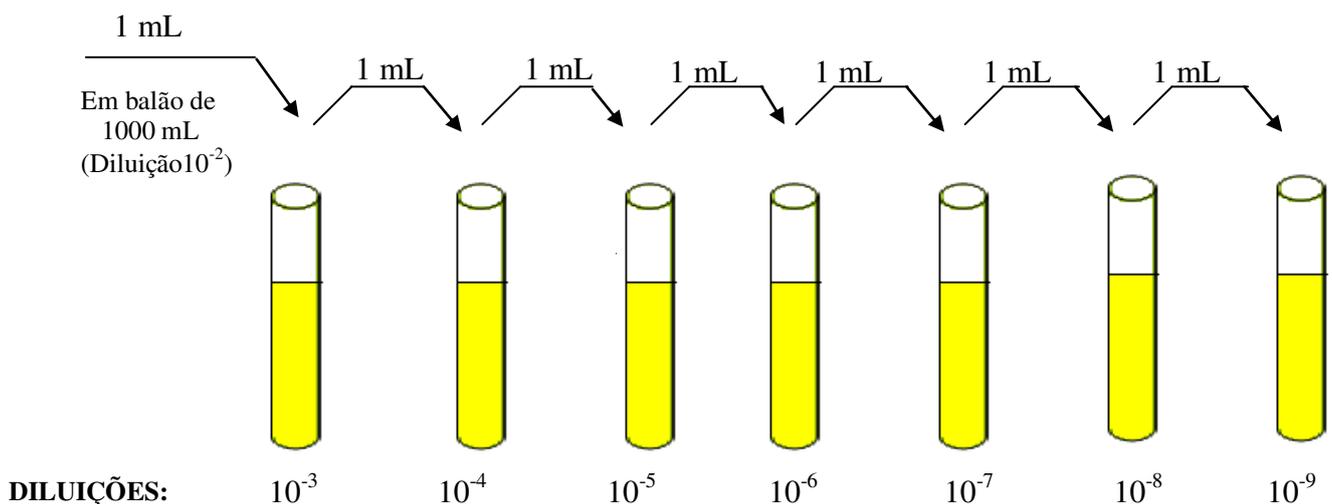
- Filtrar e ajustar a 40° brix pela adição de açúcar (sacarose)
- Levar ao fogo, concentrar a cerca de 70° brix, e conservar em geladeira.

### **FASE DE SELEÇÃO:**

DO BALÃO DE CRESCIMENTO (1000 ml) TRANSFERIR ALÍQUOTA DE 10 mL PARA OUTRO BALÃO DE 1000 mL - DILUIÇÃO  $1/100$   $10^{-2}$

A PARTIR DESTES BALÕES, COM DILUIÇÃO DE  $10^{-2}$ , PROCEDER DILUIÇÕES EM SÉRIE, COMO MOSTRA O ESQUEMA ABAIXO.

CADA TUBO UTILIZADO NAS DILUIÇÕES DEVERÁ CONTER 9 ml de meio e 1 ml de ÁGUA DESTILADA ESTÉRIL



### **FASE DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS SELVAGENS**

FAZER PLAQUEAMENTO, TRANSFERINDO 1 mL DE CADA TUBO PARA PLACAS DE PETRI CONTENDO MEIO DE CRESCIMENTO PARA LEVEDURAS – INCUBAR POR 48 HORAS A 32°C.

DA PLACA DE MAIOR DILUIÇÃO QUE APRESENTAR CRESCIMENTO SEMEAR CADA COLÔNIA EM TUBO INCLINADO CONTENDO O MESMO MEIO UTILIZADO NAS PLACAS

INCUBAR POR 48 HORAS A 32°C – APÓS O CRESCIMENTO, MANTER AS CULTURAS EM GELADEIRA A -5°C.

## **Metodologia de Seleção e Isolamento de leveduras**

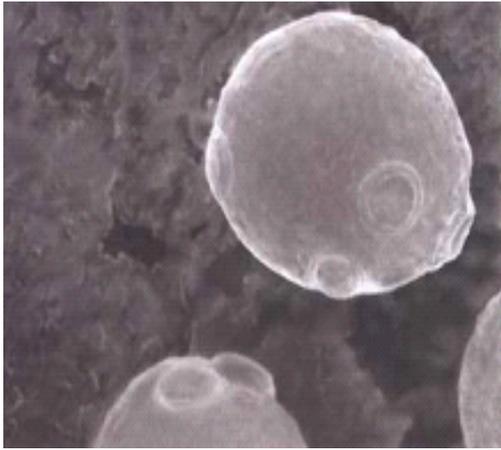


Imagem ampliada da levedura  
*Saccharomyces cerevisiae*



Culturas isoladas em Placas  
de Petri

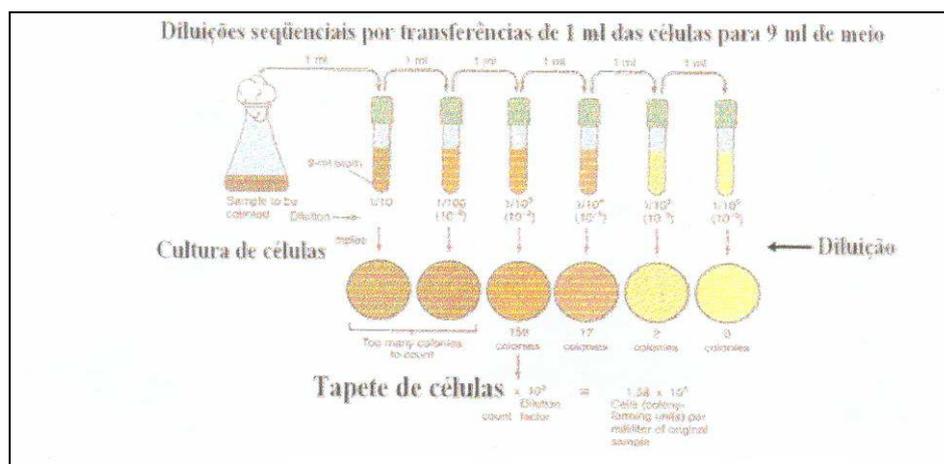


Leveduras Seleccionadas Crescidas  
em tubos de ensaios



Seqüenciador de DNA

## **Técnica microbiológica de isolamento de leveduras**



Técnica de obtenção de colônias isoladas de caldos naturais

Coleções de culturas de microrganismos industriais (bancos) disponíveis para uso em pesquisa e em processos:

Abreviatura	Nome	Localidade de origem
ATCC	American Type Culture Collection	Rodville, MD, United States
CBS	Centraalbureau voor Schimmelculturen	Baam, The Netherland
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms	Brno, Czech Republic
CDDA	Canadian Department of Agriculture	Ottawa, Canadá
CMI	Commonwealth Mycological Institute	Kew, United Kingdom
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	Braunschweig, Germany
FAT	Faculty of Agriculture, Tokio University	Tokio, Japan
IAM	Institute of Applied Microbiology	University of Tokio, Japan
NCIB	National Collection of Industry Bacteria	Aberdeen, Scotland
NCTC	National Collection of Type Cultures	London, United Kingdom
NRRL	Northern Regional Research Laboratory	Peoria, IL, United States
PCC	Pasteur Culture Collection	Paris, France

Controle do processo de fermentação usando caldo de algóroba

como meio de crescimento



Controle microbiológico



Início e término da fermentação



Fermentação Turbulenta



Separação por decantação



Ampliação - propagadores

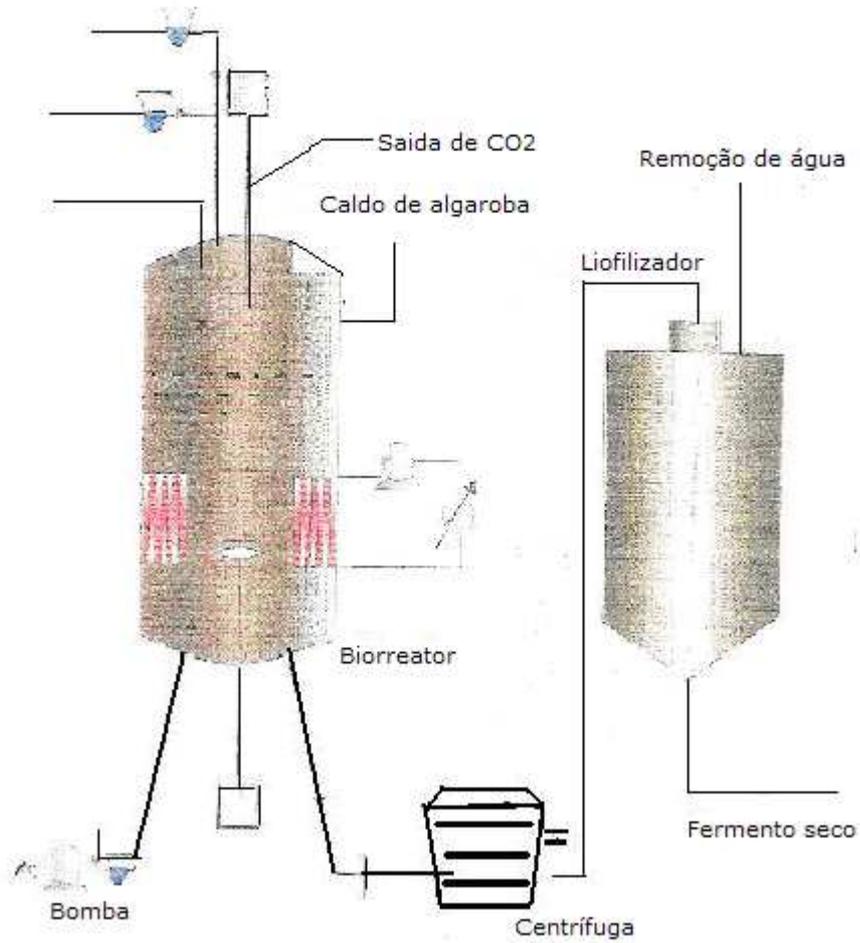


Laboratório de Engenharia Genética

PRODUÇÃO DE FERMENTO DE ALTA DENSIDADE

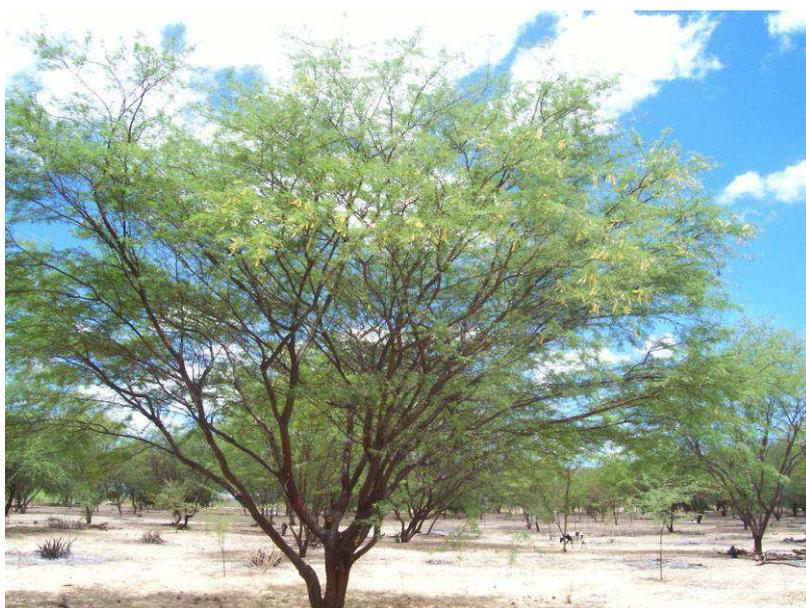
## CELULAR

### FERMENTO BIOLÓGICO A PARTIR DA ALGAROBA



### PROCESSO SIMPLIFICADO DE PRODUÇÃO DE FERMENTO

## FORMAS DE CULTIVO DA ALGAROBEIRA



INICIO DE FRUTIFICAÇÃO DA ALGAROBEIRA



CULTIVO CONSORCIADO DA ALGARROBA



Cultivo organizado e planejado



Comercialização da algaroba às margens  
do Rio São Francisco / Abaré-Ba

## **PROCESSAMENTO DAS VAGENS DE ALGAROBA**



TRITURADOR INDUSTRIAL – MOINHO



COCÇÃO DAS VAGENS DE ALGAROBA

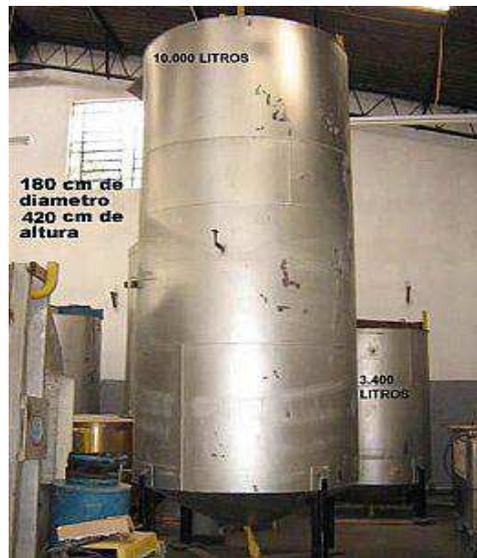
Equipamentos para produção em escala industrial



Moinho de martelos



Filtro-prensa



Tanque para infusão



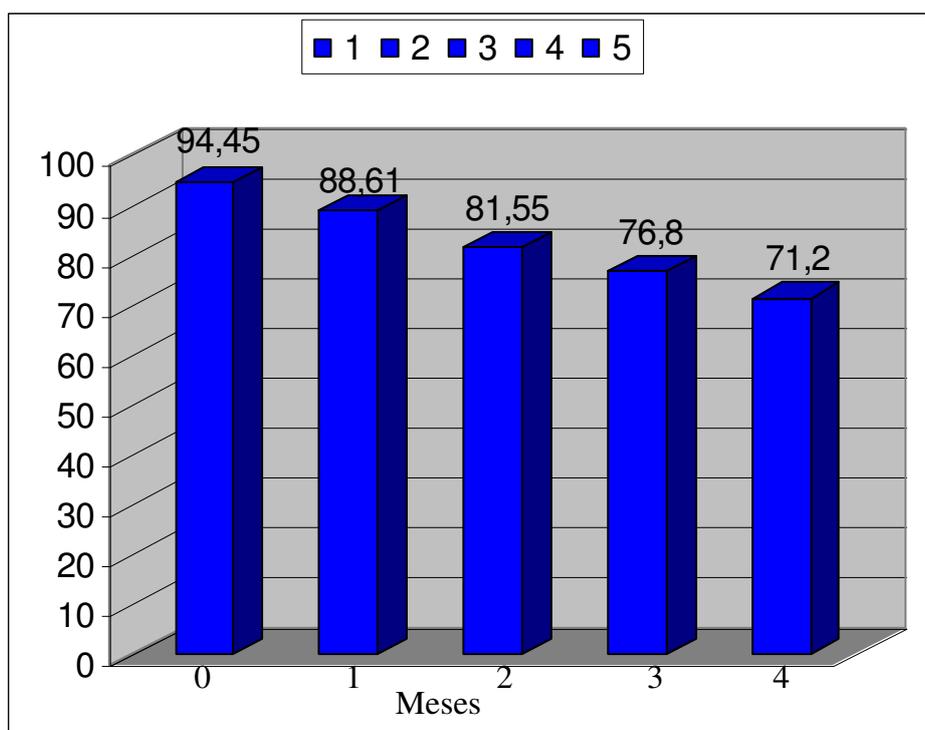
Dornas



Embaladora a vácuo

<b>Maquina</b>	<b>Etapa</b>	<b>Processo</b>
Setor de seleção	Seleção da Vagem	Seleção da vagem de acordo com o estadio de maturação fisiológica.
Moinho de Martelo	Trituração	Tritura a vagem e separa as sementes.
Tanque de Inox	Infusão	Mistura da vagem triturada com água na proporção de 1:4 a temperatura de 70°C por 30 minutos.
Filtro-prensa	Filtragem	Separa o caldo da “torta” (resíduo).
Dornas	Fermentação	Processo de fermentação.
Embaladora	Embalagem	Embala a vácuo o fermento em barras de 500g

### ***VIABILIDADE CELULAR DO FERMENTO DE ALGAROBA***



**RESULTADO DO TRABALHO:**



**FERMENTO BIOLÓGICO DE ALGAROBA**