



FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA UTILIZANDO SUCO DO PEDÚNCULO DE CAJU (*Anacardium occidentale L.*)

M. de SOUSA¹, F.M.R. MESQUITA¹; M.M.M. FREITAS¹, J.C.S. dos SANTOS¹; T.N.M. SÁ¹ e G.A.S. PINTO²

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química
e-mail: marylane_s@yahoo.com.br

² Embrapa Agroindústria Tropical
e-mail: gustavo@cnpat.embrapa.br

RESUMO – a cultura do cajueiro (*A. occidentale L.*) está presente em quase todos os países tropicais. *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo muito utilizado industrialmente para a produção de etanol por fermentação. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol por fermentação do suco de cinco diferentes variedades de caju, provenientes do banco de germoplasma da Embrapa Agroindústria Tropical, utilizando levedura *S. cerevisiae* comercialmente disponível. Os experimentos foram realizados diretamente no suco não clarificado à temperatura de 20°C por 6 horas. Durante o processo fermentativo acompanhou-se o consumo de glicose, a produção de etanol e o crescimento da biomassa. Os resultados obtidos indicam que a amostra 04 apresentou uma maior produção de etanol (88,83g/L) e maior velocidade de crescimento celular, não consumindo toda a glicose presente no meio de cultivo, apresentando menor velocidade de consumo de substrato.

PALAVRAS-CHAVE: Suco de cajú; fermentação alcóolica; *Saccharomyces cerevisiae*.

1. INTRODUÇÃO

Devido à sua vasta biodiversidade, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. Portanto, é importante fomentar a demonstração das vantagens existentes e encorajar o investimento no desenvolvimento de novas tecnologias (BRINGHENTI *et al.*, 2007).

A produção brasileira de pedúnculos de caju é estimada em torno de 1,8 milhão de t/ano, concentrando-se basicamente na região Nordeste, sendo esta responsável por aproximadamente 99% da produção brasileira da fruta e com aproveitamento

industrial de apenas 15% do total. A quantidade desperdiçada apresenta elevada concentração de nutrientes que têm potencial de uso para conversão por microrganismos, na obtenção de produtos de alto valor agregado (SANTOS *et al.*, 2008; TORRES NETO *et al.*, 2006).

O uso do pedúnculo de caju para produção de fermentado é uma forma de aproveitar a parte succulenta do fruto evitando seu desperdício exagerado e fazendo com que a cultura do caju seja mais valorizada, gerando emprego e renda para minimização das desigualdades regionais do Brasil. O desperdício deve-se ao fato da industrialização da castanha ser o principal interesse comercial em relação ao fruto



integral, com um alto índice de exportação desses produtos (HONORATO *et al.*, 2007).

A fermentação alcoólica consiste na transformação de carboidratos em etanol e gás carbônico através do metabolismo anaeróbico, no entanto, outras substâncias como o glicerol e ácido acético são produzidas em quantidades menores. Os substratos utilizados na fermentação alcoólica são altamente variáveis e podem ser constituídos por produtos de açúcar, como caldo de cana-de-açúcar, raiz de beterraba, mel, melaço e frutas ou de matérias amiláceas, como grãos de amido, raízes, tubérculos e outros (ALENCAR *et al.*, 2009).

O suco de caju segue para a etapa de fermentação alcoólica na qual as leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, metabolizam o açúcar em CO₂ e etanol. Nos processos convencionais, o mosto fermentado é centrifugado onde ocorre a separação das leveduras, as quais passam por um tratamento ácido e retornam às dornas de fermentação, enquanto o mosto é conduzido para as colunas de destilação para obtenção do etanol (OLIVEIRA & MANTOVANI, 2009).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo produzir bebida de caju e avaliar a produção de etanol por fermentação do suco de caju proveniente de cinco diferentes espécies de caju utilizando como microrganismo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação da produção de etanol foi investigada a partir de cinco clones de *Anacardium occidentale* L., oriundo de sementes de cajueiro comum, plantadas e colhidas aleatoriamente. Tabela 1 provenientes dos jardins clonais da Embrapa Agroindústria Tropical, Estação Experimental de Pacajus-Ceará, do campo

progênie comum A-12. O suco não clarificado obtido a partir dos pseudofrutos clonados foi fermentado utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O desempenho das leveduras no processo de fermentação dos sucos foi avaliado através das velocidades de produção de etanol, consumo de substrato, formação de biomassa e pelo rendimento final de etanol. As amostras de etanol produzidas foram congeladas para testes futuros quanto à formação de estireno, composto que atribue sabor indesejável ao produto.



Figura 1. Ilustração da amostra de caju 01 (Diversos 02).

Tabela 1. Identificação dos clones de caju (*A. occidentale* L.).

Amostra	Identificação
01	Diversos 02
02	Desconhecido 04
03	Clone 09
04	Clone 209
05	Diversos

2.1. Obtenção do suco não Clarificado

Os pseudofrutos foram lavados por imersão em água clorada (50 ppm) durante 15 minutos. Em seguida, foram selecionados e submetidos à lavagem com água potável clorada (2 ppm). O suco foi extraído através de um multiprocessador da marca ARNO e filtrado para retirada do bagaço.



2.2. Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, fabricada por AB Brasil Indústria e Comércio de Alimentos LTDA, Pederneiras- SP.

2.3. Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi obtida mediante uma curva de calibração que correlaciona densidade ótica (DO) com massa seca. Para a elaboração desta curva, foram pesados 20 g de fermento fresco os quais foram suspensos em balão volumétrico de 100 mL. A partir desta suspensão, várias diluições foram preparadas e as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro VARIAN Cary 50, a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco. As leituras que permaneceram fora da linearidade da curva de calibração foram desconsideradas.

2.4. Método Padrão de Determinação de Glicose

A concentração de glicose foi determinada pelo método do ácido dinitro-3,5 salicílico (DNS). O reagente DNS foi preparado de acordo com Miller (1959). Uma curva de calibração com padrões de glicose foi preparada e determinada a 540 nm. (GONÇALVES, 1999; MILLER, 1959; NIRMALA E MURALIKRISHNA, 2003; REGULY, 1996).

2.5. Análise cinética

Inoculou-se uma fração de 10g do fermento em 100 mL de suco não clarificado de caju e o processo de fermentação foi realizado em incubadora B.O.D. a 20°C por um período de 6 horas em erlenmeyer de 500 mL.

A fermentação foi acompanhada através da medida de perda de peso a partir da evolução de CO₂ em intervalos de 30 minutos em balança digital. Através da leitura de absorbância feita por hora de fermentação avaliou-se a biomassa.

Após diferentes tempos, os meios foram filtrados e realizadas as análises da quantidade de glicose presente no meio.

2.6. Cálculo dos Parâmetros de Fermentação da Produção de Etanol

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), formação de etanol (μ_p), e consumo de substrato (μ_s) foram expressos, respectivamente:

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt}\right) \quad (2)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 2 apresenta os perfis de crescimento de biomassa (X), em função do tempo de fermentação para as cinco amostras, onde cada amostra correspondente a um único frasco. Analisando a concentração de células (X), percebeu-se que as amostras 01 e 04 apresentaram a maior concentração celular, com valores de 47,55 g/L e 44,63 g/L, respectivamente. A amostra 05 apresentou uma menor curva de crescimento celular com concentração de 30,55 g/L. Até 3 horas de fermentação houve um crescimento celular acelerado em fase exponencial para todas as espécies, após esse período pode-se visualizar uma estabilização do crescimento.

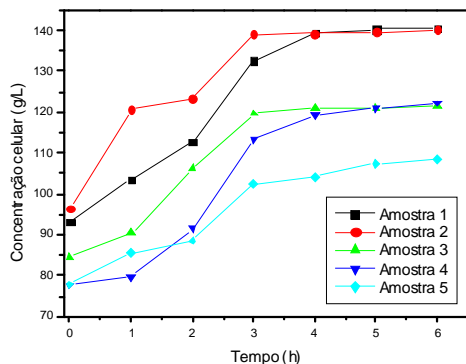


Figura 2. Concentração Celular versus o tempo de fermentação.

Durante o processo fermentativo foi observado o comportamento cinético do consumo dos açúcares redutores presentes no meio de fermentação alcoólica. Verificou-se que houve consumo de açúcares redutores presentes no suco de caju durante o cultivo. Figura 3, porém através do método utilizado não é possível determinar se o microrganismo consumiu os dois açúcares predominantes no suco de caju (glicose e frutose). Ressalta-se que no caldo nutritivo (suco de caju), não se adicionou açúcares redutores. A glicose analisada presente no meio (suco de caju) foi utilizada até uma concentração de 2,71 %, 3,26 %, 1,75 %, 2,82 %, 1,36 % em 5 horas de fermentação, para cada espécie de caju (amostras 01, 02, 03, 04 e 05) analisada, respectivamente.

A Figura 3 apresenta o consumo de substrato em função do tempo para o cultivo em suco de caju, observa-se semelhança nas amostras (amostras 01 e 02), onde o consumo do açúcar é lento no intervalo de 1 hora do início da fermentação, seguido por uma redução entre os tempos de 1 a 3 horas e se mantendo estável após as 3 horas de cultivo. As amostras 03, 04 e 05 apresentaram uma redução do substrato semelhante até as 3 horas de fermentação, após esse tempo não houve variação da redução do açúcar analisado. Podendo ser explicado talvez pela grande concentração de levedura para uma

quantidade de glicose insuficiente para seguir uma fermentação de 5 horas.

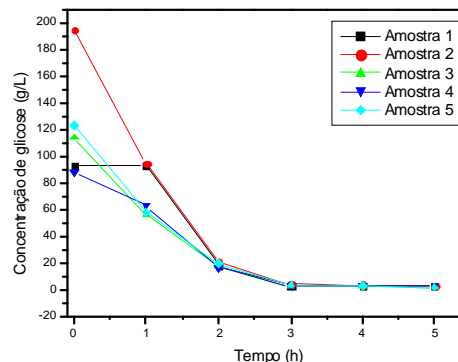


Figura 3. Substrato em função do tempo para o cultivo em meio contendo apenas suco de caju.

Analisando a Figura 4, verificou-se que a formação do produto apresenta maior produtividade nas primeiras horas de fermentação, ocorrendo a partir da terceira hora uma tendência à estabilização da produção de etanol, devido ao esgotamento de substrato e a desaceleração do crescimento microbiano. De acordo com o gráfico o desempenho das amostras em relação à produtividade de etanol segue a seguinte sequência 04, 01, 03, 02, 05.

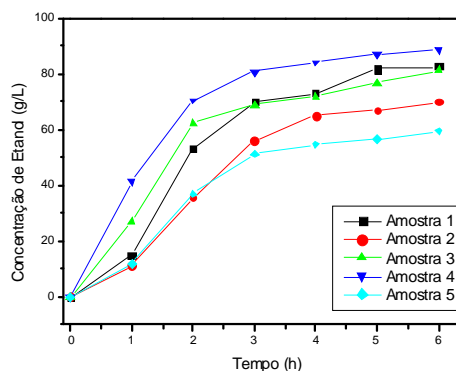


Figura 4. Produto em função do tempo para o cultivo.

3.1. Monitoramento Cinético



Analisando os resultados obtidos para as velocidades específicas de consumo de substrato (S) (Figura 5), crescimento de biomassa (X) (Figura 6) e formação de produto (etanol) (P) (Figura 7), em g/L, em função do tempo de fermentação para cada amostra analisada, calculadas pelas equações (1), (2) e (3), pode-se observar que todas apresentaram comportamentos semelhantes. Desta forma pode-se dizer que, em todos os casos avaliados, a formação do produto está associada ao crescimento.

Segundo Schmidell *et al.* (2001) esta configuração apresenta o caso em que o produto formado (metabólito primário) está diretamente ligado às reações do catabolismo ou decomposição do substrato.

Na Figura 5, observou-se que as velocidades específicas de consumo de substrato para cada clone de caju analisado cresce durante a primeira hora nas amostras: 03, 02 e 05. Para a amostra 04, a velocidade específica de produção de etanol é crescente até duas horas após o início da reação.

Na amostra 01, a velocidade específica de produção de etanol atinge um máximo após duas horas do início do processo fermentativo. Pelos resultados apresentados na Figura 7, verificou-se que ocorreu uma diminuição da velocidade específica de formação do produto após duas horas de fermentação. A partir da quarta hora de cultivo, não ocorreu variação nas velocidades específicas de fermentação para as amostras analisadas.

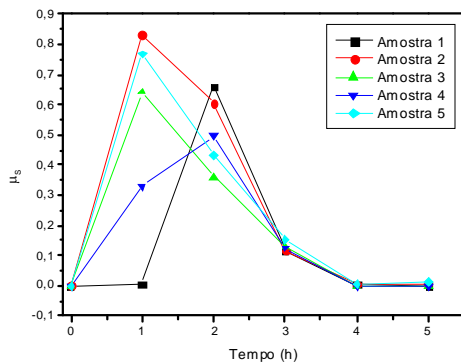


Figura 5. Velocidades específicas de consumo do substrato versus tempo de fermentação para cada clone de caju analisado.

Analisando os perfis de velocidade de crescimento celular para as cinco amostras Figura 6, avaliou-se que estas apresentaram velocidade máxima de crescimento em duas horas de fermentação, com exceção da amostra 02, que apresentou um pico na primeira hora de fermentação. Em todos os casos, a tendência à estabilização da concentração celular ocorreu a partir da quarta hora de fermentação (Figura 2), fato que se confirma, analisando as velocidades de consumo de substrato (Figura 5) e a formação de produto (Figura 7), que apresentaram fase de estacionária de crescimento neste período, no qual os valores de velocidades se aproximaram de zero.

O caju foi relatado para ser bom produtor para a produção de bebidas e no qual a produção comercial começou na Índia (Osho and Odunfa, 1999). Assim, as cepas de leveduras deverão ser adequadas para a produção de bebida, onde os níveis de álcool desejado são entre 11 e 12% (Osho, 2005).

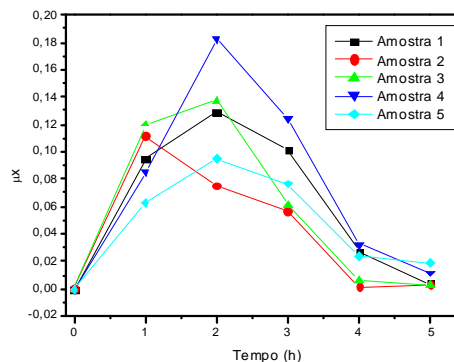


Figura 6. Velocidades específicas de crescimento celular versus tempo de fermentação para cada clone de caju analisado.



De acordo com a Figura 7, observou-se que as velocidades específicas de formação de produto para cada clone apresentaram velocidade máxima na primeira hora de fermentação, enquanto que as amostras 03 e 04 tiveram um declínio até o período de 4 a 5 horas de fermentação onde a estabilização e os valores se aproximaram de zero. As demais espécies apresentaram um período de uma hora de constância (entre a primeira hora de fermentação e a segunda) na velocidade até o declínio e estabilização final.

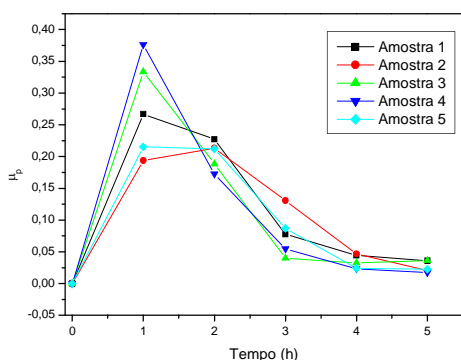


Figura 7. Velocidades específicas de formação de produto versus tempo de fermentação para cada clone de caju analisado.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a amostra 04 apresentou uma maior produção de etanol e uma maior velocidade de crescimento celular em relação às demais amostras, em contrapartida obteve um maior crescimento da biomassa e não consumiu toda a glicose presente no meio de cultivo (suco de caju), apresentando menor velocidade de consumo de substrato. No entanto, concluiu-se que esta espécie de caju apresentou um melhor perfil de fermentação por ter obtido uma maior concentração de produto final.

5. REFERÊNCIAS

ALENCAR, E. M. B.; SOUZA-MOTTA, C.M.; WALTER, B. S.; SANTOS, R. M. P.; MARQUES, O. M.; QUEIROZ, L. A. Fermentation capacity of *saccharomyces cerevisiae* cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v. 52, n. 4, p. 819-824, July/Aug., 2009.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C; URBANO, L. H. Fermentação alcoólica de substrato amiláceo hidrolisado enriquecido com melão de cana. *Ciênc. agrotec.*, v. 31, n. 2, p. 429-432, mar./abr., 2007.

GONÇALVES, M. L. S. S.; *Métodos Instrumentais para análises de soluções. Análise Quantitativa.* 3ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996.

HONORATO, T. L.; RABELO, M. C.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 27, n. 2, p. 254-258, abr.-jun. 2007.

MILLER, G. L.; "Use of dinitrosalicyllic acid for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.* 11, 426-428, 1959.

NIRMALA, M. E MORALIKRISHNA, G., "Three α -amylase from malted finger millet (Ragi, *Eleusine coracana*, Indaf- 15) - Purification and partial characterization." *Phytochemistry* 62, 21-23, 2003.

OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.

OSHO A. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *Adv. African Journal of Biotechnology.* Vol. 4 (7), pp. 660-662, 2005.

OSHO A, ODUNFA S. A. Fermentation of cashew juice using the wine yeast strain



NCYC 125 and three other isolated yeast strains. *Adv. Food Sci.* 21(½): 22-27, 1999.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. Vol.1. Pelotas – RS: EDUPPel, 330p., 1996.

SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial-Engenharia Bioquímica*. v. 2, São Paulo: Blucher, 2001.

SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. *Quim. Nova*, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008

TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*anacardium occidentale* L.). *Quim. Nova*, v. 29, n. 3, p. 489-492, 2006.