

## Aproveitamento Biotecnológico da Graviola na Elaboração de Bebida Alcoólica Fermentada Utilizando Levedura Imobilizada em Alginato de Cálcio

## Aprovechamiento Biotecnológico de la Guanabana en la Elaboración de Bebidas Alcohólicas Fermentadas Utilizando Levedura Inmovilizada en Alginato de Calcio

### AUTORES AUTHORS

✉ **Lílian Pantoja**<sup>1\*</sup>  
**Roberto Nobuyuki Maeda**<sup>1</sup>  
**Sônia Maria da Silva Carvalho**<sup>2</sup>  
**Jaime Paiva Lopes Aguiar**<sup>1</sup>  
**Flávia Miranda Monteiro**<sup>1</sup>  
**Quezia Alves de Lima**<sup>1</sup>  
**Francisco Gessy de Mendonça Júnior**<sup>1</sup>  
**Lucia Kiyoko Ozaki Yuyama**<sup>1</sup>  
**Nei Pereira Júnior**<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA,  
Coordenação de Pesquisas em Ciências da Saúde - CPCS,

Av André Araújo, 2936, Aleixo,  
CEP: 69060-001, Manaus-AM, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ.  
e-mail: lpantoja@inpa.gov.br

### RESUMO

La guanabana (*Annona muricata* L.) es un fruto amazónico de pulpa blanca, jugosa, aromática y de sabor agridulce, generalmente es consumida in natura, o en la forma de helados, cremas, dulces, néctares y jugos. El presente trabajo tiene como objetivo la elaboración de bebida alcohólica fermentada de la guanábana, utilizando levadura *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en alginato de cálcio. Con el fin de obtener subsidios en la elaboración de la bebida, el fruto fue caracterizado con respecto a la humedad, pH, acidez total (ACT), proteína total, lípidos, cenizas, compuestos fenólicos (CF), azúcares reductores (AR) y totales (AT). Para la evaluación de la azúcar fermentable y la habilidad fermentativa de la levadura se realizó test en fermentómetro. La fermentación por proceso discontinuo fue dirigida durante 48 h a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  e para comparación el proceso fue dirigido con levaduras libres. La experimentación con células libres e inmovilizadas fueron monitoreadas a cada 4 h con relación al pH, ACT, CF, AR y AT, y al final del procedimiento el etanol. Después de la fermentación se realizó la filtración, seguida del envasamiento y pasteurización a  $70 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 min. La bebida fue mantenida a  $1 \pm 1^\circ\text{C}$  durante ocho meses. Al final de este periodo la bebida fue pasteurizada a  $85 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 3 min y entonces evaluada con relación al pH, Acidez total, fija y volátil, y etanol. Con relación a la caracterización, el fruto, mostró expresiva cantidad de humedad con  $80,57 \pm 0,45$  y ART  $13,98 \pm 0,54\%$ , siendo 95,96% de los azúcares fermentables. El proceso de fermentación dirigido con las células inmovilizadas se mostró ventajoso cuando comparada con las células libres, mostrando eficiencia fermentativa superior en 13,84%. Las bebidas obtenidas se mostraron claras, sin sólidos en suspensión y con un aroma exquisito característico de la fruta, con esto se concluye que esta tiene un potencial biotecnológico para la producción de bebidas alcohólicas en escala industrial.

### RESUMEN

A graviola (*Annona muricata* L.) é um fruto amazônico de polpa branca, suculenta, aromática e sabor agridoce a doce. Geralmente é consumida in natura, ou na forma de sorvetes, cremes, doces, néctar e sucos. O presente trabalho teve por objetivo elaborar bebida alcoólica fermentada a partir deste fruto, utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. A fim de se obter subsidios importantes na elaboração da bebida, o fruto foi caracterizado quanto ao teor de umidade, pH, acidez total, proteína total, lípidios, cinzas, CF, Açúcares AR e AT. Para se avaliar a concentração de açúcares fermentáveis e a habilidade fermentativa da levedura realizou-se testes em fermentômetro. A fermentação em batelada simples foi conduzida por 48 horas à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . O processo, para fins comparativos, também foi conduzido com leveduras livres. Os experimentos com células livres e imobilizadas foram monitorados a cada quatro horas quanto ao pH, acidez total, CF, AR e ART. O etanol foi quantificado pelo método do dicromato ao final do processo. Após a fermentação procedeu-se a filtração seguida do envase e pasteurização a  $70^\circ\text{C}$  por 5 minutos. A bebida foi mantida a  $1 \pm 1^\circ\text{C}$  por oito meses. Ao final deste período a bebida foi pasteurizada a  $85 \pm 1^\circ\text{C}$  por 3 minutos e então, avaliada quanto ao pH, acidez total, fixa e volátil, e etanol. Quanto à caracterização, o fruto apresentou umidade de  $80,57 \pm 0,45\%$ ; pH  $3,53 \pm 0,00$ ; acidez total  $1,27 \pm 0,06\%$ ; proteína total  $0,88 \pm 0,00\%$ ; lípidios  $0,15 \pm 0,01\%$ ; cinzas  $0,71 \pm 0,00\%$ , CF  $352,01 \pm 42,52$  mg/100g e ART  $13,98 \pm 0,54\%$ , sendo destes 95,96 % fermentáveis. O processo fermentativo conduzido com células imobilizadas revelou-se vantajoso frente ao com células livres, apresentando eficiência fermentativa 13,84 % superior. As bebidas obtidas apresentaram-se clara, sem sólidos em suspensão e com aroma agradável característico do fruto, concluindo-se ter este fruto potencial biotecnológico para produção de bebida alcoólica em escala industrial.

### PALABRAS CLAVE KEY WORDS

fruto amazônico; bebida fermentada;  
*Saccharomyces cerevisiae*; imobilização; alginato de cálcio. /  
fruto amazônico; bebidas fermentadas; *Saccharomyces*  
*cerevisiae*; inmovilización; alginato de calcio.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Amazonía posee la mayor biodiversidad del planeta y algunos de sus componentes tienen potencial para la exploración sustentable, contribuyendo de forma significativa para la mejoría de las condiciones socio-económicas de la región. Entre estos componentes, encontramos innumerables variedades de frutas, que a pesar de que poseen grande valor nutritivo y comercial, se encuentran sub-utilizadas. Entre estos frutos se encuentra la guanábana, conocida por su inigualable sabor y aroma, y excelente potencial tecnológico.

Productos biotecnológicos vienen ocupando varios segmentos del mercado de alimentos, tales como, el de bebidas, que crece día a día, en busca de nuevos sabores. El proceso para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas a partir de los frutos amazónicos todavía son pocos estudiados. No obstante, por ser un proceso ya establecido, posibilita la innovación de tecnologías para la obtención de bebidas alcohólicas. Diversos frutos tropicales han sido utilizados como materia prima en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas, tales como: el chontaduro (*Bactris gasipaes*) (PANTOJA, 2000; PANTOJA et al., 2001); camu-camu (*Myrciaria dubia*) (MAEDA & ANDRADE, 2003); sirgüela amarilla (*Spondias mombin*) (DIAS, 2001; DIAS et al., 2003); cacao (*Theobroma cacao*) y cashu (*Anacardium occidentale*) (FAÇANHA, 1998; Dias, 1996) todos utilizando levadura en la forma libre. KOUKOUTAS et al. (2003) mencionan que la utilización de células inmovilizadas en la fabricación de bebidas, por fermentación, viene despertando interés, principalmente en función del bajo costo de los soportes. Según ŠMOGROVIĚOVÁ & DÖMÉNY (1999) el sistema de inmovilización aumenta la productividad, mejora la economía del bioproceso, además de influenciar en el metabolismo de levadura y consecuentemente en el flavor. JAMAI et al. (2001) citan, que existen varios aspectos ventajosos con relación al sistema de células libres, entre éstos, la facilidad de separación de células del medio. SANCHEZ (1995), refiere que la inmovilización celular en alginato de calcio, además de mostrar bajo costo es un proceso simple y permite la manutención celular. En los últimos años se tiene registro de varias pesquisas que utilizan este sistema en la elaboración de bebidas como vino, cerveza y champaña (VAN IERSEL et al., 1999; FERRARO, 2000; NEDOVIC et al., 2000). No obstante, en lo que se refiere a la elaboración de bebida alcohólica fermentada a partir de frutos amazónicos, se trata de una innovación. En este sentido proponemos la elaboración de bebida alcohólica fermentada a partir de la guanábana, utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada en alginato de calcio.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Guanabana

Los frutos fueron adquiridos con grado de maduración comercial en la galería de la Panair ManausAM, y procesados en el Laboratorio de Nutrición y Físico-química del Instituto Nacional de Pesquisas de la Amazonía INPA, donde fue retirada la pulpa de forma manual y triturada en licuadora semi-industrial (Marca SIEMSEN). Después fueron acomodados en bolsas plásticas y almacenados en congeladores a -18 °C.

### 2.2 Levadura

En el presente estudio se utilizó levadura de panificadora *Saccharomyces cerevisiae*, como agente del proceso fermentativo en la forma de fermento biológico seco.

### 2.3 Caracterización de la materia prima

Una muestra de la pulpa fue liofilizada (Marca EDWARDS) y caracterizada con respecto a la concentración de humedad, proteínas totales, lípidos, cenizas, pH, acidez total titulable y sólidos solubles según IAL (1985); compuestos fenólicos (CLIFFE et al., 1994) y azúcares totales y reductores de acuerdo con el método de Somogy-Nelson (SOUTHGATE, 1991).

### 2.4 Preparación de la Inoculación

La levadura comercial *S. cerevisiae* en la concentración de 0,5 % del volumen total del mosto, fue rehidratada en agua destilada y esterilizada durante 30 minutos. En la cuantificación celular fue utilizado el método de conteo directo en el microscopio en cámara de Neubauer y su viabilidad celular fue determinada con el uso de azul de metileno 0,1 % (ALVES & MORAES, 1998).

### 2.5 Soporte y Inmovilización Celular

Para la inmovilización celular, la levadura, en la concentración de 0,5 % del volumen del mosto, fue rehidratada y después de 30 minutos, se le adicionó Na-alginato al 2 %. La mixtura fue colocada gota a gota en  $\text{CaCl}_2$  0,1 M y las bolitas formadas, mantenidas bajo refrigeración durante la noche. Enseguida, las bolitas fueron lavadas con agua destilada y usadas inmediatamente.

### 2.6 Fermentación Piloto

Para la adecuación de la metodología y evaluación de la habilidad fermentativa de la levadura se realizó preliminarmente teste en el fermentómetro. El cual fue realizado en frasco Erlenmeyer de 500 mL, añadiéndole 200 g de pulpa y 200 mL de agua y 0,5 % de la levadura *S. cerevisiae* en la forma libre, rehidratada en agua destilada estéril y 500 bolitas en el sistema con levaduras inmovilizadas. Enseguida, a los sistemas se les acopló un fermentómetro, aparato que posibilita acompañar el proceso fermentativo por medio del desprendimiento de  $\text{CO}_2$ . Antes de la iniciación y al final del proceso, el mosto fue evaluado cuanto a la concentración de azúcares totales y reductores. En el final del proceso se evaluó también la concentración del etanol por el método del dicromato (A. O. A. C., 1998). El experimento fue realizado en tres veces.

### 2.7 Bioreactor

El bioreactor fue constituido de vasijas cilíndricas en acrílico, geoméricamente iguales, con capacidad nominal para 5 L y adaptados con grifo para la retirada de muestras del material fermentado para la determinación analítica (triplicada)

de las variables del proceso. En los sistemas conducidos con células inmovilizadas en la extremidad interna de la grifo había una tela de acero inoxidable con malla de 1 mm, con la finalidad de evitar la salida de las bolitas durante la coleta del material.

## 2.8 Preparación del mosto de la guanabana

Para la preparación del mosto, la pulpa fue descongelada en temperatura ambiente (221 °C), trasladada para el bioreactor y entonces, se le añadió agua esterilizada en la proporción de 1:4 (pulpa:agua). El mosto fue capitalizado, añadiéndole un jarabe de sacarosa elaborado con azúcar cristal, en concentración suficiente para obtenerse concentración alcohólica de 5,5 % (v/v), siendo añadido a el mosto, todavía caliente.

## 2.9 Proceso Fermentativo

La fermentación por proceso discontinuo simples fue realizada, tanto con células libres cuanto con inmovilizadas, siendo conducidas durante 36 horas a 201 °C. El sistema de células libres fue inoculado de  $3,88 \times 10^{10}$  células y 10000 bolitas en el sistema inmovilizado.

Durante el proceso de fermentación a cada cuatro horas fueron retiradas muestras para la determinación del pH, acidez total (A. O. A. C. 1998), compuestos fenólicos (CLIFFE et al., 1994), azúcares totales y reductoras (SOUTHGATE, 1991). Al final del proceso se evaluo también la concentración de etanol (A. O. A. C. 1998); el rendimiento del producto (Yp/s), el cual es calculado basado en los valores de consumo de azúcares y etanol producido, expresados en gramas de etanol por gramas de sustrato (gP/gS) y la eficiencia de la fermentación por la relación entre el rendimiento obtenido y lo teórico (0,511) multiplicado por 100. El experimento fue realizado en dos repeticiones y en las analices triplicadas.

Para analizar los datos del proceso fermentativo los resultados de las analices físico-químicas fueron sometidos a analices de variación, esquematizada en parcelas subdivididas. La comparación de las medias fue realizada por medio del teste de Tukey.

### 2.9.1 Trasega y Filtración

Al completar 36 horas las bebidas fueron cernidas en malla de 1,5 mm, y acondicionados en botellas de 3 L; pasteurizados a 701° C durante 5 minutos y después del enfriamiento en baño de agua con hielo, almacenadas bajo refrigeración a 11° C. durante ocho meses; siendo que a cada dos meses fue realizada una trasega. Al final de este periodo las bebidas fuero filtradas a vacuo en frasco Kitasato, utilizándose embudo de Büchner conteniendo una fina camada de algodón esterilizada. Después de ser transferidas para las botellas de 1L fueron sometidas a pasteurización a 851 °C por tres minutos y enseguida refrigeradas a 11° C.

### 2.9.2 Ensayos Analíticos de las Bebidas

Considerando que la legislación para las bebidas

alcohólicas fermentadas de frutas no establece parámetros analíticos para tal bebida, las evaluaciones realizadas fueron basadas en los parámetros descritos en el Instituto Adolfo Lutz-IAL (1985), el cual resalta que bebida alcohólica fermentada de frutas pueden ser evaluadas de la misma forma que el vino , hecho comprobado por otros autores en la realización de trabajos con bebidas alcohólicas fermentadas de frutas (DIAS et al., 2003; CORRAZA et al., 2001).

Después de ocho meses de maduración, las bebidas fueron evaluadas cuanto al pH, acidez total, fija y volátil, y extracto seco, según IAL (1995); azúcares totales y reductores (SOUTHGATE, 1991) y etanol por titulometría.

### 2.9.3 Investigación Preliminar de los compuestos sensoriales

Las bebidas obtenidas fueron sometidas a testes preliminares de aceptabilidad de acuerdo con FARIA & YOTSUYANAGI (2002).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Caracterización física y físico-química de la pulpa

Los frutos utilizados mostraron una media de 697,9255,55 g en el peso y una media de 14,412,56 cm en la anchura y 10,311,23 cm de diámetro en la parte mas larga. Después de retirarse la pulpa del fruto de forma manual, se obtuvo un buen rendimiento de 71,134,97%.

La media de los resultados de las evaluaciones físico-químicas, se encuentran en la Tabla 1. La guanábana es un fruto con considerable contenido de agua (80,57 %) y baja

**Tabla 1** Caracterización físico-química de la pulpa de la guanábana utilizada en la elaboración de bebida alcohólica fermentada. Valores expresado en materia fresca.

Determinación	Media ± DP
Humidade (g/100g)	80,57 ± 0,45
Materia Seca (g/100g)	19,43 ± 0,45
Proteína Totales (g/100g)	0,88 ± 0,00
Lipídios (g/100g)	0,15 ± 0,01
Ceniza (g/100g)	0,71 ± 0,00
pH	3,53 ± 0,00
Acidez Totales (g/100g)	1,27 ± 0,06
Azúcares Reductores (g/100g)	13,77 ± 0,24
Azúcares no Reductores (g/100g)	0,21 ± 0,00
Azúcares Totais (g/100g)	13,98 ± 0,54
Compuestos Fenólicos (mg/100g)	352,01 ± 42,52

concentración de proteína, lípidos y cenizas. Con relación a el pH y acidez los valores los caracterizan como ácido. No obstante, este fruto presenta un contenido de azúcar considerable (13,98 g/100g), la cual lo señala como una materia prima interesante para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas, una vez que exige una menor corrección del mosto cuanto a la concentración de azúcar. Con respecto a los compuestos fenólicos, importantes componentes en la enología, la cual se relaciona directa o indirectamente con calidad de los vinos (CABRITA et al., 2003), los valores obtenidos son menores a los encontrados por Maeda (1999) en la pulpa de camu-camu (*Myrcyaria dubia*) (984,0 mg/100 g) y superiores a los encontrados por DIAS et al. (2003) en la pulpa de sirgüela amarilla (*Spondias mombin*), ambos frutos tropicales ya fueron utilizados en la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas.

### 3.2 Fermentación piloto

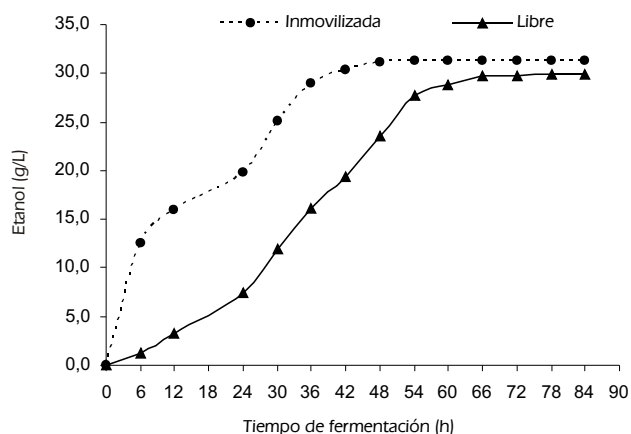
Considerando que la levadura puede presentar diferentes comportamientos y desempeño con relación a la peculiaridad de diferente materia prima, el estudio en fermentómetro nos permitió evaluar el comportamiento de los agentes fermentativos en la forma libre e inmovilizada con relación a las condiciones del sistema al que fueron sometidos. En la Tabla 2, se encuentran algunos aspectos analíticos del sistema, donde se observó que de la concentración total de

azúcar existente en la pulpa de la guanábana, 98,24 %, son fermentables. El hecho de saber el porcentaje real de azúcar fermentable contribuyó para la corrección del mosto con mayor exactitud. En la Figura 1, se encuentra el perfil de la producción del etanol por la levadura en forma libre e inmovilizada. En la cual se observó, todavía, que levadura, en la forma inmovilizada tiene mejor adaptabilidad porque convierte mas rápidamente el sustrato en producto (etanol). No obstante, después de 48 horas de fermentación, ambos procesos presentaron comportamientos semejantes, con valores de etanol próximos.

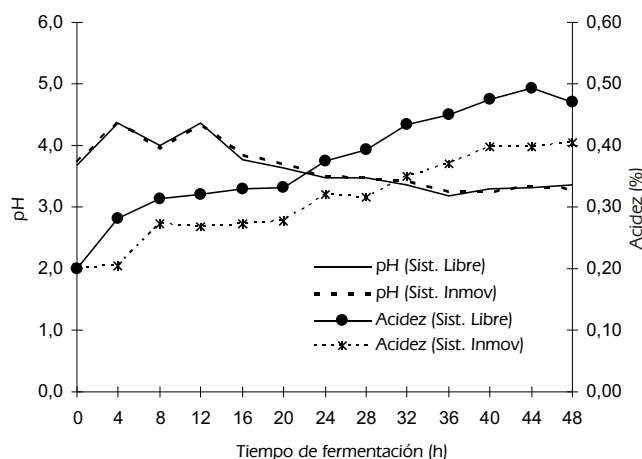
### 3.3 Proceso Fermentativo

El proceso fermentativo conducido con células inmovilizadas en alginato de calcio se muestran ventajosas frente a aquel conducido con células libres, no solamente por posibilitar el trabajo con altas concentraciones celulares, lo que implica en altas tasas de conversión del sustrato en productos, principalmente, por la facilidad en la filtración durante la obtención de la bebida, contribuyendo considerablemente para un mayor rendimiento de la bebida, siendo, aproximadamente 25,13 % superior al obtenido en procesos con levaduras libres. Además de esto, la bebida obtenida por el sistema que utiliza células inmovilizadas mostró mayor limpieza. Este hecho puede ser atribuido a el confinamiento de las células en el sistema inmovilizado que impide el paso de

**Figura 1** Evolución del etanol teórico durante el proceso fermentativo con células libres e inmovilizadas en el sistema, utilizando fermentómetro.



**Figura 2** Evolución del pH y acidez total durante el proceso fermentativo con células libres e inmovilizadas.



**Tabla 2** Concentración de azúcar inicial y residual en el mosto de la guanábana, oriundo del teste en fermentómetro, con su respectiva concentración de etanol y azúcares fermentables.

Levadura	Azúcares Totales (%)		Azúcares Reductores (%)		Azúcares Fermentables (%)	Etanol Final (g/L)	Etanol Teórico (g/L)
	Inicial	Residual	Inicial	Residual			
Libre	6,99±0,27	0,34±0,01	6,88±0,12	0,20±0,00	95,14	25,96	33,92
Inmovilizada	6,99±0,27	0,123±0,06	6,88±0,12	0,77±0,02	98,24	26,51	35,10

estas para la fase móvil, donde esta contenido o substrato y el producto (SANCHEZ, 1995), evitando la presencia de grande masas celulares en la bebida. La pureza obtenida, se constituye en un importante paso para la aceptación de la bebida en relación al aspecto visual, una vez que, la turbidez en bebidas se constituye en un factor de rechazo. Según WENDHAUSEN et al., (2001) e KOURKOUTAS et al., (2001) comparando el sistema con células libres e inmovilizadas, este ultimo ha mostrado mas ventajas técnicas y económicas cuando es usado con la misma finalidad, tal como la producción de bebidas alcohólicas. Una de las ventajas del soporte utilizado es su inofensibilidad y la simplicidad de la operación, que es realizado en condiciones suaves propiciando el mantenimiento de la viabilidad celular.

Con relación a los aspectos analíticos del proceso fermentativo, los resultados muestran que el pH y acidez total, durante el proceso fermentativo presentaron comportamientos semejantes en los sistemas con células libres e inmovilizadas (Figura 2). Sabemos que estos componentes son importantes para la calidad de la bebida, pues, pueden afectar la estabilidad biológica como la química, influyendo en la característica final del producto (ZOECKLEIN et al. 2001), en relación al pH se observo que no hubo diferencia significativa entre los sistemas estudiados, en un nivel de 5 % de significancia, lo contrario de acidez total, que en un sistema con células inmovilizadas presento valores de acidez inferiores, siendo significativamente diferentes. No obstante, los valores finales obtenidos de pH esta en la etapa de normalidad utilizada para vinos (3 a 4). El aumento gradual de la acidez durante el tiempo de fermentación, probablemente esta relacionado a la formación de ácidos orgánicos que ocurren normalmente durante el

**Tabla 3** Composición físico-químico de las bebidas alcohólicas fermentadas de guanábana, elaboradas con células libres e inmovilizadas.

Determinación	Livres	Inmovilizadas
pH	3,7400,01 <sup>a</sup>	3,590,01 <sup>b</sup>
Acidez total (g/100mL)	0,444 0,01 <sup>a</sup>	0,39 0,02 <sup>b</sup>
Acidez fixa (g/100mL)	0,400 0,006 <sup>a</sup>	0,350 0,007 <sup>b</sup>
Acidez volátil (g/100 mL)	0,040 0,005 <sup>a</sup>	0,024 0,002 <sup>b</sup>
Extrato seco (g/100 mL)	1,4040,068 <sup>b</sup>	1,8000,016 <sup>a</sup>
Açúcares Totales (g/100 mL)	0,1070,006 <sup>b</sup>	0,6740,031 <sup>a</sup>
Açúcares reductores (g/100 mL)	0,0780,001 <sup>b</sup>	0,5400,008 <sup>a</sup>
Etanol (mL/100mL)	4,210,25 <sup>b</sup>	4,660,66 <sup>a</sup>

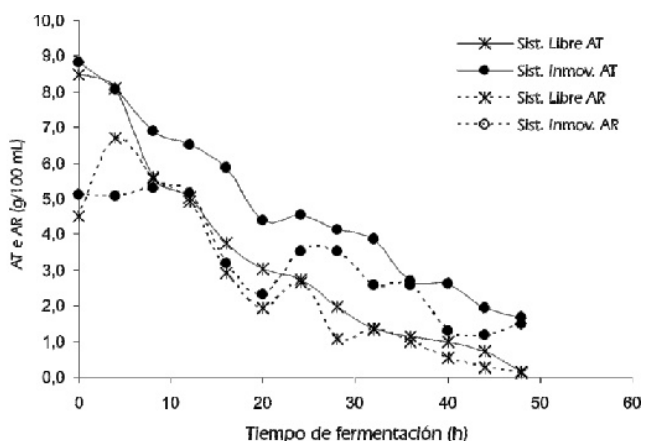
Letras iguales en la misma línea no presentaron diferencias estadísticas significativas (p<0,05).

**Tabla 4** Frecuencia de respuesta de las notas atribuidas por los 35 evaluadores a las bebidas alcohólicas fermentadas de guanábana, elaboradas con células libres e inmovilizadas.

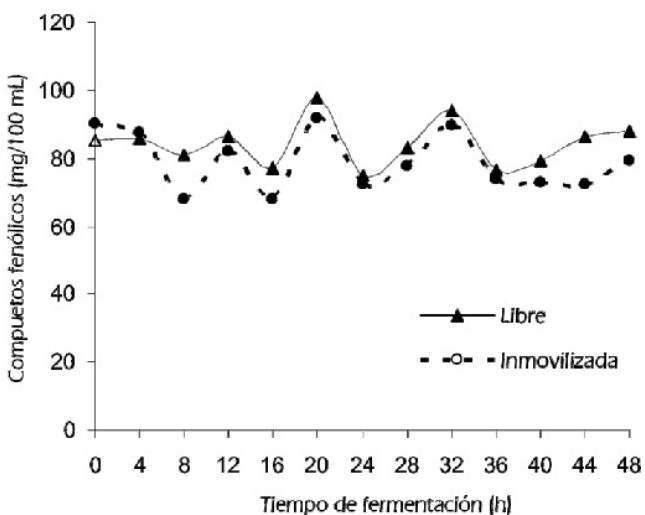
Tratamientos	Score (Media DP)	Frecuencia de respostas (%)	
		Valores 4	Valores 6
Libre	5,50 1,71	26,47	58,82
Inmovilizada	6,44 1,33	5,88	79,41

proceso fermentativo. Con relación a los azúcares totales y reductores (Figura 3) se observo un eficiente consumo de los azúcares en ambos procesos. A pesar, que se verifico que hubo diferencia estadística entre los sistemas estudiados, siendo que el azúcar total, se mantuvo superior en los sistemas con células inmovilizadas, durante todo el periodo de fermentación, constatándose un mejor desempeño de las levaduras en la forma libre. Con relación a los compuestos fenólicos se observo un comportamiento semejante durante el proceso fermentativo (Figura 4). Todavía, hubo diferencias significativas (p<0,05) entre el sistema libre e inmovilizado. Al finalizar, el proceso fermentativo, las concentraciones de compuestos fenólicos, se mostraron superiores a los normalmente encontrados en los vinos blancos e inferiores a los vinos tintos (CATALUÑA, 1988). En cuanto al rendimiento del producto (Yp/s) se obtuvo 0,397 gP/gS, cuando se utilizo el sistema con células libres y 0,450 gP/gS en el sistema inmovilizado y

**Figura 3** Evolución de los azúcares totales (AT) y reductores (AR) durante el proceso fermentativo con células libres e inmovilizadas.



**Figura 4** Evolución de los compuestos fenólicos durante el proceso fermentativo con células libres e inmovilizadas.



eficiencia fermentativa de 77,69 % y 88,45 %, respectivamente. A pesar del consumo del substrato del sistema con células libres haber sido mayor que en el inmovilizado, los datos de rendimiento en el producto y en la eficiencia fermentativa, sugiere que en el primer sistema, grande parte del substrato fue utilizado para la manutención y crecimiento celular.

### 3.4 Bebidas

La caracterización físico-química de la bebida se encuentra en la Tabla 3. Se observo que hubo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos sistema para todos los analisis realizados. Con respecto, a la acidez volátil se observo que los valores obtenidos en ambos sistemas se encontraron dentro de los limites establecidos para vinos (BRASIL, 1997) y próximos a los 0,03 g/100 mL, encontrados por DIAS et al. (2003) en bebidas fermentadas de sirgüela amarilla, indicando la buena sanidad del producto. Los valores de extractos secos, obtenidos en las bebidas de cuestión, cuando se comparan con los establecidos para vinos, las bebidas se clasifican como leves. En relación a los aspectos de la bebida, se observo que aquella elaborada con célula libre se mostró turbia, inclusive, después de la filtración, indicando que probablemente habría células en suspensión. A pesar que las bebidas fueron elaboradas de una fuente no convencional, se mantuvieron las características intrínsecas de la materia prima utilizada. Obteniéndose bebidas con sabor y aroma, agradables y característicos de la fruta. Este hecho, fue confirmado por análisis sensorial, revelando una buena aceptación para las bebidas elaboradas en los diferentes sistemas, siendo 71,57 % para el sistema inmovilizado y 61,11 % para un sistema con células libres. En la Tabla 4, se encuentra un porcentaje de notas atribuidas por los evaluadores durante la evaluación sensorial, donde se observa que la bebida elaborada por el sistema inmovilizado, solamente 5,88 % de los degustadores no manifestaron una buena aceptación.

## 4. CONCLUSIONES

Basados en los resultados obtenidos, se concluye que:

La materia prima utilizada es apropiada para la producción de bebida alcohólica fermentada.

El uso de fermentómetro es eficiente para la evaluación preliminar del comportamiento de la levadura, frente al substrato y de las condiciones físico-químicas ofrecidas en el proceso.

La técnica de inmovilización es adecuada para el proceso de la elaboración de la bebida alcohólica fermentada de la guanábana, y el uso de ese proceso puede contribuir para un mejor rendimiento en el producto y mayor eficiencia fermentativa.

La técnica de inmovilización no interfiere en las peculiaridades de la bebida en cuestión, y puede ser empleada industrialmente para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas de frutas.

Las bebidas producidas independientemente del sistema utilizado, presentaron una buena calidad con un exquisito aroma y delicioso sabor.

## 5. BIBLIOGRAFIA

ALVES, S. B., MORAES, S. A. Quantificação do inóculo de patógenos de insetos. In: ALVES, B. S. Controle Microbiano de Insetos. Piracicada. Ed. FEALQ, 2 ed., 1998. p.765-777.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-A.O.A.C. Official methods of analysis. 16 ed. Washington, v.2, 1998. 1190p.

BRASIL. Decreto n. 2314, de 4 de setembro de 1997, que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. In: <<http://www.Agricultura.gov.br>>. 2002.

CABRITA, M. J., RICARDO-DA-SILVA, J., LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. I Seminário Internacional de Vitivinicultura. In: <<http://www.isa.utl.pt>> 2003.

CATALUÑA, E. As uvas e os vinhos. Rio de Janeiro, Ed. GLOBO, 2 ed. 1988. 207 p.

CLIFFE, S., FAWER, M. S., MAIER, G., TAKATA, K., RITTER, G. Enzymes assays for the phenolic content of natural juices. *Jornal Agricultural Food Chemistry*, v. 42, p. 1824-1828. 1994.

CORAZZA, M. L., RODRIGUES, D.G., NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. *Quím. Nova*, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.

DIAS, A.L.M. Influência de diferentes cepas de leveduras e mostos na formação dos compostos voláteis majoritários em vinho de caju (*Anacardium occidentale*, L.). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, UFC, 1996, 94 p.

DIAS, D. R. Aspectos gerais da fruticultura tropical, enotecnologia e biotecnologia de fermentação. 2001. 130 p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Lavras, UFLA, 2001, 130 p.

DIAS, D. R., SCHWAN, R. F., LIMA, L. C. O. Metodologia para elaboração de fermentado de cajá (*Spondias mombin* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 23, n. 3, p. 342-350, 2003.

FAÇANHA, S. H. F. Estudo dos parâmetros cinéticos básicos da fermentação alcoólica do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) clarificado. 1998. 119p. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, UFC, 1998, 119 p.

FARIA, E.V., YOTSUYANAGI, K. Técnicas de análise sensorial. *Ital/Lafise*, 2002. 116 p.

FERRARO, L., FATICHENTI, F., CIANI, M. Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1125-1129, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ-IAL. Normas Analíticas - métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. v.1. São Paulo. 1985. 317p.

JAMAI, L., SENDIDE, K., ETTAYEBI, K., ERRACHIDI, F., HAMDOUNI-ALAMI, O., TAHRI-JOUTI, M. A., MCDERMOTT, T., ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol

fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 204, p. 375-379, 2001.

KOURKOUTAS, Y., KOUTINAS, M., KOUTINAS, A. A., KANELLAKI, M. Wine production using yeast immobilized on apple pieces at low and room temperatures. *J. Agri. Food Chem.*, v. 49, p.1417-1425, 2001.

KOURKOUTAS, Y., KOMAITIS, M., KOUTINAS, A. A., KALIAFAS, A.; KANELLAKI, M., MARCHANT, R., BANAT, I. M. wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C. *Food Chemistry*, p.1-8, 2003.

MAEDA, R. N. Adequação tecnológica do camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh) para produção de vinho. Monografia (Graduação em Agronomia), Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, UFAM, 1999. 58 p.

MAEDA, R. N., ANDRADE, J.S. Aproveitamento do camu-camu (*Myrciaria dubia*) para produção de bebida alcoólica fermentada. *Acta Amazônica*, v. 33. n. 3.p.489-498, 2003.

NEDOVIC, A. V., DURIEUX, A., NEDERVELDE, V. L., ROSSELS, P., VANDEGANS, J., PLAISANTA. M., SIMON, J. P. Continuous cider fermentation with co-immobilized yeast and *Leuconostoc oenos* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 834-839, 2000.

PANTOJA, L. Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Amazonas, UFAM, 2000. 136 P.

PANTOJA, L., MAEDA, R. N., ANDRADE, J. S., PEREIRA JUNIOR, N., CARVALHO, S. M. S., ASTOLF-FILHO, S. Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 3, n. 19, p. 50-54, 2001.

SANCHEZ, E. N. Desempenho de um biorreator com levedura imobilizada na fermentação alcoólica contínua de meio melaço-vinhoto. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, 1995. 93 p.

ŠMOGROVIÈOVÁ, D., DÖMÉNY, Z. Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeast. *Process Biochemistry*, v.34, p. 785-794, 1999.

SOUTHGATE, D. A. T. Determination of food carbohydrates. London.. Ed. Applied Science Publishers LTD. 1991, 177p.

VAN IERSEL, M.F.M., VAN DIEREN, B., ROMBOUTS, F.M., ABEE, T. Flavor formation and cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.24, p. 407-411, 1999.

WENDEHAUSEN, R., FREGONESI, A., MORAN, P. J. S., JOEKES, I., RODRIGUES, J. A. R., TONELLA, E., ALTHOFF, K. Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cell. *Journal of Biocience and Bioengineering*, v. 91, n. 1. p. 48-52, 2001.

ZOECKLEIN, B.W., FUGELSANG, K.C., GUMP, B.H., NURY, F. S. Análisis e producción de vino. Ed. Acribia S.A., 2001. 613 p.

## 6. AGRADECIMENTOS

A la Fundación de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas-FAPEAM, por el auxílio ofrecido a la investigación.