

Estudo de Cinética de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces Cerevisiae* em Mel Diluído

A Study of Alcoholic Fermentation Kinetics by *Saccharomyces Cerevisiae* Cells in Diluted Honey

Neucinéia Vieira Chagas

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Química - Guarapuava - PR

neucineia@pop.com.br

Marcos Roberto da Rosa

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Química - Guarapuava - PR

mrrmarco@yahoo.com.br

Ana Heloisa dos Reis

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Química - Guarapuava - PR

anaheloisareis@yahoo.com.br

Yohandra Reyes Torres

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Química - Guarapuava - PR

yohandra@unicentro.br

Julio Murilo Trevas dos Santos

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Química - Guarapuava - PR

trevas@unicentro.br

Maurício Rigo

Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

Departamento de Engenharia de Alimentos - Guarapuava - PR

mauriciorigo@yahoo.com.br

Resumo: Este trabalho teve como objetivo acompanhar a cinética de fermentação alcoólica de mel diluído em condições de temperatura e pH constantes, porém em meios com composições distintas, estéreis e não estéreis. As fermentações foram acompanhadas por pesagens para determinar indiretamente a massa de CO₂ produzida durante o processo. Os conjuntos de frascos Erlenmeyer nº1 e nº2, que continham a mesma composição nutricional, mas se diferenciam pelo fato de o conjunto nº2 não ser esterilizado, apresentaram a mesma resposta de produção de CO₂ no ensaio em batelada. A composição nutricional do meio do conjunto de frasco nº3 diferenciava-se por ser mais pobre em nutrientes do que a do conjunto de frascos nº1 e nº2. Este procedimento foi adotado para verificação de qual meio resultaria em melhores resultados. A fermentação de mel diluído, por células de *Saccharomyces cerevisiae*, nos conjuntos de frascos nº1 e nº2 em relação ao nº3, teve aumento da velocidade de conversão de substrato a etanol e CO₂ de mais de 60 % durante todo o curso da fermentação. A velocidade de conversão do substrato em CO₂ foi praticamente igual nos conjuntos de frascos nº1 e nº2 durante a fase exponencial da fermentação, ressaltando que não houve alterações consideráveis em meios submetidos à esterilização ou não. O meio nutriente do conjunto de frascos nº3, específico para produção de hidromel, mostrou-se mais lento que os outros dois conjuntos podendo apresentar este comportamento devido ao fato de possuir um meio nutriente mais pobre em sais que os outros conjuntos.

Palavras-chave: fermentação alcoólica em batelada; levedura; mel.

Abstract: The objective of our work has been to observe the alcoholic fermentation kinetic of diluted honey in conditions of same temperature and pH, however in different compositions, namely, sterilized and non-sterilized. The fermentations were followed by weighing, to indirectly determine the CO₂ mass produced during the process. The Erlenmeyer flask sets #1 and #2, which held the same nutritional composition, but were differentiated by the fact that set #2 was not sterilized, presented the same performance response of CO₂ production in the batch essay. The nutritional composition of the Erlenmeyer #03 was unique for having fewer nutrients than the Erlenmeyer #1 and #2. This was done to verify

which culture medium would perform best. The diluted honey fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* cells, in the flask sets #1 and #2, as compared with #3, featured an increase over 60% of the substrate conversion speed into ethanol and CO₂ during all the fermentation time. The conversion rate of substrate into CO₂ was practically the same in the flask sets #1 and #2 during the exponential phase of fermentation. It is noteworthy that there weren't considerable alterations regarding the sterilized and non-sterilized compositions. The nutrient medium of the flasks in set #3, specific for mead production, appeared to be slower than the other two sets, and this performance may have been due to the fact that its nutrient composition was poorer in salts than the other sets.

Key words: alcoholic batch fermentation; diluted honey; yeast.

1 Introdução

Durante toda história e ao redor do mundo, as sociedades descobriram como fazer bebidas fermentadas utilizando fontes de açúcar disponíveis em seus habitats locais. Nos tempos pré-industriais, o mel era a principal fonte de açúcares na dieta de muitos povos. O mel é uma fonte original de açúcares simples, como glicose e frutose (60-80% do seu peso) em climas temperados [1]. Este produto natural pode ser utilizado para obtenção de diversos produtos, entre eles o vinagre de mel e o hidromel (vinho de mel [1]). O hidromel é obtido pela transformação dos açúcares do mel em álcool por um processo de fermentação similar ao do vinho. Hidromel é uma bebida alcoólica tradicional, contendo de 8 a 18% (v/v) de etanol, preparado pela fermentação do mel [2].

Um longo tempo é necessário para a sua obtenção, sendo dependente da variedade do mel fermentado, da levedura utilizada, dos nutrientes fornecidos e do controle do pH [2].

No geral, o vinho produzido do mel não tem sido consumido pelo público, isto se dá devido ao sabor picante e a formação de turvações com precipitado, quando armazenado em estantes. Futuramente, o tempo de fermentação, que é

de semanas, deverá ser reduzido, desde que esteja combinado com fermentos, e respeitado o sabor obtido do produto final [3].

Em vinhos produzidos por processo de baixa fermentação, na faixa de temperatura de 15 a 18°C, ocorre a síntese de muitos sabores desagradáveis [4].

As adições de vários nutrientes foram necessários, tais como o ácido cítrico, que evita a manutenção de outros microorganismos. A adição de fosfato de potássio, cloreto de magnésio e hidrogeno sulfato de sódio produz um meio favorável para fermentação, tendo um plano desejável de metabolismo. Sulfato de amônio, peptona e fosfato de potássio são nutrientes para fermentação; a tiamina, pantotenato de cálcio, inositol, pirodoxina e biotina são vitaminas necessárias para ótima fermentação e ação do processo metabólico [5].

O objetivo deste trabalho foi investigar a cinética de produção de etanol e CO₂ por células de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentações em batelada com meio nutriente proveniente de mel diluído e a produção de um vinho tendo de 12 a 14% de álcool.

2 Material e métodos

2.1 Levedura

O microrganismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (Saflager W-34/70 – Fermentis Division of S.I. Lesaffre - França), cedido pela empresa Reinerth Indústria e Comércio de Bebidas e Conservas Ltda, localizada em Guarapuava, Paraná.

2.2 Meios de fermentação

O meio nutriente nº 1 foi constituído por mel diluído em água destilada, até atingir concentração de 16ºBrix, adicionado dos seguintes componentes em (g/L): extrato de levedura 5; KCl 1,7; MgSO₄ 0,7; NH₄Cl 1,5 e KH₂PO₄ 5. O

pH do meio foi ajustado a 4,0 com ácido clorídrico 1N e esterilizado em autoclave a 121°C por 25 minutos.

O meio nutriente nº 2 foi obtido de forma idêntica ao do meio nutriente 1, exceto o processo de esterilização.

O meio nutriente nº 3 foi constituído por: mel diluído em água destilada, até atingir concentração de 16°Brix, adicionado dos seguintes componentes em g/L: sulfato de amônio 1,26, peptona $2,7 \cdot 10^{-3}$, tiamina $5,4 \cdot 10^{-3}$, pantotenato de cálcio $2,7 \cdot 10^{-3}$, biotina $1,35 \cdot 10^{-5}$. O pH do meio foi ajustado a 4,0 com ácido clorídrico 1N [5].

2.3 Preparação do inóculo

Quatro gramas de levedura liofilizada foram suspensa em 40mL de água estéril.

2.4 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi medido em refratômetro RT 30ATC, servindo de estimativa do teor de açúcar.

2.5 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada nos meios nutrientes das fermentações em pH-metro da Requal Equipamentos Científicos, Modelo RQ210, Série 5437/211, com pH-metro calibrado e amostra mantida à temperatura ambiente.

2.6 Ensaios

Os ensaios em batelada foram executados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo, aproximadamente, 40 mL de meio nutriente. Três conjuntos em triplicata com os meios nutrientes nº 1, 2 e 3 foram empregados na fermentação que ocorreu a 30°C com agitação de 150 rotações por minuto condições mais

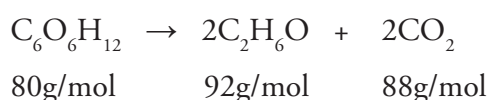
adequadas para a fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. A velocidade de formação do CO₂ foi acompanhada através da pesagem dos frascos em balança analítica em função do tempo. O início da fermentação ocorreu com a adição de 4 mL de suspensão de levedura em todos os frascos e imediatamente procedeu-se a primeira pesagem dos frascos.

2.7 Obtenção do parâmetro cinético

Para cada concentração inicial de substrato investigada foi feito um gráfico em escala semi-logarítmica da evolução de CO₂ evoluída *versus* tempo de fermentação, onde se obteve o valor da velocidade específica de formação de produto através da inclinação da reta da que melhor ajustou os dados experimentais da fase exponencial de formação de produto [6].

3 Resultados e discussão

A estequiometria da transformação de açúcares redutores totais em etanol e CO₂ foi representada pela equação de Gay-Lussac:



O rendimento teórico de conversão de C₆O₆H₁₂ a CO₂ é : 88/180 = 0,49.

O rendimento teórico de conversão de C₆O₆H₁₂ a C₂H₆O é : 92/180 = 0,51.

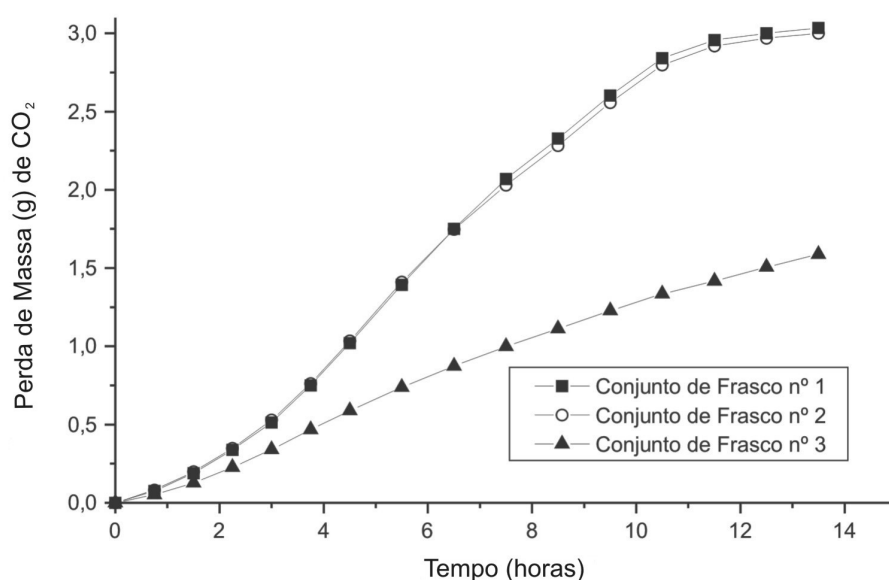
Sendo assim, o valor de massa de CO₂ desprendida em frascos de fermentação em batelada pode ser convertida em massa de etanol presente no meio multiplicando-o pela razão 0,51/0,49 [7].

A cinética de produção de CO₂ (dióxido de carbono) na fermentação alcoólica do mel diluído, em ensaio em batelada, mostrou que o conjunto de frascos nº 1 e 2 produziram o dobro de massa de CO₂ comparado ao conjunto de frasco nº 3 a partir de quatro horas de fermentação.

Os conjuntos de frascos nº 1 e nº 2 possuem a mesma composição, diferenciando-se apenas pelo fato do conjunto de frascos nº 2 não ter sido submetido a esterilização. O conjunto de frascos nº 3 possui um meio nutriente

específico para obtenção de hidromel. A fase lag (fase de curta duração, onde praticamente não ocorre divisão celular, há um aumento de massa, considerada um período de adaptação) [8] neste ensaio foi de, aproximadamente, duas horas para os três conjuntos de frascos investigados. Os conjuntos de frascos nº 1 e 2 não apresentaram diferença significativa na massa de CO₂ evoluída durante a fermentação (Figura 1).

Figura 1. Ensaio de cinética microbiana, concentração inicial de açúcares redutores totais de 16°Brix. Tempo de fermentação versus massa de CO₂ formada



No ensaio de fermentação alcoólica do mel diluído, foram investigadas duas composições de meio nutrientes distintas, sendo que realizada em triplicata. Os valores de massa de CO₂ produzidos a mais nos conjuntos de frascos nº1 e 2 em relação ao conjunto nº3, em porcentagem, foram de 60, 80 e 100 nos tempos de fermentação de 3,75, 5,5 e 6,5 horas, respectivamente (Figura 2).

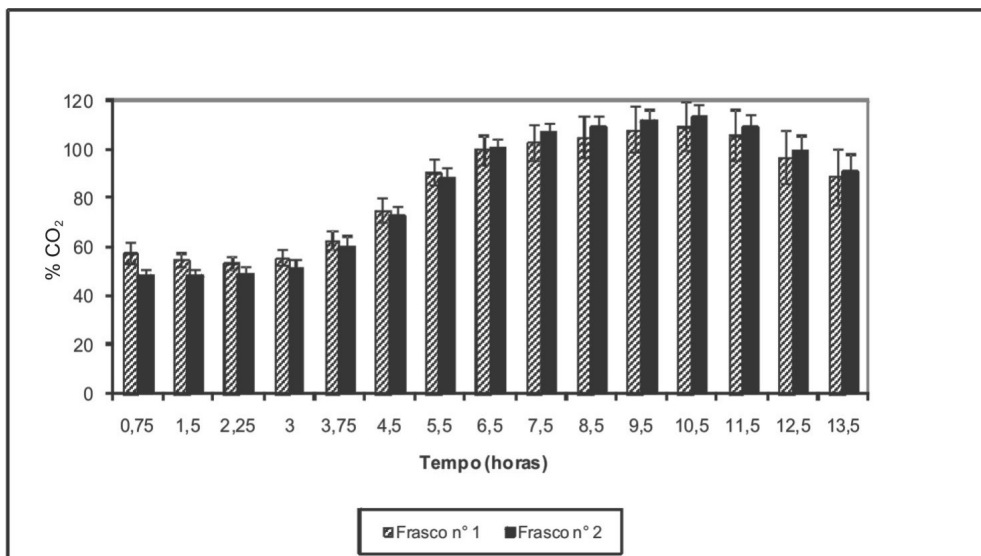
A produção de CO₂ por células de levedura na fermentação com os conjuntos de frascos nº1 e nº2, após oito horas de fermentação, foi, aproximadamente, 100%

superior em relação à produção de CO_2 do conjunto de frasco nº3 (Figura 2); nos tempos antecedentes, esse valor caiu para aproximadamente 60%.

O erro puro das triplicatas está representado na barra de erro da figura 2 e tem baixa magnitude.

A velocidade específica de formação de CO_2 para a fase exponencial de cada um dos meios de fermentação dos conjuntos de frascos nº 1, nº2 e nº3 foi obtida pelo coeficiente angular do gráfico do \ln (logaritmo natural) da massa de CO_2 evoluída *vs.* tempo (minutos) (Tabela 1). O início e a duração da fase exponencial foi determinada através da obtenção do melhor coeficiente de correlação. O meio de fermentação do conjunto de frascos nº 3 possui menor velocidade de conversão de substrato em produto.

Figura 2. Valores de massa de CO_2 produzidos a mais nos frascos com meios nutrientes nº1 e nº 2 em relação aos de frascos com meio nutriente nº 3, em porcentagem, em função do tempo de fermentação. Concentração inicial de açúcar redutor total de 160g ART/L. Média de triplicata



O conjunto de frascos nº 3 é constituído por meio específico para fabricação de vinho de mel, conforme Morse [5], que não preocupava-se com o tempo de fermentação e sim com os parâmetros sensoriais do mesmo.

Tabela 1. Velocidade específica de formação de CO₂ nos conjuntos de frascos 1, 2, 3.

Intervalo de tempo (135 a 270 min)	Velocidade específica de formação (10 ⁻⁴ min ⁻¹)		
	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Fase Exponencial	34,1	32,5	26,2

4 Conclusão

Os meios nutrientes dos conjuntos de frascos 1 e 2 que apresentam a mesma composição, mas se diferenciam pelo fato de o conjunto n°2 não ser esterilizado, também apresentaram a mesma resposta de produção de CO₂ no ensaio em batelada.

A fermentação de mel diluído por células de *Saccharomyces cerevisiae* nos conjuntos de frascos n°1 e n°2, em relação ao frasco de n°3, teve aumento da velocidade de conversão de substrato a etanol e CO₂ de mais de 60 % durante todo o curso da fermentação, fato esse atribuído à composição mais rica do meio nutriente dos conjuntos de frascos 1 e 2.

A velocidade de conversão do substrato em CO₂ foi praticamente igual nos conjuntos de frascos n°1 e n°2 durante a fase exponencial da fermentação, não havendo alterações consideráveis em meios submetidos à esterilização ou não. O meio nutriente do conjunto de frascos n°3, específico para produção de hidromel, se mostrou-se mais lento que os outros dois conjuntos, podendo apresentar este comportamento por possuir um meio nutriente mais pobre em sais que os outros conjuntos.

5 Referências

- [1] BREYER, E. U. *Abelhas e saúde*. Coleção Vale do Iguaçu n. 40. Uniporto. SC. 1980.
- [2] NAVRÁTIL, M.; STURDIK, E.; GEMEINER, P. Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnol. Lett.* v. 23, n. 12, p. 977-982, 2001.

- [3] CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e Caracterização do Vinho de Laranja. *Quim. Nova.* v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001.
- [4] MOREIRA, R. F. A. Glicídios no Mel. *Quim. Nova.* v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- [5] MORSE, R. A. Method of Making Wine from Honey. Patented Aug. 10, 1971.PI 3598607
- [6] BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial.* v. 2 Engenharia Química. Edgard Blücher. São Paulo. 2001.
- [7] RIGO, M. Estudo de fermentação alcoólica por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em *crisotila*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP. Campinas, SP. 2001.
- [8] MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* v. 24. n. 4. p. 532-533, 2004.