

EFEITO DO NITRITO SOBRE A FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA REALIZADA POR
Saccharomyces cerevisiae

L.E.GUTIERREZ¹
V.F. DE MARTIN ORELLI¹

RESUMO: O efeito de concentrações de até 80 ppm de nitrito sobre a fermentação alcoólica foi estudado com levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*). Houve aumento no tempo de fermentação com adição de nitrito sem afetar a produção de etanol. Com a adição de 60 e 80 ppm de NO_2^- , ocorreu redução na viabilidade celular e brotamento acompanhada por aumento no acúmulo de trealose e glicogênio. Aumentando a concentração de nitrito houve aumento no álcool n-propílico e redução nos teores de álcoois isobutílico e isoamílico.

Termos para Indexação: Fermentação alcoólica, nitrito, *S.cerevisiae*.

EFFECT OF NITRITE ON ALCOHOLIC FERMENTATION
CARRIED OUT WITH *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT: The effect of nitrite up to 80 ppm on alcoholic fermentation was studied with baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). There was an increase in fermentation time but not effect on ethanol yield. With the addition of 60 and 80 ppm NO_2^- there was a reduction on cell viability and budding with correspondent increase on trehalose and glycogen accumulation. Increasing nitrite concentration resulted in increase on n-propilic alcohol

¹ Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP, 13400-Piracicaba-SP, e CEBTEC/FEALQ.

level and a reduction on isobutyllic and isoamyllic alcohols content.

Index Terms: Alcoholic fermentation, nitrite, *S.cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

Em trabalhos anteriores (GUTIERREZ, 1988 a 1990), foi demonstrado que alguns componentes que poderiam ser encontrados no melaço de cana-de-açúcar, como hidroximetil furfural e os ácidos fórmico e propiônico, não afetaram a produção de etanol durante a fermentação realizada por *Saccharomyces cerevisiae*.

Outro componente que pode ser encontrado no melaço é o íon nitrito, resultante da atividade de bactérias que reduzem o íon nitrato (HARRISON & GRAHAM, 1970) e que apresenta efeito tóxico sobre as leveduras (CARMO-SOUSA, 1969).

A quantidade de nitrito capaz de provocar efeito prejudicial sobre a fermentação alcoólica variou de 20 ppm de NO_2^- (SAVEL et alii, 1976) até 250 ppm de NO_2^- (TOMCZYNSKA, 1969; LESZYNSKI, 1971).

Segundo GLACET et alii (1985) a presença de nitrito no melaço de beterraba provocou aumento no tempo da fermentação sem afetar o crescimento da levedura e a produção de etanol. Não há informações disponíveis sobre os teores de nitrito nos melaços brasileiros.

Um possível efeito tóxico do nitrito sobre as leveduras foi apresentado por HINZE & HOLZER (1986), relatando a queda no conteúdo de ATP devido a menor atividade da desidrogenase de gliceraldeído-3P na presença do nitrito. Outra enzima inibida por nitrito é a descarboxilase pirúvica (SUMMER & SOMERS, 1947).

No presente trabalho foi estudado o efeito de várias concentrações de nitrito sobre a fermentação alcoólica, determinando-se a produção de etanol, glicerol e álcoois superiores

bem como o acúmulo de trealose e glicogênio pela levedura.

MATERIAL E MÉTODOS

Meio de fermentação: a composição, em gramas por litro, do meio utilizado nos ensaios de fermentação foi: 130g de sacarose, 2g de extrato de levedura, 2,5g de ácido cítrico, 3,0g de citrato de sódio, 3,54g de sulfato de amônio, 1,0g de fosfato dibásico de potássio, 0,08g de sulfato de magnésio, 0,03g de cloreto de cálcio e adição de micronutrientes segundo MAIORELLA (1985). O pH foi acertado a 4,0 com solução de NaOH 0,75N. Foram feitas adições de nitrito de sódio para se obter concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 60 e 80 ppm de NO_2^- .

Ensaio de fermentação: 30 ml do meio foram inoculados com 10 ml de suspensão de fermento de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) de 4g/100 ml, resultando em inóculo de 1% com cerca de $1,2 \times 10^8$ células por ml. A fermentação foi realizada em frascos de 120 ml tampados com papel alumínio, a 30°C, com agitação ocasional e 4 repetições.

Análises Químicas

Etanol: o meio fermentado foi destilado em micro-destilador Kjeldahl adaptado para álcool e a densidade da mistura hidro-alcoólica foi medida em densímetro digital Anton-Paar modelo DMA-46 segundo AMORIM et alii (1982).

Crescimento: 8 ml do meio fermentado foram centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos e o precipitado lavado com água gelada e seco em estufa a 105°C.

Glicerol: o sobrenadante obtido após centrifugação do meio fermentado foi utilizado para a determinação de glicerol segundo ZAGO et alii (1989).

Álcoois superiores: a determinação foi realizada por cromatografia em fase gasosa conforme descrito por GUTIERREZ (1988b).

Trealose: a trealose foi extraída com TCA 0,5M em banho de gelo e determinada pelo método da antrona segundo TREVELYAN & HARRISON (1956).

Glicogênio: foi determinado pelo método enzimático descrito por BECKER (1978) e adaptado por ROCHA LEÃO et alii (1984).

Análise estatística: foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições, segundo GOMES (1985). Para análise de variância foi utilizado o teste F e para comparação das médias o teste de Tuckey com 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 é apresentado o efeito de concentração de nitrito sobre a produção de CO_2 durante a fermentação alcoólica. Aumentando-se a concentração de nitrito no meio de fermentação, o tempo da fermentação também aumenta, confirmando observações apresentadas por GLACET et alii (1985) que trabalharam com mostos do melaço de beterraba. Esses autores verificaram que o nitrito é oxidado até nitrato e que somente depois de ocorrer o desaparecimento do nitrito iniciou-se a produção de etanol. O gráfico da Figura 1 mostra que até 80 ppm de NO_2^- a fermentação não é inibida contrariando observações de SAVEL et alii (1977) para

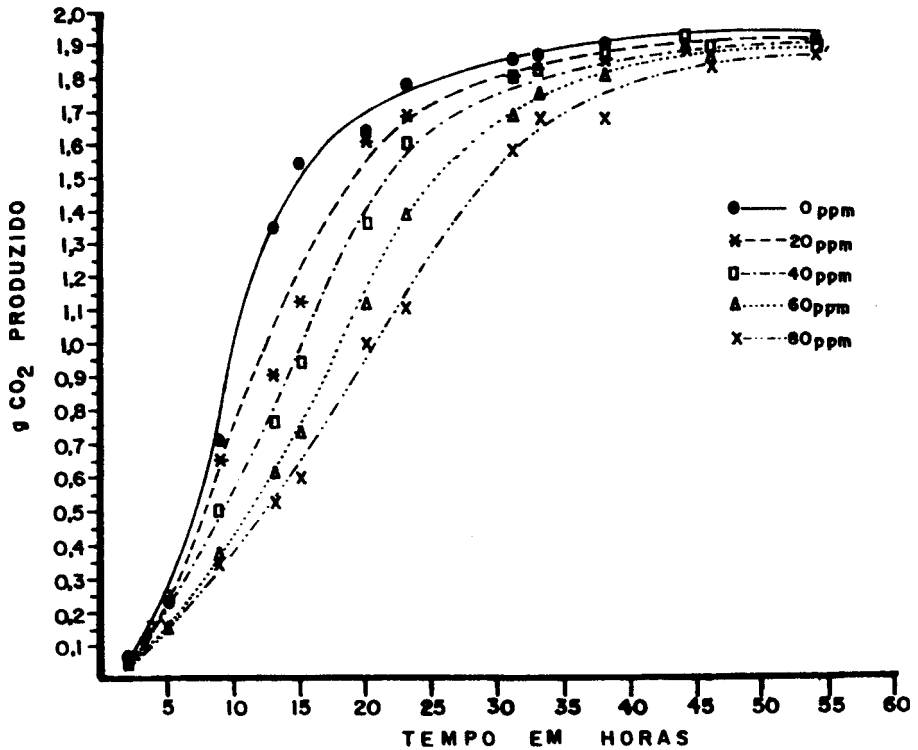


Figura 1 - Produção de CO₂ durante fermentação alcoólica com adição de nitrito.

Saccharomyces calrsbergensis.

O aumento do tempo de fermentação poderia ser explicado pela inibição da desidrogenase de gliceraldeído-3-P pelo nitrito conforme relatado por HINZE & HOLZER (1986).

Na Tabela 1, são apresentados os valores de etanol e glicerol produzidos na fermentação e a viabilidade celular e brotamento das células das leveduras sob efeito de concentrações de nitrito. Não houve efeito significativo do nitrito sobre a produção de etanol apesar do atraso da fermentação. Houve aumento significativo do teor de glicerol entre o controle e as doses de 10, 20, 40, 60 e 80 ppm de NO_2^- .

Esse aumento poderia ser explicado pela inibição da descarboxilase pirúvica por nitrito (SUMMER & SOMERS, 1947), diminuindo a regeneração do NAD pela desidrogenase alcoólica e portanto desviando a fosfodiidroxiacetona para glicerol.

Em relação a viabilidade celular apenas as doses de 60 e 80 ppm de NO_2^- provocaram redução significativa. HINZE HOLZER (1986) relataram que a adição de nitrito provocou depleção no conteúdo de ATP. Provavelmente a queda da viabilidade nessas concentrações poderia ser explicada pelo maior decréscimo do nível de ATP.

Na Tabela 2 são apresentados os teores de trealose e glicogênio da levedura após fermentação na presença de nitrito. Ocorreu aumento no acúmulo desses carboidratos com o aumento da concentração de nitrito do meio, com diferenças significativas apenas entre o controle e as doses de 60 e 80 ppm de NO_2^- . Segundo THEVELEIN (1984), quando a taxa de crescimento é baixa ocorre acúmulo de trealose. Como pode ser observado na Tabela 1 há uma tendência de redução de brotamento nas doses mais elevadas de nitrito, o que poderia explicar o maior

Tabela 1 - Etanol (% volume), glicerol (g/100 ml), viabilidade celular (%) e brotamento (%) de fermentações realizadas com diversas concentrações do nitrito.

ppm NO ₂ ⁻	Etanol	Glicerol	Viab.Celular	Brotamento
0	5,69	0,49	83,2	15,0
5	5,69	0,52	78,7	13,2
10	5,68	0,54	87,7	19,2
20	5,68	0,55	82,2	15,5
40	5,68	0,54	77,5	15,7
60	5,69	0,54	72,5	14,5
80	5,69	0,55	73,0	10,0
C.V. %	0,72	8,73	4,25	27,21
d.m.s. 5%	0,095	0,034	7,80	9,27

Tabela 2 - Trealose e glicogênio em fermentação realizada com diversas concentrações de nitrito. (Expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de M.S. da levedura).

ppm NO_2^-	Trealose	Glicogênio
0	24,7	67,7
5	31,0	81,2
10	38,7	81,5
20	38,0	87,7
40	37,2	87,7
60	43,0	106,2
80	46,7	114,2
C.V. %	17,74	15,96
d.m.s. 5%	15,20	32,99

acúmulo de trealose e glicogênio. PANEK (1962) sugeriu que a trealose é formada quando cessa a síntese de aminoácidos, ocorrendo uma competição entre essa síntese e a de trealose por glucose-6P. Como nitrito inibe a desidrogenase de gliceraldeído-3P (HINZE & HOLZER, 1986), a glucose-6P poderia ser desviada para a síntese de trealose e não para o processo fermentativo.

Na Tabela 3 são apresentados os teores dos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico produzidos nas fermentações com adição de nitrito. De maneira geral ocorreu uma tendência para maior formação de álcool n-propílico até 60 ppm de NO_2 e menor formação dos álcoois isobutílico e isoamílico. Uma possível explicação para esse fenômeno poderia ser dado pela provável ação do nitrito sobre a tiamina, semelhante ao sugerido por WHITING (1976) para sulfito. A adição de sulfito a mostos de melaço também provocou redução nos álcoois isobutílico e isoamílico, conforme verificado por GUTIERREZ (1988b).

Assim observando-se a Figura 2, notamos que a tiamina é necessária para a biossíntese dos precursores dos álcoois isobutílico, isoamílico e amílico ativo mas não é para álcool n-propílico. Ocorrendo destruição da tiamina por nitrito, acumular-se-ia ácido alfacetobutílico, o que explicaria a maior produção do álcool n-propílico. Assim a ação do nitrito também poderia ser explicada pelo seu efeito na formação do alfa-hidroxietil pirofosfato de tiamina, reduzindo a formação dos aminoácidos isoleucina, valina e leucina. A redução nos teores desses aminoácidos também poderia explicar a maior duração da fermentação na presença do nitrito.

Tabela 3 - Álcoois n-propílico, iso-butílico e iso-amílico produzidos em fermentações realizadas com diversas concentrações do nitrito. Expressos em mg/litro de vinho.

Tratamentos	N-Propílico	Iso-Butílico	Isoamílico*
0	34,2	78,5	15,0
5	37,0	76,0	88,0
10	42,2	80,7	95,0
20	43,7	89,0	89,0
40	48,7	76,5	84,5
60	50,0	67,2	77,0
80	46,2	63,2	76,2
c.v. %	9,17	11,51	8,16
d.m.s. 5%	9,15	20,19	16,04

* Somatória de isoamílico e amílico ativo.

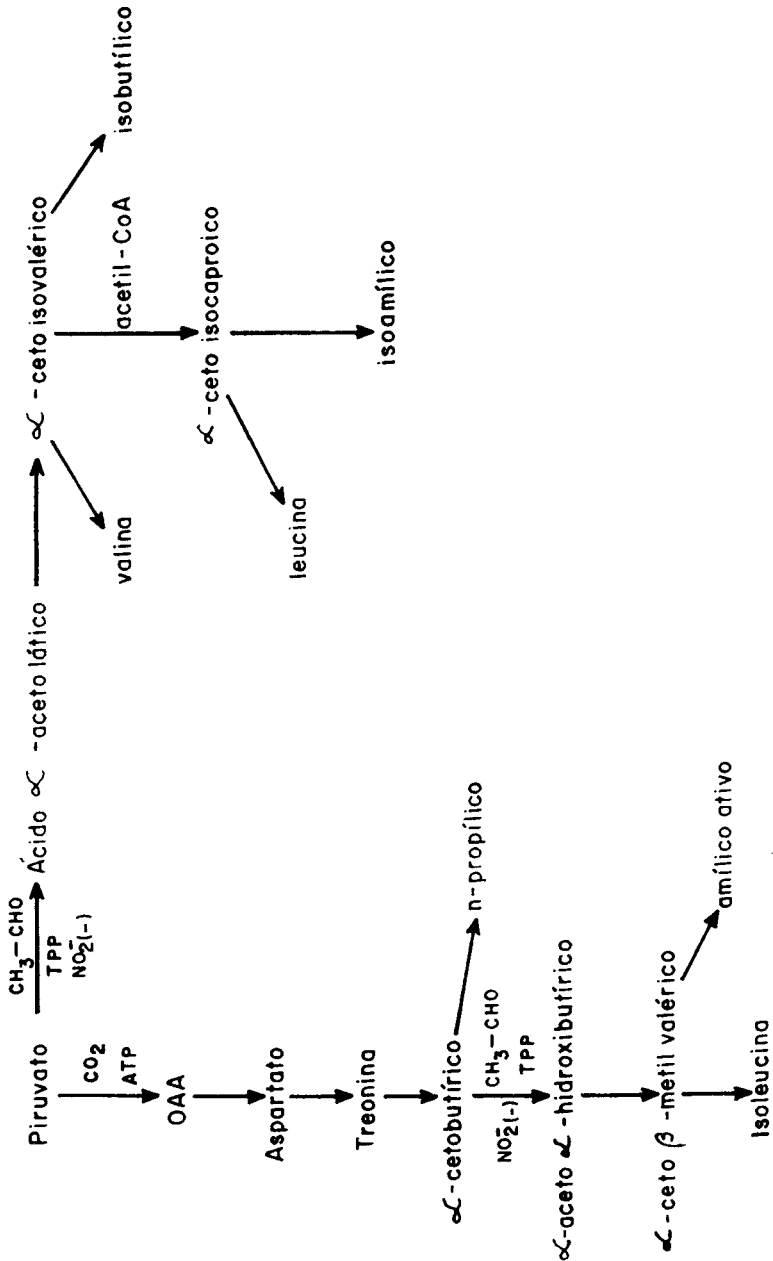


Figura 2 - Biossíntese de álcoois superiores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- BECKER, V.J. A method for glycogen determination in whole yeast cells. Analytical Biochemistry, New York, 86(1): 56-64, 1978.
- CARMO-SOUSA, L. Distribution of yeasts in nature. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. The yeast. London, Academic Press, 1969. vol. 1, p.79-105.
- GLACET, A.; LETOURNEAU, F.; LEVEQUE, P.; VILLA, P. Kinetic study of nitrite inhibition during alcoholic fermentation of beef molasses. Biotechnology Letters, Surrey, 7(1):47-52, 1985.
- GOMES, F.P. Curso de estatística experimental 11ed. Piracicaba, Nobel, 1985. 466p.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 45(2): 369-79, 1988a.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 45(2):359-68, 1988b.

GUTIERREZ, L.E. Determinação de hidroximetil furfural em melão e seu efeito sobre a fermentação alcoólica. O Solo, Piracicaba, 1990. (no prelo).

GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160p. (Livre-docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

HARRISON, J.S.; GRAHAM, J.C.J. Yeast in ditillery practice. In: ROSE, A.H.; HARRISON, J.S., ed. The Yeast. London, Academic Press, 1970. vol. 3.

MAIORELLA, B.L. Ethanol. In: MOO-YOUNG, M., ed. Comprehensive biotechnology. Oxford, Pergamon Press, 1985. v.3. p.861-914.

PANEK, A.D. Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives of Biochemistry and Biophysycs, New York, 98:349-55, 1962.

ROCHA-LEÃO, M.H.M.R.; PANEK, A.D. ; CARVALHO, C.V.L.A. Glycogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*: catabolite repression effects. IR. Medical Sience, Lancaster, 12:411-12, 1984.

SAVEL, J.; PROKPOVA, M. ; SATAVA, J. Effects of nitrites upon brewing yeast. Kvasni Prum. Ceske Budejovice, 1976. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 86:169-281d. 1977.

SUMER, J.B.; SOMERS, G.F. Chemistry and methods of enzymes. New York, Academic Press, 1947. 415p.

- THEVELEIN, J.M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. Microbiological Reviews, Washington, 48(1):42-59, 1984.
- TOMCZYNSKA, J. Effect of nitrites and phenol on the growth of yeasts. Pr. Inst. Lab. Badaw. Przem. Sposyw., Warsaw, 19(2):313-26, 1969. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 72:40.025e, 1970.
- TREVELYAN, W.E. ; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. 5. The trehalose content of baker's yeast during anaerobic fermentation. Biochemical Journal, London, 62:177-83, 1956.
- WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages. A review. Journal of Institute of Brewing, London, 82:84-92, 1976.
- ZAGO, E.A.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; GUTIERREZ, L.E.; OLIVEIRA, A.J. Métodos analíticos para controle da produção de álcool. Piracicaba, ESALQ, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989. 144p.