

Estudo cinético da fermentação alcoólica de soluções diluídas de mel por células de *Saccharomyces cerevisiae*

Kinetic study of alcoholic fermentation of diluted honey solutions by *Saccharomyces cerevisiae* cells

Cássio Marques Resmim, Ledieli Belmonte Soares, Ricardo Cancian, Marcelo Marques Tusi*

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões e URI, Av. Batista Bonoto Sobrinho, 733, São Vicente, 97700-000
Santiago, RS, Brasil

[*mmtusi@gmail.com](mailto:mmtusi@gmail.com)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da cepa de levedura e do teor de sólidos solúveis totais (teor de açúcar) na cinética de fermentação alcoólica de soluções diluídas de mel. O acompanhamento da cinética da reação foi realizado por meio da medição da massa de dióxido de carbono liberada. Foram estudadas seis cepas de levedura, sendo três da Lalvin (K1-V1116, 71B-1122 e IC-1118) e três da Red Star (Premier Cuvée, Côte des Blancs e Premier Blanc) utilizando mostos com 24 e 34 °Brix. As leveduras Premier Cuvée e Côte des Blancs apresentaram os melhores desempenhos e a maior sensibilidade ao aumento da concentração de açúcar comparadas às demais leveduras estudadas.

Palavras-chave: Mel, Hidromel, Leveduras, Fermentação.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the influence of strain of yeast and the total soluble solids content (sugar content) in the kinetics of alcoholic fermentation of diluted honey solutions. The accomplishment of the reaction kinetics was performed by weighing of carbon dioxide weight released. They were studied six strains of yeasts, three from

Lalvin (K1-V1116, 71B-1122 and IC-1118) and three of Red Star (Premier Cuvée, Côte des Blancs and Premier Blanc) using honey-must of 24 and 34 °Brix. The yeasts Premier Cuvée and Côte des Blancs showed the best performances and the greater sensibility to the increase of sugar content compared to other yeasts studied.

Keywords: Honey, Mead, Yeasts, Fermentation.

INTRODUÇÃO

O hidromel é definido como uma bebida com graduação alcoólica de 4 a 14% em volume, a 20 °C, obtida pela fermentação alcoólica de solução de mel de abelha, sais nutrientes e água potável (BRASIL, 2009). Seu consumo era popular no norte Europeu, local este que não oferecia condições propícias para o desenvolvimento da produção de vinho. A partir da importação do vinho ser importado a baixo custo de regiões do sul europeu a popularidade do hidromel foi reduzida. Atualmente, o hidromel ainda é consumido na Inglaterra, Polônia, Alemanha, Eslovênia e em países africanos como a Etiópia e África do Sul (EMBRAPA, 2003).

A falta de avanços científicos, decorrente dos poucos estudos existentes sobre a produção de hidromel, tem feito países produtores, como a Polônia, diminuir a sua produção (PEREIRA, 2008). Problemas associados à fermentação do mosto e à maturação do hidromel fazem com que a sua produção se torne economicamente inviável. Devido ao elevado teor em açúcares, o processo fermentativo é bastante lento, sendo a variedade do mel, a cepa da levedura, os nutrientes disponíveis e o pH do meio, variáveis importantes que afetam a produção e qualidade do produto final (NAVRÁTIL, STURDÍK, GEMEINER, 2001).

A taxa de fermentação pode ser influenciada pelo pH baixo e por uma combinação de ácidos que tem origem no mel definidos como característica do mosto do hidromel, a qual depende, sobretudo da variedade do mel, da cepa de levedura da composição do meio de cultura e do pH extracelular. Os fatores de crescimento, pH, a temperatura, a cepa de levedura devem ser os mais adequados devido ao elevado conteúdo em açúcares, sendo o processo fermentativo muito lento (SROKA e TUSZYŃSKI, 2007). Outro problema associado à produção de hidromel é o stress da levedura, sendo esse responsável por sabores indesejados. Essa situação é

associada ao meio fermentativo causando efeitos indesejados no crescimento celular (IVORRA, PÉREZ-ORTÍN, DEL OLMO; 1999).

Na maioria das fermentações alcoólicas, usa-se cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, indivíduos eucariontes heterotróficos (ou seja, necessitam de compostos orgânicos pré-formados para realizar seu metabolismo), mesófilas com temperatura ótima de atuação na faixa de 25 a 40 °C (BATT e TORTORELLO, 2014). Tais leveduras possuem a enzima piruvato descarboxilase que auxilia na fermentação da glicose em etanol e dióxido de carbono (CO₂) (CAMPBELL, 2007; NELSON e COX, 2011). Dentre as espécies de leveduras alcólicas, as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são definidas como mais aptas em referência ao consumo açúcares fermentescíveis, conferindo segurança ao processo fermentativo (CATALUÑA, 1984; JOSHI & PANDEY, 1999). Os indivíduos dessa espécie apresentam singularidades que enaltecem sua preferência nos processos fermentativos, como, por exemplo: o crescimento rápido, utilização eficiente da glicose, tolerâncias a níveis altos de etanol e baixos de oxigênio (PISKUR, 2006).

As leveduras têm sido, por muitos anos, objeto de pesquisa e seleção de forma a melhorarem a qualidade das bebidas delas derivadas ou, em alguns casos, para que resultem em produtos com tipicidade regional e/ou com pouca variabilidade entre safras (LEPE e LEAL, 2004). Tais microrganismos afetam a qualidade da bebida, pois durante a fermentação, metabolizam os açúcares e outros componentes em etanol, dióxido de carbono e centenas de produtos secundários que para conferir singularidades no produto final (FLEET, 2003).

Neste trabalho, os efeitos da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada e da concentração de açúcar no mosto na cinética de fermentação de soluções diluídas de mel foram avaliadas por meio do acompanhamento da massa de CO₂ liberada, visando otimizar as condições para produção de hidromel. Trata-se de um trabalho original, uma vez que não existem estudos analisando a influência da cepa de levedura na cinética de fermentação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cepas de leveduras analisadas

Foram avaliadas seis cepas de levedura: três da Lalvin (K1-V1116, 71B-1122 e a IC-1118) e três da Red Star (Premier Cuvée, Côte des Blancs e Premier Blanc).

Preparação dos mostos

O mosto A foi constituído por mel com teor de sólidos solúveis totais de 24 °Brix, enquanto o mosto B foi constituído por mel com teor de sólidos solúveis totais de 34 °Brix. Em ambos os meios, foram adicionados os seguintes componentes no mosto: diidrogeno-fosfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,4 g/L); sulfato de magnésio heptaidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,08 g/L); tartarato duplo de sódio e potássio - $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3,8 g/L), ácido tartárico - $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$ (1,0 g/L) e hidróxido de cálcio - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (1,258 g/L). O pH dos meios foi ajustado em, aproximadamente, 4,3 com solução 5,0 mol/L de ácido clorídrico.

Determinação do pH

A determinação do pH dos mostos foi realizada antes da fermentação utilizando um pHmetro Digimed modelo DM-22.

Determinação do teor de sólidos solúveis totais

O teor de sólidos solúveis do mosto foi medido antes da fermentação utilizando um refratômetro portátil.

Ensaio de fermentação

Cinco gramas (5 g) de levedura liofilizada foram suspensos em 40 mL de água destilada a 40 °C. Após um período de 15 minutos com agitação periódica, a suspensão de levedura foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada a 40 °C.

Os experimentos de fermentação seguiram a metodologia descrita por Chagas et al. (2006). Os ensaios em batelada foram executados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo, aproximadamente, 40 mL de mosto. Os frascos de Erlenmeyer foram previamente limpos com detergente, água destilada e álcool iodado e armazenados em estufa a 100 °C para minimizar os riscos de contaminação. As fermentações ocorreram nas temperaturas de 20 °C sem agitação. O início da fermentação ocorreu com a adição de 4 mL de suspensão de levedura em todos os frascos. Após inoculação da levedura os frascos foram imediatamente pesados e acondicionados no banho-maria, conforme ilustra as Figura I a e b. Antes da pesagem, cada frasco teve sua parte externa cuidadosamente seca com papel.



(a)



(b)

Figura I. Montagem experimental dos experimentos de fermentação. (a) Pesagem dos frascos após incubação da levedura e (b) Banho-maria com os mostos na temperatura de 20 °C.

Obtenção do parâmetro cinético

Para obtenção do parâmetro cinético das fermentações, a velocidade de formação do CO₂ foi acompanhada por meio da pesagem dos frascos em balança analítica em função do tempo.

Após, o logaritmo natural (ln) dos valores da massa de CO₂ evoluída na fase exponencial *versus* o tempo de fermentação foram plotados. A constante de velocidade da fase exponencial (expressa em h⁻¹) foi determinada por meio da inclinação da reta que melhor se ajustou aos dados experimentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo fermentativo pode ser dividido em fase Lag, fase de aceleração, fase “log” ou exponencial, fase de declínio e a fase de metabolismo endógeno ou fase diáuxica. A fase Lag é o período da fermentação em que nenhum crescimento é observado, pois nesta fase as células de levedura estão ocupadas em estabelecer o estado enzimático necessário para o catabolismo. Na fase de aceleração, ocorre crescimento dos microorganismos sem obedecer uma lei exponencial, sendo que a produção de etanol nesta fase é exponencialmente dependente do tempo. Durante a fase exponencial ou “log” a produção de etanol é exponencialmente dependente do tempo. Quando o tempo de exaustão é atingido, a concentração da fonte de carbono esta baixa e o teor de etanol alto, fatores que limitam a velocidade de crescimento.

Após o tempo de exaustão, dá-se início à fase de declínio onde o número de células que morrem torna-se progressivamente superior ao das que surgem. Finalmente, a fase de metabolismo endógeno ou fase diáuxica reflete basicamente o metabolismo endógeno das células remanescentes (VOLPE, 1997).

Efeito da cepa de levedura

Foi verificada diferença na quantidade de CO₂ evoluída após 12 horas de fermentação com cada uma das cepas estudadas, ou seja, grande diferença na velocidade média de formação de CO₂ (velocidade de fermentação). A ordem decrescente de desempenhos observada foi: Premier Cuvée >> Côte des Blancs >> Premier Blanc ≈ EC-1118 ≈ 71B-1122 > K1V-1112.

A Figura II apresenta o desempenho de cada levedura na fermentação do mosto de 24 °Brix, a 20 °C, durante 12 horas.

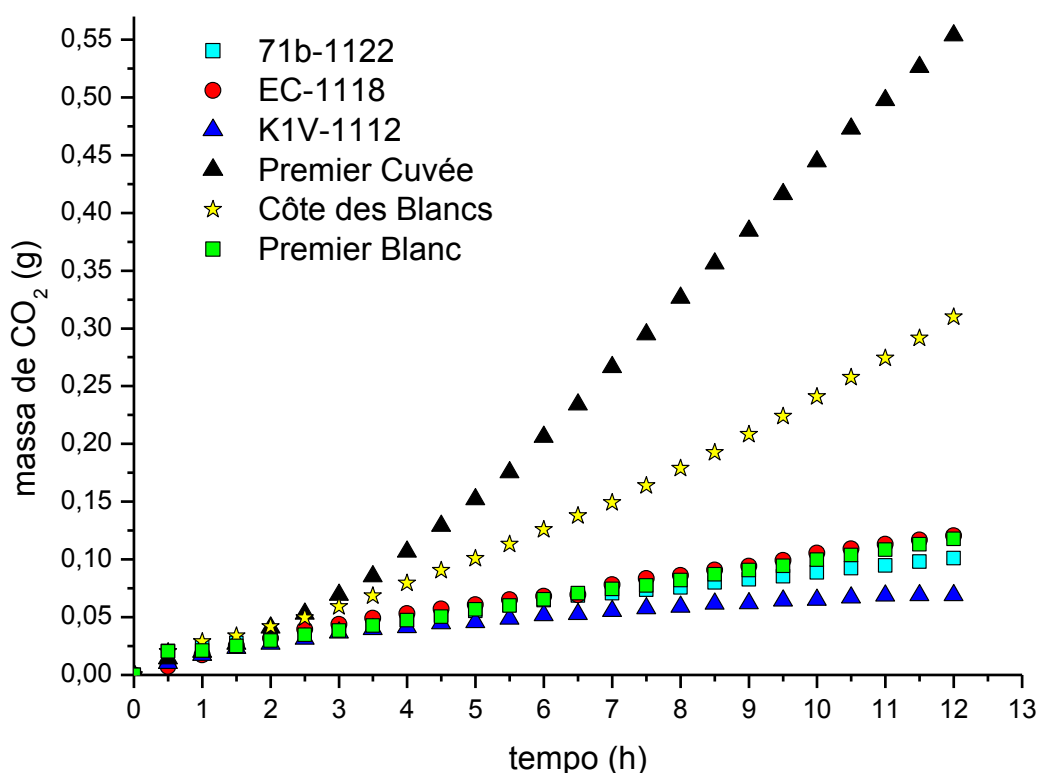
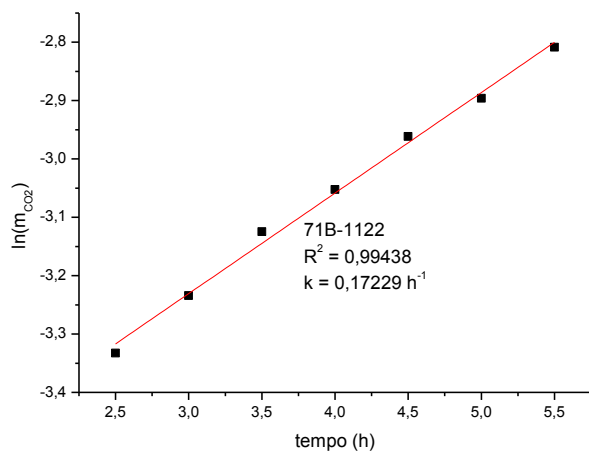
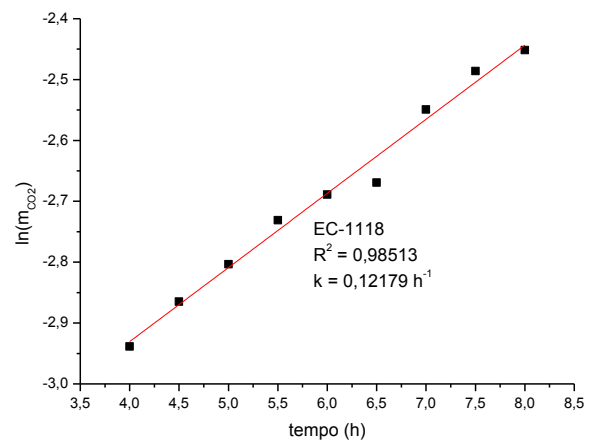


Figura II. Desempenho de fermentação, no período de 12 horas, das diferentes cepas de levedura estudadas.

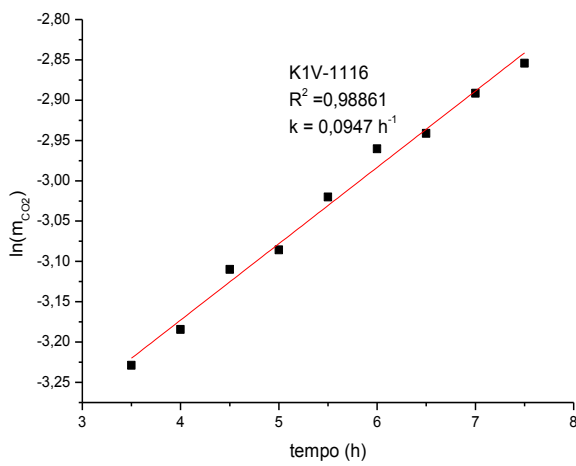
A Figura III apresenta as curvas do logaritmo natural da massa de CO₂ formada pelo tempo, evidenciando apenas a porção linear da curva, ou seja, a fase exponencial da fermentação.



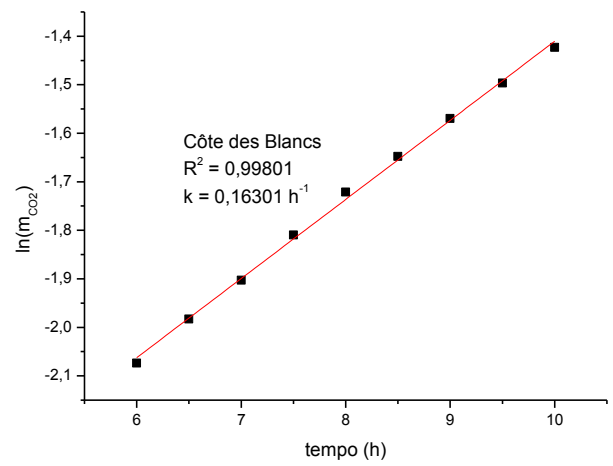
(a)



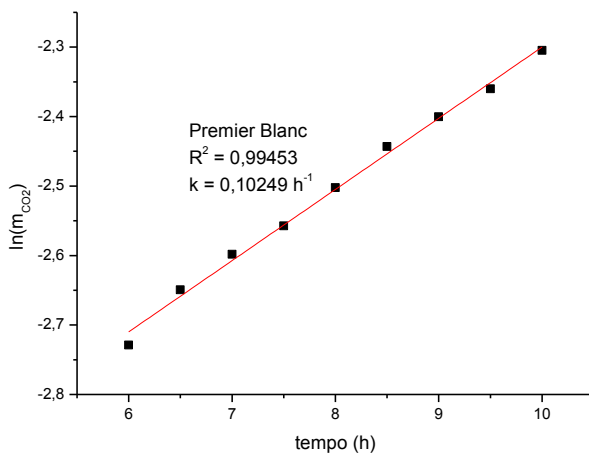
(b)



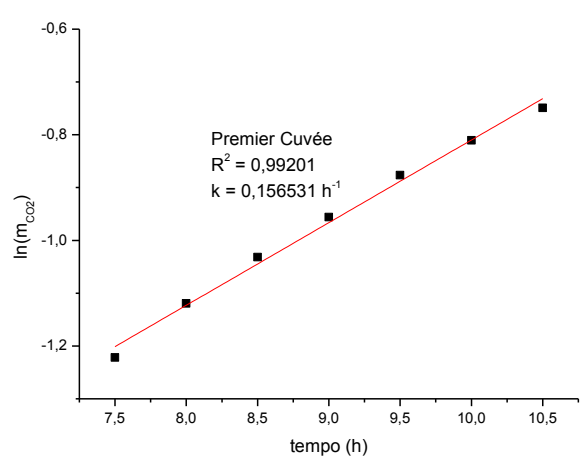
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura III. Fase exponencial das fermentações utilizando (a) 71B-1122, (b) EC-1118, (c) K1V-1116, (d) Côte des Blancs, (e) Premier Blanc e (f) Premier Cuvée.

Pode-se observar que as leveduras, nas condições estudadas, alcançam a fase exponencial em diferentes períodos. Os períodos da fase exponencial juntamente com as constantes de velocidade da fase exponencial (k) são apresentados na Tabela 1.

Tabela I. Períodos da fase exponencial e constantes de velocidade da fase exponencial de cada experimento.

Levedura	Fase exponencial	k (h⁻¹)	massa de CO₂ (g)
71B-1122	de 2,5 a 5,5 h	0,172	0,101
EC-1118	de 4,0 a 8,0 h	0,122	0,120
K1V-1116	de 3,5 a 7,5 h	0,095	0,069
Côte des Blancs	de 6,0 a 10,0 h	0,163	0,310
Premier Blanc	de 7,5 a 10,5 h	0,102	0,118
Premier Cuvée	de 7,5 a 10,5 h	0,156	0,554

Entretanto, o fato de uma levedura alcançar a fase exponencial antes ou de possuir uma maior constante de velocidade da fase exponencial não implica em um desempenho de fermentação superior, ou seja, não significa uma maior velocidade de formação de CO₂. A ordem decrescente das velocidades da fase exponencial foi: 71B-1122 > Côte des Blancs > Premier Cuvée > EC-1118 > Premier Blanc > K1V-1118.

Efeito do teor de sólidos solúveis totais

A Figura IV apresenta o desempenho de cada levedura na fermentação dos mostos de 24 e 34 °Brix, a 20 °C, durante 12 horas. Pode-se observar que as leveduras Premier Cuvée e Côte des Blancs apresentaram os melhores desempenhos e a maior sensibilidade ao aumento do teor de sólidos solúveis totais (ou seja, concentração de açúcar) comparadas às demais leveduras (Figura IV).

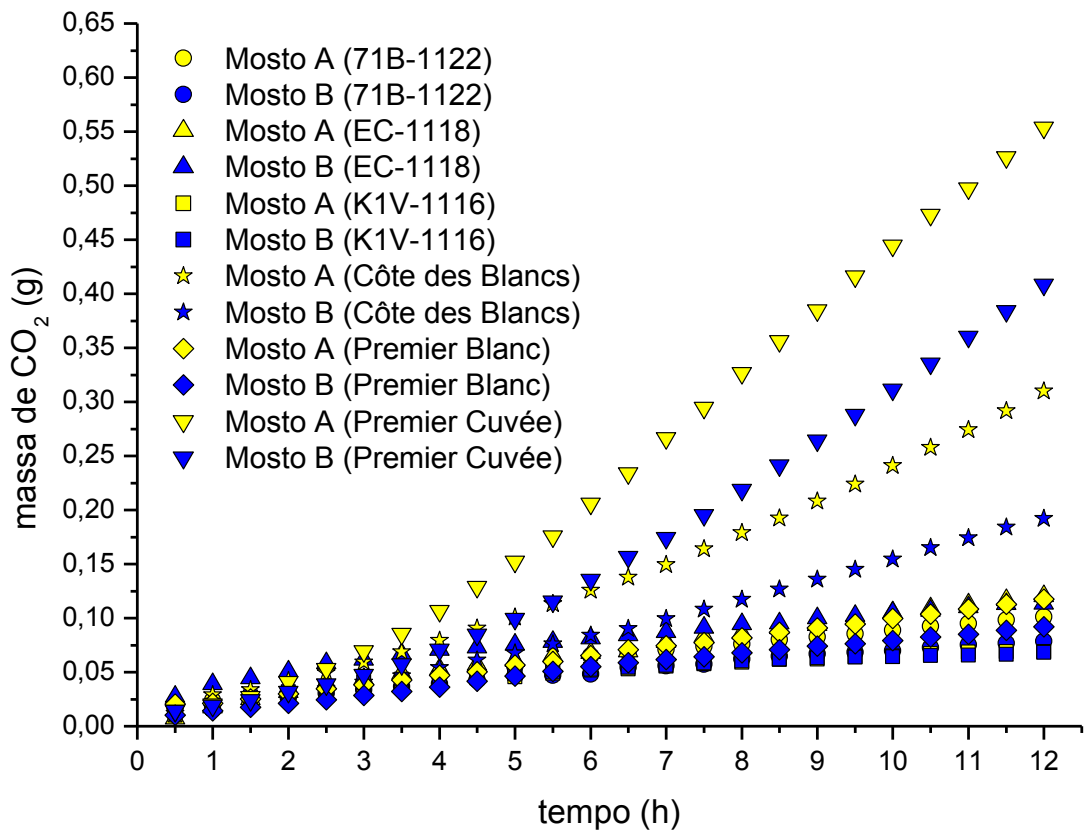


Figura IV. Desempenho de fermentação, no período de 12 horas, das diferentes cepas de levedura estudadas.

A Figura V apresenta dados da fermentação dos mostos de 24 e 34 °Brix utilizando a levedura da Lalvin, 71B-1122. Pode-se perceber que, ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi maior para o mosto com menor quantidade de açúcar, evidenciando uma maior velocidade média de fermentação. A fase exponencial da fermentação para o mosto de 24 °Brix (Mosto A) foi entre 2,0 e 5,0 horas, enquanto a fase exponencial da fermentação do mosto de 34 °Brix (Mosto B) deu-se entre 2,5 e 5,5 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto B foi ligeiramente maior ($k = 0,18224 \text{ h}^{-1}$) comparada à fermentação do mosto A ($k = 0,17229 \text{ h}^{-1}$).

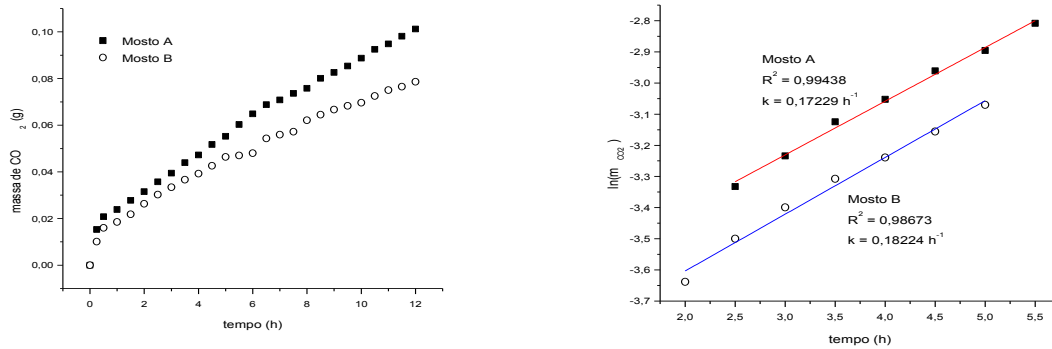


Figura V. Gráficos da fermentação utilizando a levedura 71B-1122.

A Figura VI apresenta dados da fermentação dos mostos de 24 e 34 °Brix utilizando a levedura da Lalvin, EC-1118. Ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi ligeiramente maior para o mosto com maior quantidade de açúcar. A fase exponencial da fermentação para o mosto de 24 °Brix (Mosto A) foi entre 4,0 e 8,0 horas, enquanto a fase exponencial da fermentação do mosto de 34 °Brix (Mosto B) deu-se entre 4,0 e 7,5 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto A ($k = 0,12179 \text{ h}^{-1}$) foi quase duas vezes maior que a velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto B ($k = 0,0724 \text{ h}^{-1}$).

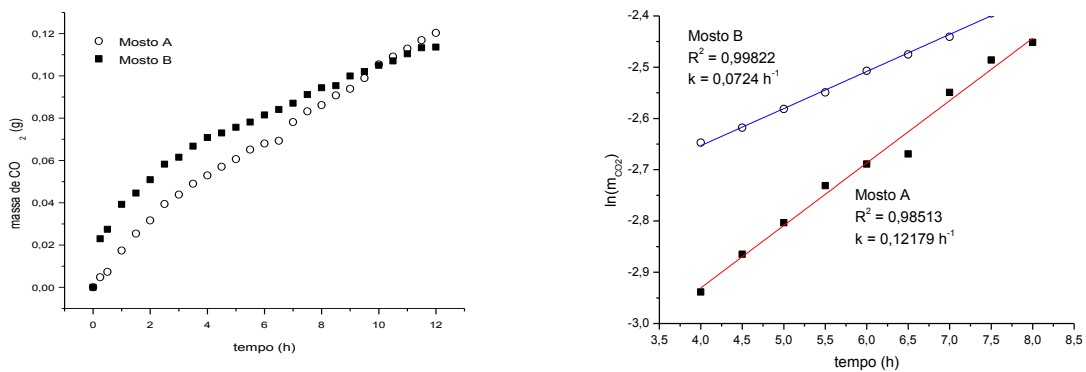


Figura VI. Gráficos da fermentação utilizando a levedura EC-1118.

A Figura VII apresenta dados da fermentação utilizando a levedura da Lalvin, K1V-1112. Pode-se perceber que, ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi praticamente a mesma para os dois mostos. A fase exponencial da fermentação para o mosto de 24 °Brix (Mosto A) foi entre 4,0 e 7,5 horas, enquanto a fase exponencial da fermentação do mosto de 34 °Brix (Mosto B) deu-se entre 3,0 e 7,5 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto A foi ligeiramente superior ($k = 0,0947 \text{ h}^{-1}$) comparada à fermentação do mosto B ($k = 0,08464 \text{ h}^{-1}$).

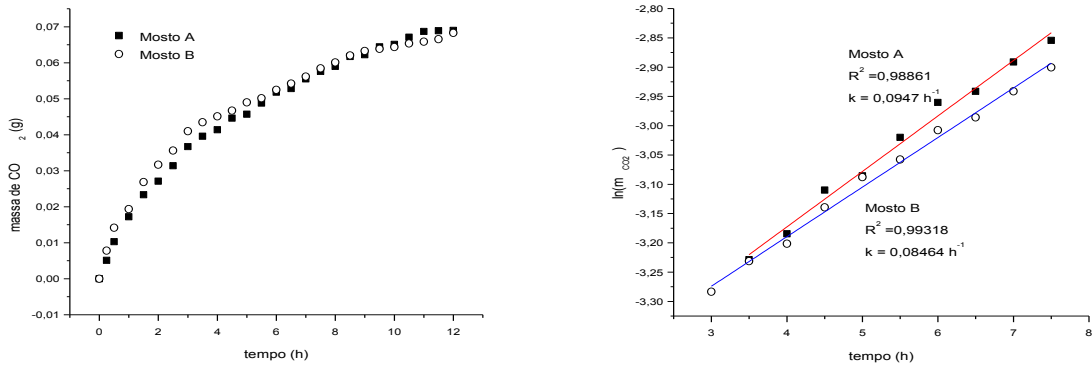


Figura VII. Gráficos da fermentação utilizando a levedura K1V-1112.

A Figura VIII apresenta dados da fermentação dos mostos utilizando a levedura da Red Star, Côte des Blancs. Pode-se perceber que, ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi maior para o mosto com menor quantidade de açúcar, evidenciando uma maior velocidade média de fermentação. Neste caso, nota-se uma maior influência da concentração de açúcar no desempenho da levedura. A fase exponencial da fermentação para ambos os mostos foi entre 6,0 e 10,0 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto A foi ligeiramente maior ($k = 0,16301 \text{ h}^{-1}$) comparada à fermentação do mosto B ($k = 0,15455 \text{ h}^{-1}$).

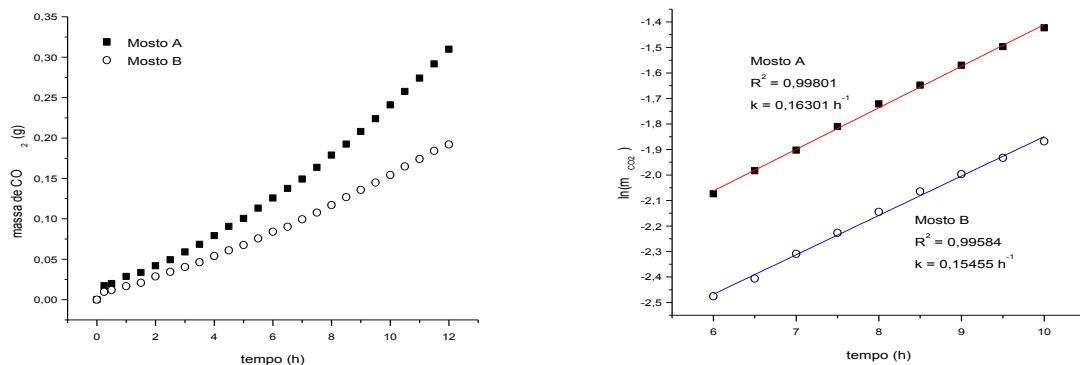


Figura VIII. Gráficos da fermentação utilizando a levedura Côte des Blancs

A Figura VI apresenta dados da fermentação dos mostos utilizando a levedura da Red Star, Premier Blanc. Pode-se perceber que, ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi maior para o mosto com menor quantidade de açúcar, evidenciando uma maior velocidade média de fermentação. Neste caso, nota-se uma maior influência da concentração de açúcar no desempenho da levedura, comparada às leveduras da Lalvin. A fase exponencial da fermentação para ambos os mostos foi entre 6,0 e 10,0 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto A foi ligeiramente maior ($k = 0,10249 \text{ h}^{-1}$) comparada à fermentação do mosto B ($k = 0,08998 \text{ h}^{-1}$).

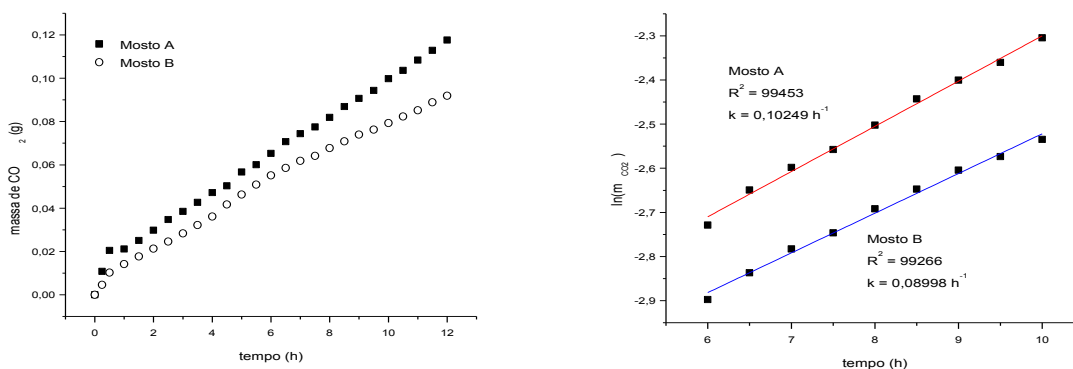


Figura VI. Gráficos da fermentação utilizando a levedura Premier Blanc

A Figura X apresenta dados da fermentação dos mostos utilizando a levedura da Red Star, Premier Cuvée. Pode-se perceber que, ao final das 12 horas de fermentação, a massa de CO₂ evoluída foi maior para o mosto com menor quantidade de açúcar, evidenciando uma maior velocidade média de fermentação. Novamente, observa-se uma maior influência da concentração de açúcar no desempenho da levedura comparado às leveduras estudadas da Lalvin. A fase exponencial da fermentação para ambos os mostos foi entre 7,5 e 10,5 horas. A velocidade da fase exponencial da fermentação do mosto B foi ligeiramente maior ($k = 0,17923 \text{ h}^{-1}$) comparada à fermentação do mosto A ($k = 0,15653 \text{ h}^{-1}$).

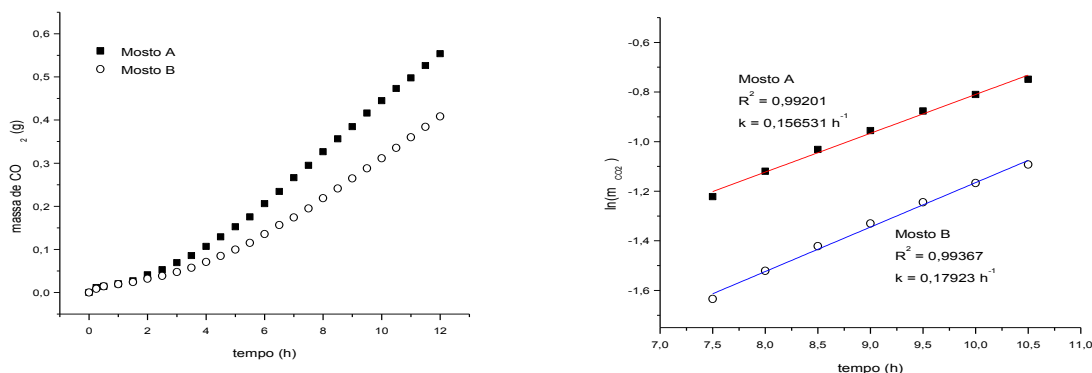


Figura X. Gráficos da fermentação utilizando a levedura Premier Cuvée

Em um estudo similar, Chagas et al. (2008) avaliaram a influência de diferentes condições de esterilização e composições de mosto para a fermentação de soluções diluídas de mel por *Saccharomyces cerevisiae*, encontrando valores de constante de velocidade da fase exponencial na faixa de 0,16 a 0,20 h⁻¹ indicando valores comparáveis aos alcançados com as leveduras do presente estudo.

CONCLUSÃO

Foi possível observar que diferentes cepas de levedura apresentam diferentes cinéticas de fermentação, sendo tal fato evidenciado pelos diferentes períodos em que o período exponencial foi alcançado e diferentes constantes de velocidade da fase exponencial. As leveduras Premier Cuvée e Côte des Blancs apresentaram os melhores desempenhos e a maior sensibilidade ao aumento da concentração de açúcar comparadas às demais leveduras. Estudos futuros fazem-se necessários para avaliar quantitativamente a influência de cada parâmetro bem como o perfil de ésteres formados e outras características pós-fermentação para avaliar se alguma das leveduras se destaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATT, C.A. & TORTORELLO, M.L. 2014. Encyclopedia of Food Microbiology. 2 ed. Amsterdam Elsevier.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial, Brasília, DF, Seção 1, p. 20, 2009.
- CAMPBELL, M. K. 2000. Bioquímica. 3 ed. Porto Alegre, Artmed.
- CATALUÑA, E. 1984 Uvas e vinhos. Rio de Janeiro, Globo.
- CHAGAS N. V., ROSA M. R., REIS A. H., TORRES Y R., SANTOS J. M. T., RIGO M. 2008 Estudo de Cinética de Fermentação Alcoólica por Células de *Saccharomyces Cerevisiae* em Mel Diluído. Revista Ciências Exatas e Naturais. 10:202-210.
- EMBRAPA. 2003 Embrapa Meio Norte (Teresina – PI) Produção de Mel: Sistema de Produção.
- FLEET, G. H., 2003 Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology. 86:11-22.
- IVORRA, C. PÉREZ-ORTÍN, J.E. DEL OLMO, M. 1999 An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A Molecular Study. Biotechnology and Bioengineering. 64:698-708.
- JOSHI, V. K. PANDEY, A. 1999 Biotechnology: food fermentation. New Delhi: Educational Publishers & Distributors. 2:647-744.
- LEPE, J. A. S LEAL, I. B. 2004 Microbiología enológica: Fundamentos de vinificación. 3. ed. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, p.761.

- NAVRÁTIL, M. STURDÍK, E. GEMEINER, P. 2001 Batch and continuous mead production with pectate immobilised, ethanol-tolerant yeast. *Biotechnology Letters*. 23:977–982.
- NELSON, D.L., COX, M.M. 2011 *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5 ed. Porto Alegre, Artmed.
- PEREIRA, A.P.R. 2006 *Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel*. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- PISKUR, J. et al. 2006 How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *TRENDS in Genetics*. 22:183-186.
- SROKA, P.; TUSZYŃSKI, T. 2007 Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chemistry*. 104:1250-1257.
- VOLPE, P.L.O. 1997 Estudo da fermentação alcoólica de soluções diluídas de diferentes açúcares utilizando microcalorimetria de fluxo. *Química Nova*. 20:528-534.