

## INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES NA CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DE SUCO DE UVA-JAPÃO POR *SACCHAROMYCES SP*

Diego Todescato<sup>1</sup>; Letícia S. Catarina<sup>1</sup>; Loana D. Fortes<sup>1</sup>; Toni Jefferson Lopes<sup>2\*</sup>; Adriano da Silva<sup>3</sup>; Murilo Cesar Costelli<sup>1</sup>; Adriano Cancelier<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Engenharia Química, UNOCHAPECO - Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Chapecó, SC.

<sup>2</sup>ICET - Instituto de Ciências Exatas e da Terra, UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso.

<sup>3</sup>FURG - Fundação Universidade Federal do Rio Grande - Campus Santo Antônio da Patrulha, RS.

<sup>4</sup>Departamento de Engenharia Química, UFSM - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

**Resumo:** A produção de uma bebida fermento-destilada a partir da uva-Japão apresenta-se como uma boa opção de complementação de renda para os pequenos produtores rurais. Os ensaios fermentativos foram conduzidos sob diferentes diluições de suco de uva-Japão (30 e 50%), diferentes temperaturas (30 e 35 °C), sem e com a adição de micronutrientes (fontes de K<sup>+</sup>, Mn<sup>++</sup>). As análises realizadas ao longo do processo fermentativo fazem referência à concentração de substrato (açúcar) e de células, com acompanhamento do pH e produção de etanol. De acordo com os dados obtidos, verificou-se um crescimento microbiano considerável para o teste com 2,5 g de fermento biológico, 30% de suco diluído em água a 30 °C e com adição de potássio como micronutriente, sugerindo que o mesmo é capaz de metabolizar os açúcares presentes no caldo, convertendo-o em biomassa e metabólitos secundários, mesmo em baixas concentrações. Desta forma, pode-se sugerir o uso da uva-Japão (*Hoveniadelphica*) como fonte de carbono e nutrientes para processos fermentativos utilizando-se cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições moderadas de operação, para a produção de etanol ou outros metabólitos com possível interesse comercial.

**Palavras-chave:** Fermentação alcoólica. Uva-Japão (*Hoveniadelphica*). Destilação. Micronutrientes.

**Influence of nutrients addition in the fermentation kinetics of Japanese Grape juice by *Saccharomyces SP*.** The production of a fermented distilled drink from Japanese grape presented as a good option of income complement to small farmers. The fermentative tests were conducted under different juice dilutions of Japanese grape (30 and 50%), different temperatures (30 and 35 °C), with and without the addition of micronutrients (sources of K<sup>+</sup>, Mn<sup>++</sup>). The analyses carried during the fermentative process are related to the concentration of substrate (sugar) and cells, with pH supervision and ethanol production. In accordance with the data obtained, it was verified a considerable microbial growth for the test with 2.5g of yeast, 30% of juice diluted in water at 30 °C and with potassium addition as micronutrient, suggesting that the same is capable of metabolize the sugars that are present in the broth converting it into biomass and secondary metabolites, even in low concentrations. So the use of Japanese grape (*Hoveniadelphica*) can be suggested as carbon and nutrients source for fermentative processes using *Saccharomyces cerevisiae* commercial strains, under moderate conditions of operation, for the production of ethanol or other metabolites with possible commercial interest.

**Keywords:** Alcoholic fermentation. Japanese grape (*Hoveniadelphica*). Distillation. Micronutrients.

\* E-mail: tonijl@unochapeco.edu.br

## 1 Introdução

O tema central do projeto é o desenvolvimento de um processo para a produção de água ardente a partir do pseudofruto da uva-Japão. Assim, os estudos foram direcionados para as etapas de fermentação do mosto e destilação de seu produto. A proposta de produzir um destilado foi baseada em estudos mercadológicos, pois a produção de destilados similares (oriundos da cana-de-açúcar) é feita de forma pulverizada, por centenas de pequenos fabricantes que comercializam regionalmente seus produtos.

Esta situação motiva pesquisadores de diferentes áreas a pensar na elaboração de estratégias que possam minimizar tais problemas, proporcionando a permanência dos agricultores no campo e assegurando-lhes condições dignas de sobrevivência. Na esfera tecnológica, o desenvolvimento de novos produtos, com baixo custo de industrialização/processamento e com alto valor agregado, contribuiria para o aumento da renda *per capita* dos agricultores familiares.

Este trabalho apresenta uma proposta para o desenvolvimento de produtos utilizando-se da uva-Japão (*Hoveniadelphicisthunberg*) como matéria prima. O fato desta ser encontrada em grande quantidade na região oeste de Santa Catarina e, atualmente, ser destinada apenas ao corte para produção de energia, contribuiu para sua escolha na pesquisa proposta.

Ainda como fatores positivos tem-se que a planta é de rápido crescimento, não apresenta doenças ou pragas que comprometam sua produção e, apesar de ser exótica, é bem adaptada ao nosso clima e solo, por isso, não exige grandes cuidados no seu cultivo, apresentado elevada produtividade e fácil reprodução (CARVALHO, 1994).

Para o desenvolvimento e a implementação desta tecnologia foram usadas técnicas bastante difundidas e simples, permitindo uma fácil adaptação dos agricultores à produção. Estas se baseiam na fermentação seguida da destilação, designando assim um produto fermento-destilado, de boa rentabilidade, pois a uva-Japão possui um elevado teor de açúcar, cerca de 18,4% em massa de material seco (SUTTISRI *et al.*, 1995). Para estabelecer um comparativo, o teor de açúcar da uva *Cabernet Sauvignon* é de 14,5% (RIZZON, 2002).

Para produção de bebidas alcoólicas, o fermento biológico (*Saccharomyces sp.*) é muito usado, com temperatura ideal de processamento situada entre 26 e 35 °C. Este fermento promove uma fermentação tranqüila e rápida que não deve ocorrer em menos de 16 horas ou mais de 48 horas. Caso a temperatura ultrapasse os 35 °C, o fermentado será afetado pelo desenvolvimento de bactérias homofermentativas ou lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*) (CRISPIM *et al.*, 2000), que degradam a glicose e a frutose dando origem ao ácido láctico e outros subprodutos, que além de alterar o gosto, irão contaminar o produto que poderá apresentar

características nocivas ao consumo humano (LIMA *et al.*, 2001).

No processo fermentativo para produção de álcoois em bebidas, como etanol, os microrganismos fazem uso dos açúcares presente na matéria-prima, para desenvolvimento de seu metabolismo celular, e também de outros constituintes da mesma. O crescimento dos microrganismos é um processo dinâmico que requer energia química e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e a manutenção das células. Os macronutrientes são exigidos em quantidades relativamente elevadas e desempenham papéis fundamentais na estrutura e metabolismo das células. Os micronutrientes são essenciais para a atividade de certas enzimas, funcionando como cofatores. A água, o oxigênio e o nitrogênio são de extrema importância para o crescimento da cultura microbiana, que necessitam, ainda, de alguns constituintes inorgânicos como o fósforo, sódio, enxofre, cálcio e magnésio. (GUSMÃO *et al.*, 2006).

A Tabela 1 apresenta as concentrações dos principais nutrientes minerais para uma boa fermentação alcoólica. Esses nutrientes podem já estar presentes no mosto, sendo desnecessárias adições.

Tabela 1: Concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica.

Nutriente mineral	Concentração (mg/L)	Nutriente mineral	Concentração (mg/L)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	40 – 5900	Co <sup>++</sup>	3,5
P	62 – 560	Co <sup>++</sup>	10
K <sup>+</sup>	700 – 800	Zn <sup>++</sup>	0,5 – 10
Ca <sup>++</sup>	120	Cu <sup>++</sup>	7
Mg <sup>++</sup>	70 – 200	Mn <sup>++</sup>	10 – 33
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	7 – 280	Mn <sup>++</sup>	10 (10 - 80)
Na <sup>+</sup>	200	Fé <sup>++</sup>	0,2

Fonte: LIMA, 1964.

Na fase de fermentação, as principais variáveis de estudo são a composições do caldo fermentativo em função do percentual em volume de suco de uva-Japão utilizado para uma condição de temperatura e concentração inicial de fermento e adição de nutrientes (K, Mg, Zn, S, Ca). Já na fase de destilação, serão avaliadas a razão de refluxo (GEANKOPLIS, 1978), a temperatura ideal de destilação e a necessidade de adaptações dos alambiques tradicionais, já instalados, sempre visando à melhoria da qualidade do produto final.

Portanto, o projeto de pesquisa teve por objetivo estudar a viabilidade técnica do uso da uva-Japão para a produção de bebida através do processo de fermentação seguido pelo processo de destilação, avaliando-se a influência da adição de nutrientes sobre a eficiência do processo de fermentação de suco de uva-Japão por *Saccharomyces sp.* para produção de etanol e elaboração de bebida destilada.

Considerando-se este cenário, o projeto proposto irá contribuir para o aumento do capital intelectual da região, promovendo seu desenvolvimento através de uma nova alternativa de emprego e renda aos produtores locais. Também contempla a situação ambiental, incentivando a preservação do meio ambiente e o plantio de árvores, fato que contribui para a fauna e a flora regional, já tão degradadas ao longo dos anos.

## 2 Material e Métodos

### Obtenção do suco da uva-Japão

A uva-Japão foi lavada com água destilada, pesada e prensada, obtendo-se o suco puro, que foi filtrado para a retirada de impurezas e resíduos sólidos.

### Processo de Fermentação

As fermentações foram conduzidas em escala laboratorial, em sistema batelada, em frascos erlenmeyers de 500 mL acondicionados em banho termostático para controle da temperatura, acompanhando-se a temperatura interna do caldo fermentativo com auxílio de um termômetro acoplado a tampa de cada frasco.

As concentrações de suco utilizadas para os cultivos avaliados foram de 30 e 50% de suco em água destilada, totalizando um volume de 500 mL de caldo fermentativo, sendo pasteurizado a 80 °C por 20 minutos. Após estabilização a 30 °C foi adicionado fermento biológico liofilizado de *Saccharomyces cerevisiae*, (1,5 g, 2,0 g e 2,5 g). Para avaliar o efeito de micronutrientes no processo adicionou-se 0,025 g de  $Mn^{++}$  e 2,0 g de  $K^+$ .

A cada hora de fermentação retiraram-se amostras, as quais foram filtradas a vácuo, em filtro *milipore* com membrana de acetato de celulose de 0,8  $\mu m$ , seca em estufa a 105 °C por 24 horas e previamente tarada. Após a filtração foram novamente secas a 105 °C por 24 h, sendo a concentração celular obtida por gravimetria, dividindo-se a massa média de células seca (g) pelo volume de suspensão filtrado (5 mL).

## 3 Resultados e Discussão

Observa-se através da Figura 1, que representa os cultivos com suco na concentração de 50% à temperatura de 35 °C, a boa adaptação do microrganismo ao meio de cultivo e as fontes de nutrientes, demonstrado pela ausência de fase lag em três dos cultivos.

Apenas para o cultivo com menor massa de fermento inicial aplicado (1,5 g) observa-se uma fase de adaptação de cerca de 3 h, indicando que a concentração de substrato neste caso está elevada para a concentração de células viáveis presentes no caldo. Este ensaio foi o único que apresentou fases de crescimento melhor definidas, porém com uma fase exponencial curta, levando a uma pequena multiplicação celular e uma fase estacionária longa.

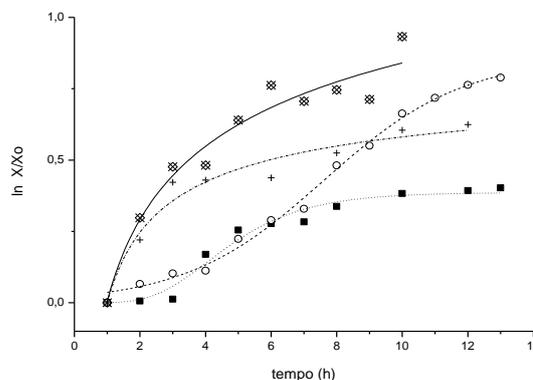


Figura 1: Comportamento da concentração celular para os ensaios com concentração de substrato de 50% à temperatura de 35 °C e: + 2,5 g; ○ 2,0g; ■ 1,5 g de fermento biológico; ⊗ 2,5 g de fermento biológico com 0,025 g de  $Mn^{++}$ .

Pode-se verificar no ensaio com 2,5 g de fermento biológico a ocorrência de multiplicação celular até 10 horas de fermentação, porém sem que se possa constatar fases de crescimento celular bem definidas. Similarmente, o ensaio conduzido com a mesma massa de fermento e com suplementação de fonte de manganês, demonstra a boa adaptação do microrganismo ao meio de cultura e um bom desenvolvimento celular. A estabilização do crescimento celular, sem uma produção de células tão acentuada quanto o ensaio sem adição do micronutriente, indica que as células atingiram mais rápido uma fase estacionária. Esta fase é importante para a fermentação alcoólica, pois nela é produzida a maior parte dos metabólitos secundários, entre eles etanol e compostos de aroma.

Para o ensaio realizado com 2,0 g de fermento biológico, percebe-se que a adição de uma menor quantidade de fermento resultou em uma maior concentração celular final para o ensaio, devido a uma menor competição propiciando uma maior possibilidade de crescimento. Observa-se também um rápido crescimento inicial e uma fase exponencial definida e longa.

Verifica-se na Figura 2, que representa os cultivos com suco na concentração de 30% à temperatura de 35 °C, que assim como nos ensaios com 50% de suco, houve uma boa adaptação do microrganismo ao meio de cultivo, haja visto que em nenhum dos ensaios observa-se a presença de fase lag, contudo não observa-se uma boa diferenciação entre as outras fases de crescimento.

Os cultivos realizados com 1,5 g de fermento e com 2,5 g adicionado de fonte de manganês forma os que apresentaram uma fase estacionária mais bem definida e menores concentrações celulares finais. Enquanto os outros cultivos apresentaram elevadas concentrações finais de célula.

Fica evidenciado a partir da Figura 2 que adição de fonte de potássio contribui para o bom crescimento celular. Segundo Muntz (1947), a adição de potássio e amônio é necessária no sistema, pois contribui para a formação de hexoses bifosfatadas a partir de hexose monofosfatada. Quando se adiciona potássio ou amônio à mistura em fermentação, a glicose é fermentada e favorece a formação de CO<sub>2</sub>. Esta é uma das fases intermediárias na transformação da hexose em álcool.

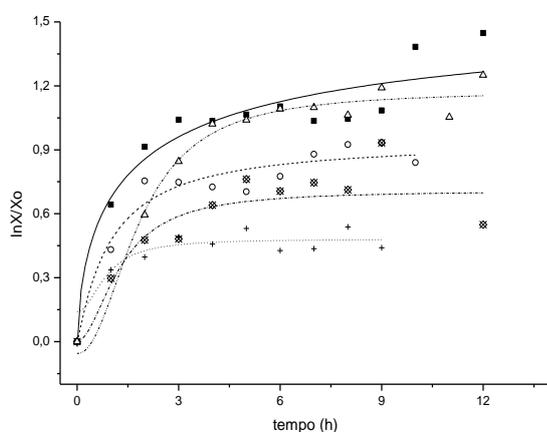


Figura 2: Comportamento da concentração celular para os ensaios com concentração de substrato de 30% à temperatura de 35 °C e: + 1,5 g; ○ 2,0 g; ■ 2,5 g de fermento biológico; △ 2,5g de fermento biológico com 2,0 g de K<sup>+</sup>; ⊗ 2,5 g de fermento biológico com 0,025 g de Mn<sup>++</sup>.

Para os ensaios com 2,5 g de fermento biológico, apesar da redução na quantidade de substrato disponível, houve um crescimento bastante elevado, demonstrando um bom aproveitamento da fonte de carbono para reprodução.

#### 4 Conclusões

De acordo com os dados obtidos, verificou-se um crescimento de microrganismo considerável sugerindo que o mesmo é capaz de metabolizar os açúcares presentes no suco de uva-Japão convertendo-o em biomassa, bem como a suplementação com

micronutrientes auxilia no crescimento celular e na produção de metabólitos, indicando que esta correção pode levar a melhores rendimentos de processo.

Desta forma, pode-se sugerir o uso da uva-Japão (*Hovenia dulcis*) como fonte de carbono e nutrientes para processos fermentativos utilizando-se cepas comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, sob condições moderadas de operação, para a produção de etanol ou outros metabólitos com possível interesse comercial.

#### 5 Agradecimentos

A Fundeste, UNOCHAPECÓ e Fape pelo apoio financeiro.

#### 6 Referências

- AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, V. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: Edgar Blücher, 227p. (Série Biotecnologia, 5), 1983.
- CARVALHO, P. E. R. **Ecologia, Silvicultura e Usos da Uva-Japão (*Hovenia Dulcis Thunberg*)**. Circular Técnica nº23, Ministério da agricultura, do abastecimento e da Reforma Agrária, EMBRAPA, CNPFLORESTAS Colombo-PR., 1994.
- CRISPIM, J. E., *et al.* **Manual da produção de aguardente de qualidade**. Guaíba: Agropecuária, 2000.
- GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and unit operations**. 3<sup>th</sup> ed., New Jersey: Prentice Hall, 1993.
- LIMA, U.A. **Estudo dos principais fatores que afetam os componentes do coeficiente não álcool das aguardentes de cana**. Piracicaba. 141 p. Tese (Cátedra), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 1964.
- MUNTZ, J. A. The rôle of potassium and ammonium in alcoholic fermentation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 653-665, 1947.
- OGIHARA, Y., CHEN, Y. e KOBAYASHI, Y.. A new prosapogenin from *Hovenia sapanin D* by mild alkaline degradation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 2574-2575, 1987.
- PERRY, R. H., GREEN, D. W., MALONEY, J. O., **Perry's Chemical Engineers' Handbook**, 7<sup>th</sup> ed., New York: McGraw-Hill, 1998.
- SUTTISRI, R.; LEE, I. S.; KINGHORN, A. D.. Plant-derived triterpenoid sweetness inhibitors. **Journal Ethnopharmacology**, v. 47, n. 1, p. 9-26, 1995.