

ESTUDO DA SUPLEMENTAÇÃO DO SUCO DE MAÇÃ PARA SUA FERMENTAÇÃO POR *Saccharomyces cerevisiae*

Adriana Andréia Rossi, Cláudia Rodrigues Barbosa, Giovani Brandão Mafra de Carvalho, Rodrigo Basso, Messias Borges Silva.

Escola de Engenharia de Lorena – USP/ Departamento de Biotecnologia, Estrada Municipal do Campinho, Caixa Postal 116, CEP: 12602-810. Lorena-SP, e-mail: dri.rossi@terra.com.br

Resumo

O presente trabalho propôs avaliar a necessidade de se suplementar suco de maçã destinado à produção de bebida fermentada por *Saccharomyces cerevisiae*, a fim de se obter maior teor alcoólico e maior produtividade em etanol. Foi utilizado um planejamento fatorial 2^4 para estudar os efeitos da adição dos nutrientes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 e extrato de levedura sobre as variáveis resposta concentração de etanol e produtividade em etanol. Após a análise estatística verificou-se que em relação a variável resposta etanol para se obter maiores concentrações, na região estudada, deve-se adicionar 10 g/L de extrato de levedura e com relação a produtividade, verificou-se influência positiva na adição de extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, devendo-se mantê-los nas concentrações de 5,0 g/L e 2,0 g/L, respectivamente.

Palavras-chave: maçã, bebida fermentada, suplementação nutricional.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

O processo de fermentação de suco de maçã visando à obtenção de bebida alcoólica já era conhecido no Mediterrâneo Oriental há mais de 2000 anos (LAPLACE *et al.*, 2001) e é bem difundido o fato de que sucos de maçãs contêm os nutrientes necessários para o desenvolvimento de leveduras (BINNING & POSSMANN, 1993). A principal fonte de carbono e energia são os açúcares, com teores acima de 100 g/L suficientes para promover o crescimento microbiano (NOGUEIRA & WOSIACKI, 2005). Os principais açúcares presentes na maçã são: glicose, frutose e sacarose. No suco a frutose ocorre em maior concentração, cerca de 6% (p/v). Estão presentes também compostos nitrogenados que são utilizados pela *Saccharomyces sp.* durante a fase de crescimento, exercendo importantes funções na biossíntese de proteínas e nas funções enzimáticas, influenciando o crescimento e o metabolismo das leveduras, chegando a constituir 10% da sua matéria seca (JULIEN *et al.*, 2000).

Além de carbono e nitrogênio, estão presentes também fontes de compostos inorgânicos, como nitratos, e também sais minerais em mg/100g de fruta: 44 a 163 de K; 1,50 a 23 de Ca; 1,50 a 18 de Mg e 3,50 a 26 de P (BEECH & CARR, 1977). Com relação a necessidade do microrganismo em questão, o fósforo, sob a forma de fosfatos é importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucléicos; o enxofre é necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e cisteína e para a síntese de vitaminas como a biotina e tiamina; o potássio é ativador de enzimas e regulador da

pressão osmótica; e o magnésio desempenha um importante papel no crescimento da levedura, como cofator em muitas reações metabólicas (CARVALHO *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a necessidade de se suplementar o meio fermentativo (suco de maçã), e a influência de cada composto adicionado na produção de etanol e produtividade utilizando planejamento estatístico e assim extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimento.

Material e Métodos

O suco de maçã foi extraído em processador *Walita*, centrifugado a 3000rpm por 20min e em seguida foi filtrado à vácuo. Após a extração, o suco foi submetido a tratamento térmico em banho-maria a 65°C por 25min a fim de se eliminar a carga microbiana contaminante. O suco foi conservado em geladeira a 4°C.

Pesaram-se as maçãs e o suco para a determinação da eficiência da extração do suco.

A levedura cervejeira *Saccharomyces cerevisiae* 308 (tipo *lager*) procedente da coleção de cepas da Academia Doemens - Alemanha, foi fornecida pela Microcervejaria da Escola de Engenharia de Lorena – USP.

O meio de crescimento empregado foi constituído dos seguintes nutrientes (g/L): glicose, 20; KH_2PO_4 , 2,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 e extrato de levedura, 10, com pH ajustado para 4,5, mantido em incubadora de movimento rotatório a 30°C e 200rpm.

Foram realizados 20 ensaios em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 25mL de meio mantidos em incubadora de movimento rotatório a 30°C e 200rpm. O meio foi constituído de suco de

maçã e suplementado com os mesmos nutrientes empregados no inóculo, exceto a glicose, nas concentrações apresentadas na tabela 1. O pH foi ajustado para uma faixa entre 4,5-5,0. A quantidade de inóculo adicionada foi de 10% (v/v). O ensaio 20 refere-se ao controle, e seu objetivo foi verificar a eficiência do tratamento térmico, uma vez que este ensaio só continha suco de maçã sem inóculo.

Durante a fermentação foram realizadas análises indiretas de açúcar (°Brix) utilizando um refratômetro.

No final da fermentação foi determinado o teor alcoólico (% v/v), empregando o equipamento *Beer Analyzer 2* ANTON-PAAR-Áustria. O número de células por litro de amostra (células/L) foi determinado utilizando *Câmara de Neubauer*. A tabela 1 apresenta as concentrações dos nutrientes avaliados (g/L) em cada ensaio. Foi utilizado um planejamento fatorial 2⁴ com triplicata no ponto central no qual, as variáveis resposta analisadas foram concentração e produtividade volumétrica de etanol.

Tabela 1: Concentrações dos nutrientes (g/L) em cada ensaio

Ensaio	KH ₂ PO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	MgSO ₄ .7H ₂ O	Extrato de levedura
1	0	0	0	0
2	5	0	0	0
3	0	4	0	0
4	5	4	0	0
5	0	0	0,8	0
6	5	0	0,8	0
7	0	4	0,8	0
8	5	4	0,8	0
9	0	0	0	10
10	5	0	0	10
11	0	4	0	10
12	5	4	0	10
13	0	0	0,8	10
14	5	0	0,8	10
15	0	4	0,8	10
16	5	4	0,8	10
17	2,5	2	0,4	5
18	2,5	2	0,4	5
19	2,5	2	0,4	5

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio dos programas Statistica 5.0 e Design Expert 5.0.

Resultados

As maçãs e o suco extraído foram pesados obtendo-se uma eficiência na extração de 87,7%. A análise do suco extraído e a comparação com a literatura estão apresentadas na Tabela 2.

As concentrações iniciais (células/L) e de extrato solúvel (°Brix) foram de 5,0.10⁵ e 13,

respectivamente. Os resultados obtidos após a análise de cada ensaio estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2 – Análise de pH, Brix e de açúcares redutores do suco de maçã.

Variedade	pH	Brix	Açúcares redutores (g/L)
Gala (literatura)*	3,6	13,4	97,00
Gala	3,7	13,0	92,87

*Hashizume, 2001

Tabela 3 – Medida de extrato solúvel (°Brix), % álcool, número de células por litro e produtividade volumétrica em etanol das amostras.

Ensaio	Tempo de fermentação (h)	° Brix	% álcool (v/v)	Cél/L	Qp g/L.h
1	87,0	5	3,66	1,68.10 ⁸	0,33
2	79,5	3	4,57	1,33.10 ⁸	0,45
3	25,0	3	4,80	5,25.10 ⁸	1,51
4	23,5	3	5,03	5,25.10 ⁸	1,68
5	43,0	3	4,25	2,88.10 ⁸	0,78
6	74,0	3	4,53	1,70.10 ⁸	0,48
7	18,5	3	3,24	5,50.10 ⁸	1,38
8	17,5	3	4,50	3,88.10 ⁸	2,02
9	20,0	3	5,59	9,13.10 ⁸	2,20
10	22,0	3	5,31	5,38.10 ⁸	1,90
11	22,0	3	5,24	5,38.10 ⁸	1,88
12	22,0	3	5,37	3,63.10 ⁸	1,92
13	22,0	3	5,24	4,38.10 ⁸	1,88
14	22,0	3	5,19	5,63.10 ⁸	1,86
15	22,0	3	4,98	8,00.10 ⁸	1,78
16	30,0	3	4,73	11,00.10 ⁸	1,24
17	15,0	3	4,75	8,38.10 ⁸	2,49
18	15,0	3	4,86	7,75.10 ⁸	2,55
19	15,0	3	4,83	8,75.10 ⁸	2,54
20	-	13	0	0	0

Discussão:

Pelo resultado do ensaio 20 pode-se verificar que o tratamento térmico empregado foi eficiente, não havendo influência de microrganismos contaminantes no meio.

Observa-se que a maior concentração de etanol obtida foi de 5,59% (v/v) referente ao ensaio 9, que foi realizado adicionando apenas extrato de levedura (X₄) ao meio e a menor concentração de etanol obtida foi de 3,66% (v/v) referente ao ensaio 1, que foi realizado sem suplementação de nutrientes ao meio. A maior produtividade de etanol obtida foi de 2,56g/L.h referente ao ensaio 18 (ponto central), o qual foi realizado com a adição de todos os nutrientes nas concentrações demonstradas na tabela 1 e o menor valor de produtividade foi de 0,3321g/L.h

referente ao ensaio 1, o qual continha apenas o suco de maçã. A análise dos efeitos dos nutrientes sobre a resposta concentração de etanol está apresentada na Tabela 4. Verifica-se que apenas os fatores $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (X_3) e extrato de levedura (X_4) apresentaram efeito principal significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) sobre a variável resposta. O efeito do fator X_3 é negativo indicando que a adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ prejudica a produção de etanol (%v/v). De forma similar, como o efeito do fator X_4 é positivo, sua adição aumenta a quantidade de etanol produzida. A elevação da concentração de extrato de levedura do nível inferior ao superior provoca um aumento de 52,76% no rendimento em etanol.

As interações entre os fatores X_1 e X_4 e entre X_2 e X_3 também são significativas em ($p < 0,05$). Observa-se que a adição de KH_2PO_4 (X_1) ao meio diminuiu a concentração de etanol obtida (ensaio 10) quando comparado com a concentração obtida adicionando-se apenas extrato de levedura (ensaio 9). A concentração de etanol foi maior quando se adicionou apenas $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (ensaio 5) comparando-se com o ensaio 7. A interação entre os fatores proporcionou diminuição da variável resposta, o que pode ser confirmado pelo sinal negativo dos efeitos da interações X_1X_4 e X_2X_3 (tabela 4).

Observa-se, pela tabela 5, que o modelo linear é significativo ($p < 0,05$), no entanto há evidência de falta de ajuste deste aos dados experimentais. Como o valor do coeficiente de determinação ($R^2 = 0,88028$) não foi satisfatório, realizou-se a análise da curvatura do modelo, obtendo-se um valor de $p = 0,8155$, indicando que os dados experimentais não se adequam a um modelo quadrático.

Tabela 4 – Estimativa dos efeitos e nível de significância (p) para os parâmetros estudados.

Fator	Efeitos	p-valor
Média	4,7721	$2 \cdot 10^{-11}$
X_1	0,2788	0,10180
X_2	-0,0563	0,71891
X_3	-0,0364	0,04242
X_4	0,8838	0,00038
X_1X_2	0,0638	0,68370
X_1X_3	0,0313	0,84105
X_1X_4	-0,3913	0,03193
X_2X_3	-0,3838	0,03450
X_2X_4	-0,1963	0,22948
X_3X_4	0,0213	0,89145

Analisando a superfície de resposta (figura 1) verifica-se que foi obtido um plano. Essas análises indicam uma forte tendência de o modelo ser linear na região investigada, o valor não satisfatório de R^2 pode ser devido a erros experimentais. O modelo que relaciona

concentração de etanol (Y_1) com as variáveis codificadas é representado pela equação 1.

Tabela 5: Análise da variância para o modelo linear

Fonte de Variação	Soma Quadrática	*GL	Média Quadrática	p-valor
Regressão	5,35	10	0,54	0,0198
Resíduo	0,72	7	0,10	-
Erro Puro	$6,467 \cdot 10^{-3}$	2	$3,23310^{-3}$	-
Falta de ajuste	0,72	5	0,14	0,0222
Total	6,08	18	-	-

$R^2 = 0,8812$ R^2 ajustado= 0,7114

*GL= graus de liberdade

$$Y_1 = 4,7721 + 0,1394 X_1 - 0,0281 X_2 - 0,1819 X_3 + 0,4419 X_4 + 0,03188 X_1X_2 + 0,0156 X_1X_3 - 0,1956 X_1X_4 - 0,1919 X_2X_3 - 0,0981 X_2X_4 + 0,0106 X_3X_4 \quad (\text{equação 1})$$

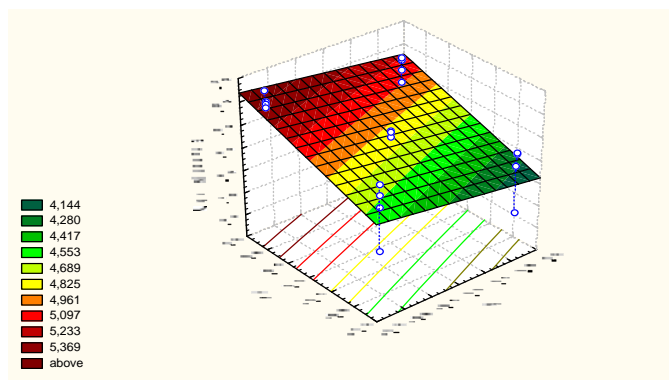


Figura 1: Superfície de Resposta para a variável dependente etanol

Observa-se que para se obter maiores concentrações de etanol deve-se deslocar a região experimental para maiores valores de X_4 e menores valores de X_3 . Segundo Neto *et al.* (2001), o deslocamento deve ser realizado ao longo de uma trajetória perpendicular às curvas de nível, além de que, para se otimizar o processo devem ser feitos novos ensaios seguindo o caminho de máxima inclinação da superfície ajustada.

A análise dos efeitos dos nutrientes sobre a resposta produtividade está apresentada na Tabela 6. Após a análise dos dados considerando ajuste a um modelo linear, o valor do coeficiente de determinação obtido foi de $R^2 = 0,63032$, e como este não foi satisfatório, foi realizada a análise da curvatura para os dados experimentais. Os valores de p e de R^2 encontrados foram de 0,0003 e 0,9997, respectivamente, indicando que os dados experimentais se adequam melhor a um modelo quadrático. Esse novo valor de R^2 indica que o modelo explica 99,97 % da variação total das respostas. Verifica-

se que apenas os fatores extrato de levedura (X_4) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X_2) apresentaram efeito principal significativo ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) sobre a variável resposta. Observa-se (tabela 7) que esse modelo é significativo com 98% de confiança.

Tabela 6 – Estimativa dos efeitos e nível de significância (p) para os parâmetros estudados.

Fator	Efeitos	p-valor
X_1	-0,0225	0,83326
X_2	0,4450	0,00347
X_3	-0,0600	0,57837
X_4	0,7550	0,00016
X_1X_2	0,1025	0,35267
X_1X_3	-0,0325	0,76148
X_1X_4	-0,1825	0,11962
X_2X_3	-0,0850	0,43631
X_2X_4	-0,7000	0,00025
X_3X_4	-0,2300	0,06064

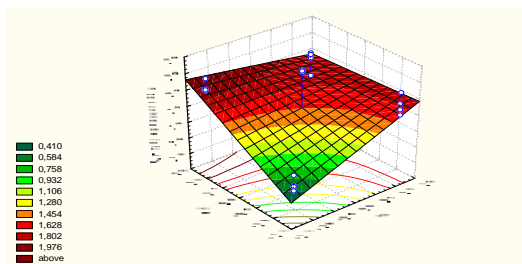
Tabela 7: Análise da variância para o modelo quadrático.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	*GL	Média Quadrática	p-valor
Regressão	5,76	15	0,38	0,0024
Resíduo	$1,867 \cdot 10^{-3}$	2	$9,33310^{-4}$	
Erro puro	$1,867 \cdot 10^{-3}$	2	$9,33310^{-4}$	-
Total	8,68	18	-	-

$R^2 = 0,9997$ R^2 ajustado = 0,9972

*GL= graus de liberdade

Analisando a superfície de resposta (figura 2) verifica-se uma tendência de formação de curva no plano obtido, confirmando a disposição dos pontos de acordo com um modelo quadrático. Para a determinação dos coeficientes do modelo quadrático é necessário realizar um passo ascendente, ou seja, experimentos



complementares ao planejamento original.

Figura 2: Superfície de Resposta para a variável dependente produtividade de etanol.

Observa-se que o extrato de levedura foi significativo nas duas variáveis resposta estudadas. Segundo Yamada, et al. (2003), o extrato de levedura contém, entre outros, os aminoácidos: valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, lisina,

leucina e histidina que conforme Carvalho et al. (2007), são essenciais ao metabolismo da levedura e devem ser fornecidos ao meio fermentativo.

Conclusão

Conclui-se que para se aumentar a concentração de etanol na região estudada é necessário adicionar somente extrato de levedura a 10 g/L ao meio fermentativo constituído de suco de maçã. Por outro lado, para se obter maiores produtividades volumétricas de etanol, deve-se adicionar extrato de levedura a 5,0 g/L e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 2 g/L.

Referências

- BEECH, F.W.; CARR, J.G. **3 – Cider and Perry**. In: ROSE, A.H. Alcoholic Beverages, Academic Press, Londres, Nova York e San Francisco, 139-313 pp. 1977.
- BINNIG, R.; POSSMANN, P. Apple Juice. In: NAGY, S.; CHEN, C. S.; SHAW, P. E. **Fruit Juice. Processing Technology**. Auburndale: Agscience, 1993, p. 271-317.
- CARVALHO, G. B. M.; ROSSI A. A., ALMEIDA e SILVA, J. B. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2º parte – A fermentação. **Revista Analytica**. 2007, n.26, 46-54 p.
- HASHIZUME, T. Tecnologia da Sidra. In: Almeida Lima, U.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Shmidell, W. Biotecnologia Industrial (Biotecnologia na Produção de Alimentos v.4), Edgar Blucher, Brasil, 2001, pp. 69-90.
- JULIEN, A.; ROUSTAN, J. L.; DULAU, L.; SABLAYROLLES, J.M. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: technological consequences. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 51, n. 3, 2000, p. 215-222.
- LAPLACE, J. M.; JACQUET, A.; TRAVERS, I.; SIMON, J. P.; AUFRAY, Y. Incidence of land and physicochemical composition of apples on the qualitative and quantitative development of microbial flora during cider fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, n. 4, 2001, p. 227-233.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Campinas, SP: Editora Unicamp, 2001. V.1. 401p.
- YAMADA, A. E.; ALVIM, I.D.; SANTUCCI, M.C.C.; SGARBIERI, V.C. **Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados**. Rev.Nutr. v.16 n.4. Campinas out. /dez. 2003