



## Cinética de crescimento de levedura em mosto de cagaita para produção de bebida fermentada

### *Kinetics of growth of yeast in wort of cagaita for production of fermented beverage*

Ana C. A. Lopes<sup>1</sup>, Ismael de O. Pinto<sup>2</sup>, Clóvis M. de Souza<sup>3</sup>, Alex S. R. Cangussu<sup>4</sup>, Mara E. S. de Oliveira<sup>5</sup>

**Resumo:** Objetivo deste trabalho foi realizar o estudo inicial da cinética de crescimento de levedura para servir como base para futuros estudos visando determinar a potencialidade do mosto de cagaita como fonte de substrato na fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* visando a produção de bebida fermentada. Os frutos foram coletados na região sul do estado de Tocantins e após clarificação foi realizado a inoculação com concentração inicial de  $1,8 \times 10^3$  Células por ml. Os parâmetros analisados foram, pH, teor de sólidos solúveis e densidade ótica a 550nm e taxa de crescimento celular. Como resultados observamos que o TSS inicial apresenta valor bem acima do encontrado em outras frutas como cajá, melancia e caju, os valores de pH inicial do mosto encontra-se abaixo da maioria dos dados da literatura e abaixo do considerado ideal para o crescimento de leveduras e ainda que a velocidade de crescimento abaixo da maioria dos dados disponíveis na literatura são possivelmente decorrentes de fatores nutricionais ou em relação à cepa utilizada.

**Palavras-chaves:** *Eugenia dysenterica*, fermentação submersa, bebida.

**Abstract:** The objective this work was the initial study of growth kinetics of yeast to serve as a basis for future studies to determine the potential of the wort cagaita as a source of substrate in the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* aimed at producing of fermented drink. Fruits were collected in the southern state of Tocantins and after clarification was conducted inoculation with initial concentration of  $1.8 \times 10^3$  cells per ml. The analyzed parameters were pH, soluble solids, and optical density at 550nm and cell growth rate. As a result we observe that the initial TSS presented value well above that found in other fruits like cajá, watermelon and cashew, the values of initial pH of the wort is below the majority of the literature data and below the considered ideal for the growth of yeasts and although the growth rate was lower than most of the data available in the literature is possibly arising from nutritional factors or relative to the strain used.

**Keywords:** *Eugenia dysenterica*, Submerged fermentation, Drink;

\*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 10/10/2014; aprovado em 20/04/2015

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Engenharia Biotecnológica na Universidade Federal do Tocantins. E-mail: anaclaudia.alencar@uft.edu.br

<sup>2</sup>Engenheiro Agrônomo, Mestrando em Ciências Florestais e Ambientais pela Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Malerbiologia, Complexo Casadinho, Brasil. E-mail: ismael@uft.edu.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Professor do Curso de Agronomia, Doutor da Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Processamento de Alimentos, Brasil. E-mail: clovis@uft.edu.br

<sup>4</sup>Professor do Curso de Engenharia Biotecnológica da Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: cangussu@uft.edu.br

<sup>5</sup>Professora do Curso de Engenharia, Mestre da Universidade Federal do Tocantins, Brasil. E-mail: maraelisa@uft.edu.br

## INTRODUÇÃO

Devido a grande diversidade de frutas tropicais existente no país, podemos observar o surgimento de diversos trabalhos com o enfoque na produção de bebidas fermentadas de várias frutas, tais como: cajá, figo da índia, jaca e melancia. (TORRES NOTO ET. AL., 2006; CHAGAS, 2008; ASSIS NETO, 2010; FONTAN, 2011). Tais trabalhos surgem da necessidade de melhorar o aproveitamento destas frutas bem como para agregação de valor as mesmas, possibilitando assim o surgimento de novas fontes de obtenção de renda.

Entre as leveduras mais utilizadas na fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae* merece destaque principalmente por seu vasto uso em diversos processos dentre os quais panificação, cervejaria, destilaria, entre outros e seu uso foi possível desde então, devido à sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (NEVES, 2006).

O processo de fermentação alcoólica realizado por *S. cerevisiae* é resultado da transformação dos açúcares redutores presentes no mosto em álcool, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e em menor escala gliceróis, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e acetatos. Tais compostos minoritários conferem coloração e sabor característicos da bebida fermentada (GAVA, 1984; FONTAN, 2011; JANZANTTI, 2004).

Segundo a legislação brasileira, fermentados de fruta são bebidas com graduação alcoólica que varia de 4 a 14% v/v a 20°C, obtidos a partir da fermentação de mosto de fruta sã, fresca e madura de uma única espécie, do respectivo suco integral ou concentrado, ou polpa, que poderá nestes casos, ser adicionado de água. (BRASIL, 2009).

A cagaita (*Eugenia dysenterica*) é uma árvore frutífera que ocorre no cerrado ou cerradão e frutifica entre outubro e dezembro. Com até 10 m de altura e com frutos globoso, amarelo-claro e levemente ácidos são muito apreciados e seu uso alimentar é amplo. De acordo com Calbo (1990), pode ser utilizado na fabricação de vinagre, álcool, geleias e sorvetes sendo consumido principalmente na forma in natura. (RIZZINI, 1971)

Desta forma, o objetivo deste trabalho é realizar o estudo inicial da cinética de crescimento de levedura para servir como base para futuros estudos visando determinar a potencialidade do mosto de cagaita como fonte de substrato na fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* visando à produção de bebida fermentada.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento de produção da bebida fermentada de cagaita foi conduzido no Laboratório de Processamento de Produtos Agropecuários e de Biotecnologia ambos da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi.

A coleta dos frutos foi realizada na região sul do estado de Tocantins, no município de Figueirópolis. Os frutos maduros, de caducidade espontânea, foram coletados no chão, manualmente.

Para o preparo do mosto e realização do experimento foram selecionados somente frutos maduros de bom aspecto (sem injúria física, podridão ou contaminação visível).

Após a seleção, os frutos foram lavados em água clorada, para eliminação dos possíveis microrganismos existentes, e enxaguados em água corrente.

A polpa foi obtida por meio do despulpamento manual, seguida de passagem em peneira, para a remoção das sementes, e coada para a separação do bagaço. A polpa foi embalada em sacos plásticos e congelada a -10°C sem aditivo químico até seu uso nos experimentos.

Para a preparação do mosto a polpa foi descongelada, por 12 horas, a temperatura ambiente (28°C).

Devido a turbidez da polpa, e com objetivo de facilitar a quantificação direta e indireta do crescimento microbiano através da medida da densidade ótica e quantificação de células, após o descongelamento da polpa, foi realizado sua clarificação por centrifugação a 2.500 rpm por 7-8 minutos.

Após a centrifugação a polpa foi sulfitada com a adição de metabissulfito de potássio na proporção de 0,1g.L<sup>-1</sup>. O metabissulfito foi adicionado uma única vez antes da adição do inóculo.

O microrganismo utilizado neste experimento foi obtido através de fermento biológico comercial liofilizado para panificação (marca Fleischmann®) proveniente do comércio local da cidade de Gurupi – TO.

A fração inicial do mosto foi preparada com 10% v/v com adição de 0,75 g.L<sup>-1</sup> de fermento biológico com a qual se obteve uma concentração inicial de 1,8 x 10<sup>3</sup> Células por ml. O mesmo foi mantido a 28°C por 12 h em reator dotado de bodoque para minimizar a entrada de oxigênio e evitar contaminações sob agitação constante em placa agitadora de bancada a 160 rpm até a inoculação.

O inóculo foi transferido ao fermentador principal constituído por um erlenmeyer de 500mL contendo 300mL de volume de trabalho, o cultivo foi realizado a baixa concentração de oxigênio em placa agitadora a 160 rpm a 28°C.

Durante o processo fermentativo foram coletadas alíquotas em intervalos constantes a cada hora durante a observação da fase lag – 8 primeiras horas – e com início da fase log as alíquotas passaram a ser retiradas a cada trinta minutos – entre a 8ª e a 20ª hora.

Os parâmetros analisados foram, pH obtido por medição direta com uso de pHmêtro de bancada, teor de sólidos solúveis totais expresso em °Brix medido com refratômetro de bancada e densidade ótica a 550nm me em espectrofotômetro.

Durante a fase exponencial de crescimento celular no processo fermentativo, a taxa de crescimento é proporcional à concentração celular. Admitindo-se que nessa fase a velocidade específica de crescimento celular é constante, ela pode ser determinada a partir da Eq. 1 (STROPPA et al., 2009):

$$\text{Eq. 1 } dx/dt = \mu X \Rightarrow \ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t$$

Onde  $\mu$  é a Velocidade Específica de Crescimento (h<sup>-1</sup>).

A quantificação de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. As amostras foram retiradas do fermentador e procedeu-se diluição seriada em água peptonada com posterior homogeneização dos tubos em agitador do tipo vórtex. Azul de metileno (0,1%) foi adicionado para a coloração de células inviáveis e a contagem foi realizada em microscópio ótico.

## RESULTADOS e DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a curva de crescimento de levedura avaliado pela densidade ótica – método indireto – e contagem de células por mL – método direto. Observa-se que a quantificação por ambos os métodos apresenta um perfil cinético semelhante demonstrando sua equiparidade.

Analisado o perfil cinético podemos observar que houve a presença da fase de latência (lag) entre o período de início do processo até a 5ª hora. Este intervalo é caracterizado pela síntese de enzimas necessárias ao metabolismo e pela adaptação da levedura ao meio sendo não apresentando um crescimento celular significativo tornando-se indesejável e mostrando que o procedimento de inoculação adotado não foi bem sucedido. Tal fato pode ser caracterizado principalmente pela baixa concentração de células viáveis presentes no inoculo (SCHMIDELL et al., 2001).

A segunda fase caracterizada pela transição e início do crescimento celular, situa-se entre a 5ª e a 12ª hora onde podemos observar um crescimento gradual do número de

células bem como elevação da densidade ótica do meio, fato ocasionado devido à adaptação da levedura ao meio.

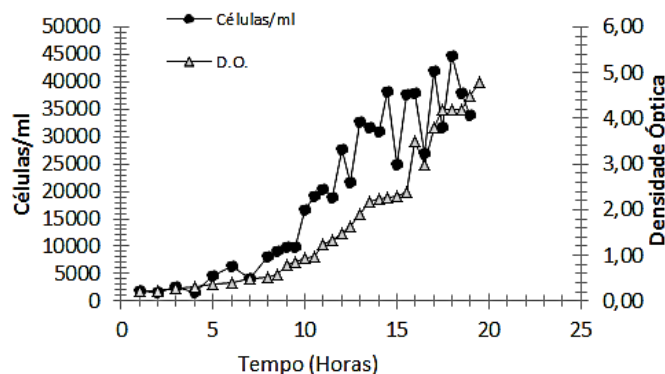
A fase exponencial (log) situada entre a 12ª hora é o fim da análise dos dados, é caracterizada pela máxima velocidade de crescimento celular, período onde as células se reproduzem intensamente com taxa específica de crescimento máxima devido a alta disponibilidade de nutrientes.

A fase de declínio, que indica a perda irreversível da capacidade de divisão celular levando a uma elevada taxa de morte da levedura não chegou a ser registrado neste trabalho.

O mosto de cagaita clarificado utilizado apresentou TSS (Teor de Sólidos Solúveis Totais) inicial de 7,6ºBrix. Valor bem acima do encontrado em frutas como cajá, melancia e caju que possuem TSS inicial de 4,00, 6,00 e 0,00 respectivamente (TORRES NETO et al., 2006; CHAGAS, 2008; ASSIS NETO, 2010; FONTAN, 2011).

Ainda vale ressaltar que o pH inicial do mosto (3,12) encontra-se abaixo da maioria dos dados da literatura e abaixo do pH considerado ideal para o crescimento de leveduras que segundo Lopes et al.(2005) que se situa entre 4 a 4,5.

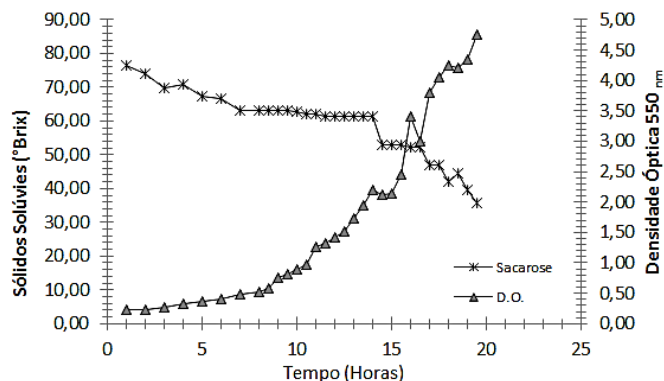
**Figura 1.** Curva de Crescimento de Levedura: relação entre densidade ótica a 550nm e Biomassa (Cel/ml).



Analisando os resultados da Figura 2 verifica-se que durante o processo fermentativo houve um constante declínio do teor de sólidos solúveis em decorrência do consumo do substrato pelo microrganismo para produção de biomassa, ácidos orgânicos e etanol até atingir níveis próximos de 5,9º

Brix após 19 horas de fermentação. Apesar de a coleta ser realizada até a 20ª hora, ainda observa-se uma tendência de continuidade do crescimento celular evidenciado pela curva de crescimento e ao não esgotamento de substrato no mosto.

**Figura 2.** Consumo de Sacarose e Aumento da Densidade Ótica 550nm em função do tempo de fermentação.



A Figura 3 mostra as variações do pH e da densidade ótica 550nm durante o processo fermentativo. Pode-se observar que o pH decresceu de 3,17 para 2,89, e em contrapartida, o crescimento celular evidenciado pela leitura realizada ainda

continua exponencialmente crescente até o final do período. Esta redução no pH é resultado principalmente do aumento da acidez total ao longo do processo fermentativo e são

decorrentes da produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico e succínico pelas leveduras (BORZANI et al.,1983).

Podemos observar que mesmo a faixa de pH do ensaio estando fora do considerado ideal para o crescimento da levedura – 4 a 4,5 – (LOPES et al., 2005), não houve inibição do crescimento. Há duas possibilidades para explicar tal fato, a primeira se refere à tolerância da cepa inoculada a baixos valores de pH e elevadas concentrações de ácidos no substrato e a segunda estaria associada a presença de leveduras selvagens já presentes no mosto antes da inoculação também com tal tolerância.

Esta resistência influencia diretamente na acidez do produto final e esta relacionado com a estabilidade e coloração da bebida fermentada favorecendo assim a qualidade e aceitação comercial do produto e diminuição da probabilidade de contaminação consequentemente aumentando a durabilidade do produto (RIZZON et al., 1994).

Com base na cinética de crescimento realizada pela levedura no mosto de cagaita foi possível calcular a velocidade de crescimento celular  $\mu_{max}$ . Sendo essa obtida pelo coeficiente de inclinação da reta encontrado na Figura 04 a qual é de  $0,1801\text{ h}^{-1}$ . O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) da regressão linear pode ser considerado elevado ( $0,9898$ ), mostrando bom ajuste aos dados experimentais.

Em comparação a revisão sobre parâmetros cinéticos elaborada por Alves (1996) em que ele relata valores de  $\mu_{max}$  entre  $0,19$  e  $0,64\text{ h}^{-1}$  este trabalho apresenta um  $\mu_{max}$  baixo ( $0,1801$ ). A velocidade específica de crescimento pode ter sido influenciada por fatores nutricionais inerentes do mosto bem como as condições de cultivo tais como aeração, pH, e temperatura. Também devido a mesma ser oriunda de cepas utilizadas na panificação, pois essas são especializadas principalmente na produção de gás carbônico ao contrário de leveduras utilizadas para a produção de etanol na vinificação. (SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 3. Variação do pH e da Densidade Óptica, em função do tempo de fermentação.

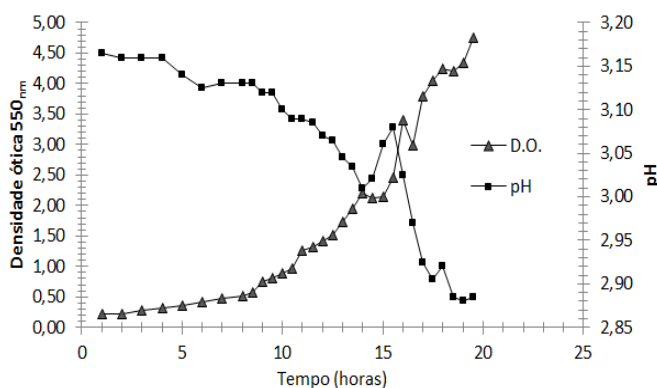
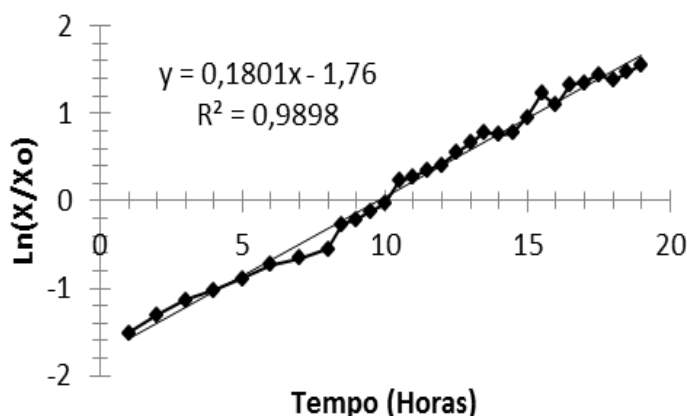


Figura 4. Dados de log Natural do valor de Biomassa versus Tempo para determinação de  $\mu_{max}$ .



## CONCLUSÕES

O TSS inicial apresenta valor bem acima do encontrado em frutas como cajá, melancia e caju, demonstrando a potencialidade da polpa de cagaita para sua utilização como substrato na produção de bebida fermentada;

O pH inicial do mosto encontra-se abaixo da maioria dos dados da literatura e abaixo do pH considerado ideal para o crescimento de leveduras;

A velocidade de crescimento celular baixa possivelmente é decorrente de fatores nutricionais ou em relação à cepa utilizada;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D.M.G. 1994. Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. 128f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. São Paulo.

- ALVES, J. G. L. F. 1996. Estudo da influência da temperatura nacinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- ASSIS NETO, E.F.; CRUZ, J.M.P.; BRAGA, A.C.C.; SOUZA, J.H.P. 2010. Elaboração de bebida alcoólica de Jaca (*Artocarpusheterophyllus*Lam.). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. 04. 186-197.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 2.314, de 04 de setembro de 1997.
- BORZANI, W.; AQUARONI, E.; LIMA, U.A.Engenharia Bioquímica, v.3 São Paulo.1983.
- CHAGAS, N.V.; ROSA, M.R.; REIS, A.H.; TORRES, T.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. 201-204
- CALBO, M. E. R.; LIMA, J. N. C.; CALBO, A. G. 1990. Fisiologia pós-colheita de frutos de cagaita. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília. 2. 15-18.
- CORAZZA, M. L.;RODRIGUES, G.; NOZAKI,J. 2001. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**. 24. 449-452.
- DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F.; LIMA, L. C. O. 2003. Metodologia para elaboração de fermentado de Cajá (*Spondiasmonbin* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 23. 342-350.
- FONTAN, R.C.I.;VERISSIMO, L.A.A.; SILVA, W.S.;BONOMO, R.C.F.;VELOSO, C.M. 2011. Cinética da Fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. *Cepa*. 29. 203-210.
- GLAZER A.N. & NIKAIDO H. Ethanol. In:\_\_\_ Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology. Berkeley, CA, USA: Cambridge University Press, p. 458-484. 2007.
- HENICK-KLING, T. Yeast and Bacterial Control in Winemaking. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (Org.) Modern methods of plant analysis, **new series** 6. Springer-Verlag, 1988.
- JANZANTTI, N. S. 2004. Compostos voláteis e qualidade de sabor de cachaça. 179f. Tese (Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. São Paulo.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. **Process Biochemistry**. 16. 42-49. 17
- LOPES, R.V.V.; SILVA, F.L.H. 2006. Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**. 6. 76-80.
- LOPES, R.V.V.; ROCHA, A.S.; SILVA, F.L.H.; GOUVEIA, J.P.G. 2005. Aplicação do planejamento fatorial para otimização do estudo da produção de fermentado do fruto da palma forrageira. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 7. 25-32
- MALTA, H. L. 2006. Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique. Dissertação (Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Minas Gerais.
- NOBRE T. P.; HORII, J.;ALCARDE, A. R. 2007. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 27. 20-25.
- OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; SILVA, F.L.H.; FLORENTINO, E.R. 2011. Produção de fermentado alcoólico do fruto de mandacaru sem espinho. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 13. 269-275.
- OLIVEIRA, M.E.S.; PANTOJA, L.; DUARTE, W.F.; COLLELA, C.F.; VALARELLI, L.T.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R. 2011. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilized yeast cell fermentation. **Food Research International**. 44. 2391-2400.
- OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. 2004. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford.20. 19-24.
- PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. 1998. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentations in cachaça distillery. **Revista de Microbiologia**. 29. 69-79.
- SILVA, C.L.C. 2009 Seleção de linhagens de *Saccaromycescerevisiaefloculantes* e linhagens não produtoras de H<sub>2</sub>S e sua influência na qualidade da cachaça. 99f. Dissertação (Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Minas Gerais.
- STROPPA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. 2009. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**. 33. 1978-1983.
- STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**.v. 4, n. 17, p. 43-46, 1981.
- TORRES NETO, A. B.; SILVA, M. E.; SILVA, W. B.; SWARNAKAR, R.; SILVA, F. L. H. 2006. Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardiumoccidentale* L.). **Química Nova**.29. 489-492.
- WATSON, K. Temperature Relations. In:\_\_\_ The Yeasts. 2ed, Princeton, **Academic Press**, 1987.Cap. 3, p.41-71.