

QUANTIFICAÇÃO DO METABOLISMO RESPIROFERMENTATIVO DE LEVEDURAS DE CERVEJA, VINHO E PÃO POR MÉTODO ESTEQUIOMÉTRICO

RICARDO FIGUEIRA¹, LUCAS FELIPE DOS OUROS¹, ISABELA PENTERICHE DE OLIVEIRA¹, THALIA LEE LOPES DE ANDRADE¹, WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO¹

¹Departamento de Produção Vegetal/Área Horticultura, Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP. Av. Universitária, 3780 - Altos do Paraíso, CEP 18610-034, Botucatu, SP, Brasil. ricardo.figueira@unesp.br; lucasouros@hotmail.com; isapenteriche@hotmail.com; thalialda@hotmail.com; waldemar.venturini@unesp.br

RESUMO: A levedura alcoólica apresenta metabolismo respirofermentativo, respirando e fermentando simultaneamente. É possível mensurar o metabolismo fermentativo e respiratório de uma levedura alcoólica, conhecendo a quantidade de etanol formado na fermentação e de gás carbônico proveniente dos processos de respiração e fermentação. O objetivo deste trabalho foi calcular a taxa respiratória e fermentativa de diferentes cepas de levedura alcoólica por meio de método estequiométrico. Foram utilizadas cinco diferentes cepas de leveduras (panificação, cervejeira de alta fermentação (*ale*), cervejeira de baixa fermentação (*lager*), vinho tinto e vinho branco). O meio de cultivo foi mosto de cana de açúcar (15 °Brix). A fermentação transcorreu durante 8 horas, na temperatura ambiente, em fermentador aberto. A levedura cervejeira de alta fermentação e de panificação apresentaram as maiores taxas respiratórias (19,17% e 19,12%), as leveduras de vinho branco e cervejeira de baixa fermentação tiveram as maiores taxas fermentativas (90,48% e 89,67%), a levedura cervejeira de baixa fermentação produziu a maior quantidade de etanol (7,57%) e a levedura de panificação apresentou maior capacidade metabólica (131,59 g de sacarose consumidos).

Palavras-chave: fermentação, respiração, *Saccharomyces cerevisiae*.

QUANTIFICATION OF RESPIRO-FERMENTATIVE METABOLISM OF BEER, WINE AND BREAD YIELD BY ESTEQUIOMETRIC METHOD

ABSTRACT: The alcoholic yeast can breathe and ferment simultaneously, called respiro-fermentative metabolism. Yeast's respiration and fermentation metabolism can be measured considering the amount of ethanol produced in the fermentation process and the carbon dioxide produced in both respiration and fermentation processes. This research focused on calculating the respiration and fermentation rates of five alcoholic yeast strains (baker's, beer top-fermenting (*ale*), beer bottom fermenting (*lager*), red wine and white wine) from the stoichiometry. Sugar cane must (15 °Brix) was used as growth medium. Fermentation was performed in an open vessel at room temperature. A sample was taken hourly, and the fermentation process ended after 8 h. Beer top-fermenting yeast and baker's yeast resulted in higher respiration rates (19.17% and 19.12%), while white wine yeast and bottom-fermenting yeast resulted in higher fermentation rates (90.48% and 89.67%). Bottom-fermenting yeast produced higher amount of ethanol (7.57%) and baker's yeast presented higher metabolic activity (131.59 g of sucrose consumed).

Keywords: fermentation, respiration, *Saccharomyces cerevisiae*.

1 INTRODUÇÃO

Estequiometria é o cálculo da quantidade das substâncias envolvidas numa reação química. Este é feito com base nas leis das reações e é executado, em geral, com o auxílio das equações químicas correspondentes. Nas reações químicas, as substâncias reagem entre si originando produtos em proporções específicas. Desse modo, é possível calcular quanto de produto será formado, ou o rendimento da reação (FIOROTTO, 2013).

O metabolismo aeróbio e anaeróbio de uma levedura alcoólica pode ser estimado por método estequiométrico (VENTURINI FILHO et al., 2013; VENTURINI FILHO et al., 2014; VENTURINI FILHO et al., 2018). Conhecendo a quantidade de etanol e gás carbônico produzidos durante o processo fermentativo, é possível calcular por meio das equações estequiométricas da respiração e fermentação alcoólica a quantidade de açúcar fermentado e respirado pelo microrganismo.

De acordo com Käppeli (1986) e Gancedo e Serrano (1989), a respiração e a fermentação ocorrem simultaneamente nas leveduras alcoólicas. Em função disto, esses autores definiram o metabolismo desses microrganismos como *respirofermentativo*.

De acordo com Kocková-Kratochvílová (1990), o metabolismo aeróbio (respiração) e anaeróbio (fermentação alcoólica) é tradicionalmente mensurado manometricamente, baseado no consumo de oxigênio e produção de gás carbônico. A razão entre a respiração e a fermentação é expressa por um cociente respiratório Q_R cujo valor varia em função do tipo de levedura. Segundo esta autora, os valores de Q_R mais frequentemente relatados para leveduras de panificação são de 2 a 3, para leveduras de vinho de 6 a 10 e para leveduras cervejeiras de baixa fermentação de 10 a 30. A supressão da respiração afeta os valores de Q_R .

Em função da atividade respiratória, as leveduras podem ser classificadas em três grupos: a) prevalência do metabolismo aeróbio (levedura forrageira – respiração é responsável por 100% do metabolismo); b) metabolismo

aeróbio é semelhante ao anaeróbio (leveduras patogênicas, de panificação e cervejeiras de alta fermentação – respiração é responsável por 40 a 50% do metabolismo); c) prevalência do metabolismo anaeróbio (leveduras de destilaria, de vinho e cervejeiras de baixa fermentação – respiração é responsável por 10 a 15% do metabolismo) (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Briggs et al. (2004) também classificou as leveduras pela forma como esses microrganismos catabolizam os açúcares. No primeiro grupo estão as leveduras aeróbias obrigatórias que obtêm energia apenas por processo respiratório (*Rhodotorula*, *Lipomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodosporidium* e *Saccharomycopsis*), não fermentando açúcares. No segundo grupo, fazem parte as leveduras anaeróbias facultativas, isto é, respiram e fermentam de forma simultânea. Dentro deste grupo, há as leveduras respiratórias que catabolizam mais de 70% dos açúcares pela via aeróbia (*Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces* e *Pichia*), e as leveduras fermentativas que catabolizam 90% dos açúcares por processos anaeróbios (*Saccharomyces*, *Brettanomyces* e *Schizosaccharomyces*).

Briggs et al. (2004), citando Boulton e Quain (2001), citaram cinco processos de regulação do catabolismo de açúcares pelas leveduras: a) Efeito Crabtree *short-term*, redução da taxa de respiração pela adição de glicose ao meio; b) Efeito Crabtree *long-term*, repressão ou inativação das enzimas respiratórias da levedura pela presença de glicose no meio; c) Efeito Pasteur, redução da taxa de glicólise sob condições aeróbias; d) Efeito Kluyver, utilização aeróbia obrigatória de dissacarídeos; e) Efeito Custer, estimulação aeróbia da fermentação da glicose.

Exemplos do Efeito Crabtree *long-term* são relatados por Ribéreau-Gayon et al. (2006) e Ingledew (2009). Os primeiros autores afirmaram que em mosto de uva, devido às elevadas concentrações de açúcares, a levedura enológica apenas metaboliza açúcares pela via fermentativa. Mesmo na presença de oxigênio, não se observa a respiração. As leveduras do vinho sofrem elevada repressão catabólica pela

glicose presente no mosto. Mas, esses autores afirmam que a presença de oxigênio no mosto é importante para a síntese de ácidos graxos insaturados e esteróis, constituintes da membrana plasmática. O segundo autor relatou que a concentração de açúcares nos mostos das destilarias americanas de etanol é suficientemente alta para inibir a respiração do fermento. As leveduras metabolizam a glicose do mosto pela via fermentativa, produzindo etanol e gás carbônico. As leveduras utilizam o oxigênio presente no mosto no início do processo fermentativo para a produção de esteróis e ácidos graxos insaturados. Segundo este autor, as leveduras metabolizam mais de 90% dos açúcares por via fermentativa e o restante é utilizado no crescimento celular.

O objetivo deste trabalho foi quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura de panificação, de vinho tinto e vinho branco, e cervejeira de alta e baixa fermentação pelo método estequiométrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O planejamento experimental contou com cinco tratamentos compostos por leveduras secas de panificação (Fleischmann), vinho tinto (Baltosel Grand Cru), vinho branco (Blastosel FR95), cervejeira de alta fermentação - *ale* (Fermentis Safale S-33) e cervejeira de baixa fermentação - *lager* (Fermentis Saflager W-34/70) e três repetições, perfazendo 15 parcelas experimentais.

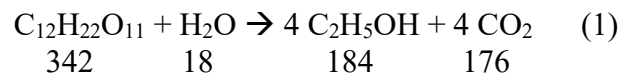
Cada parcela experimental constou de um fermentador aberto de 4 L (béquer), 1 kg de mosto de caldo de cana a 15,0 °Brix, 100 g de fermento seco e um bastão de polipropileno para desfazer a espuma formada no início da

fermentação. A temperatura inicial do mosto foi de 25 °C e o processo fermentativo transcorreu na temperatura ambiente (29±1 °C).

Após a inoculação, foram feitas oito leituras horárias da massa de mosto em fermentação, utilizando para isso uma balança de precisão (Gehaka BG 2000). A diferença entre a primeira e a oitava leitura correspondeu à massa de gás carbônico produzido durante o processo respirofermentativo.

O teor alcoólico do fermentado foi obtido pelo método da destilação por meio de um destilador de bancada (Buchi K355) e o teor alcoólico do destilado foi avaliado em densímetro digital (Mettler Toledo DM 45).

A partir da determinação do teor alcoólico do fermentado, foi calculada a massa de etanol produzida na fermentação alcoólica. Com esse resultado e utilizando a equação estequiométrica da fermentação alcoólica (Equação 1), mensurou-se a massa de sacarose consumida e a massa de gás carbônico produzida durante o processo de fermentação alcoólica.



Conhecendo a massa total de gás carbônico produzida durante o processo respirofermentativo e a massa de gás carbônico produzida durante o processo de fermentação alcoólica, foi possível obter por diferença a massa de CO₂ produzida durante a respiração. Com esse dado e usando a equação estequiométrica simplificada da respiração (Equação 2), foi calculada a massa de sacarose consumida durante o processo de respiração.



Somando-se as massas de sacarose consumidas nos processos de respiração e fermentação alcoólica, obteve-se a massa total de sacarose metabolizada pela levedura.

O açúcar de referência usado para os cálculos foi a sacarose por ser o carboidrato predominante no caldo de cana.

O mosto de caldo de cana foi analisado para os seguintes parâmetros: sólidos solúveis

(refratômetro digital marca Reichert, modelo r²i300); pol (polarímetro marca Anton Paar, modelo MCP 200); pureza (pol/Brix); pH (pHmetro marca Tecnal, modelo TEC-5).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo a análise estatística realizada por ANOVA e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($\alpha=5\%$) (VIEIRA, 2006).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de sólidos solúveis do caldo de cana usado no preparo dos mostos foi de 21,8 °Brix. Após a padronização com água de torneira filtrada em celulose e carvão ativo, o mosto apresentou as características físico-químicas descritas na tabela 1.

Tabela 1. Composição do mosto de caldo de cana.

Análises	Resultados
Sólidos solúveis (°Brix)	15,00
Pol (% m/m)	12,76
Pureza (%)	85,07
pH	5,31

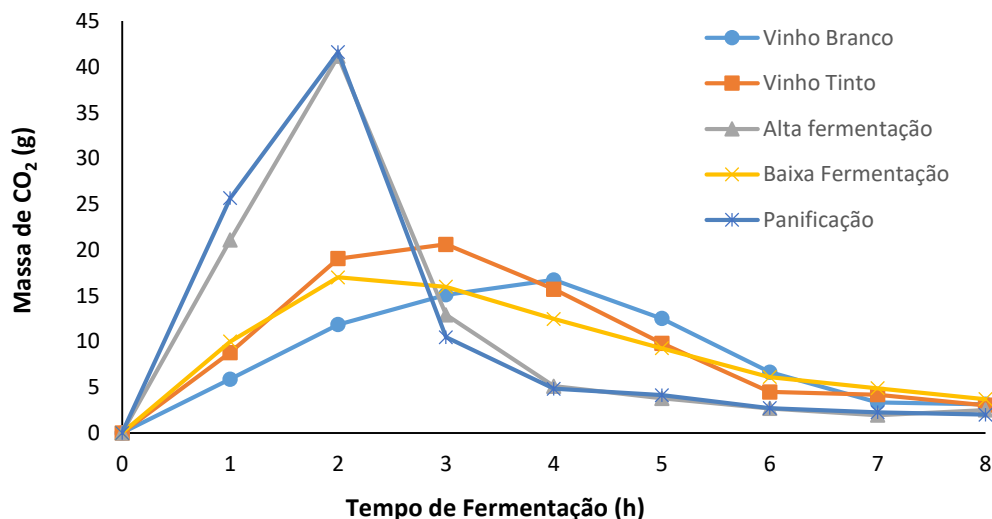
Os valores apresentados na Tabela 1 mostram que o mosto estava adequado para o processo fermentativo em termos de concentração de sólidos solúveis, sacarose e pH (ROSA; SOARES JUNIOR; FARIA, 2016).

As leveduras de panificação e cervejeira de alta fermentação (*ale*) apresentaram um padrão diferente de produção de CO₂ em relação às leveduras de vinho (branco e tinto) e cervejeira de baixa fermentação (*lager*) (Figura 1). As primeiras tiveram um pico de produção na segunda hora de processo, quando atingiram taxas acima dos 40 g/h, enquanto que as demais se aproximam de 20 g/h. As leveduras de panificação tem

como principal objetivo promover a expansão da massa de pão por meio do CO₂ produzido a fim de formar alvéolos na rede de glúten, o que contribui para a maciez do alimento. Já as leveduras *ale* provavelmente foram favorecidas pela temperatura ambiente durante o processo fermentativo (29±1 °C).

Esta rápida produção de gás carbônico pode ser uma característica das leveduras de panificação e cervejeira de alta fermentação e tem reflexo na taxa respiratória como será visto mais adiante. Resultados semelhantes foram obtidos por Venturini Filho et al. (2014) quando trabalharam com mosto de cana e uva a 15 °Brix e levedura de panificação.

Figura 1. Cinética da produção de gás carbônico das leveduras de vinho branco, vinho tinto, cerveja de alta fermentação, cerveja de baixa fermentação e pão.



Os dados da Tabela 2 mostram a sequência dos cálculos efetuados. As leveduras de pão e cerveja de alta fermentação foram as que apresentaram as maiores taxas respiratórias, enquanto que as leveduras de cerveja de baixa fermentação e a de vinho branco foram as que menos respiraram. Esses resultados estão em acordo com as observações de Kocková-Kratochvílová (1990) que relatou que as leveduras de panificação e as cervejeiras de alta fermentação apresentam metabolismo aeróbio semelhantes entre si e superior em relação às leveduras de destilaria, vinho e cervejeira de baixa fermentação.

As leveduras que apresentaram o metabolismo aeróbio mais intenso foram as

que menos produziram etanol. Da mesma forma, as leveduras que apresentaram o metabolismo anaeróbio mais intenso foram as que mais produziram etanol. Já o metabolismo respirofermentativo mais intenso, mensurado na forma de sacarose consumida durante os processos de fermentação e respiração, foi realizado pela levedura de pão e de vinho tinto, enquanto que a menor taxa metabólica foi apresentada pela levedura de vinho branco (Tabela 2). Como porcentagem de sacarose fermentada mantém relação (inversa) com a porcentagem de sacarose respirada, os valores da análise de variância são os mesmos para ambos metabolismos (Tabela 3).

Tabela 2. Quantificação da sacarose respirada e fermentada por levedura de vinho branco, vinho tinto, cervejeira de alta fermentação (*ale*), cervejeira de baixa fermentação (*lager*) e de panificação.

	Levedura de vinho		Levedura de cerveja		Levedura de Panificação
	Branco	Tinto	<i>Ale</i>	<i>Lager</i>	
TA (% v/v)*	7,31 b	7,34 b	6,92 c	7,57 a	7,13 bc
E (g)	59,73	59,50	55,68	61,65	57,26
CO ₂ F (g)	57,14	56,91	53,26	58,97	54,77
SF (g)	111,03	110,58	103,49	114,59	106,43
CO ₂ FR (g)	75,16	85,65	91,16	79,35	93,62
CO ₂ R (g)	18,03	28,74	37,91	20,38	38,85
SR (g)	11,68	18,61	24,55	13,20	25,16
SFR (g)*	122,70 c	129,20 ab	128,04 b	127,79 b	131,59 a
TSF (%)*	90,48 a	85,59 b	80,83 c	89,67 a	80,88 c
TSR (%)*	9,52 c	14,41 b	19,17 a	10,33 c	19,12 a

TA = Teor alcoólico; E = Massa de etanol produzida na fermentação; CO₂ F = Massa de CO₂ produzida na fermentação; SF = Massa de sacarose consumida na fermentação; CO₂ FR = Massa de CO₂ produzida na fermentação e respiração; CO₂ R = Massa de CO₂ produzida na respiração; SR = Massa de sacarose consumida na respiração; SFR = Massa de sacarose consumida na fermentação e respiração. TSF = taxa de sacarose fermentada; TSR = taxa de sacarose respirada; *Teste de Tukey ($\alpha=5\%$).

Tabela 3. Análise de variância dos resultados de teor alcoólico (% v/v), sacarose consumida na fermentação e respiração (g), taxa de sacarose fermentada (%) e taxa de sacarose respirada.

Teor alcoólico (% v/v)					
CV	GL	SQ	QM	F	p
Tratamento	4	0,706	0,176	26,305	<0,001
Resíduo	10	0,0671	0,00671		
Total	14	0,773			
Sacarose consumida na fermentação e respiração (g)					
Tratamento	4	126,988	31,747	22,443	<0,001
Resíduo	10	14,145	1,415		
Total	14	141,134			
Taxa de sacarose fermentada (%)					
Tratamento	4	256,426	64,107	212,808	<0,001
Resíduo	10	3,012	0,301		
Total	14	259,439			
Taxa de sacarose respirada (%)					
Tratamento	4	256,426	64,107	212,808	<0,001
Resíduo	10	3,012	0,301		
Total	14	259,439			

Exceção feita à levedura de vinho branco, todas as demais apresentaram massa de sacarose consumida durante os processos de fermentação e respiração acima da quantidade de sacarose existente no mosto. Isso pode ser explicado pelo fato da quantidade de açúcares (glicose, frutose e sacarose) presente no mosto ser superior à quantidade de sacarose calculada pela Pol (127,6 g).

4 CONCLUSÕES

Dentro das condições em que o experimento foi realizado, conclui-se que todas as leveduras testadas apresentaram metabolismo respirofermentativo, com predominância da fermentação alcoólica. Como todas as leveduras respiraram durante o processo, pode se afirmar que elas apresentam Efeito Crabtree *short-term*.

Pela simplicidade e rapidez deste método em mensurar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de leveduras alcoólicas, recomenda-se sua aplicação em aulas práticas de cursos de pós-graduação.

5 REFERÊNCIAS

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yeast and Fermentation**. London: Blackwell Science, 2001. 644 p.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. Metabolism of wort by yeast. In: BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, A. **Brewing: science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004. cap. 12, p. 401-468.

FIOROTTO, N. R. **Química: estrutura e estequiometria**. 1. ed. São Paulo: Editora Érica, 2013. 120 p.

GANCEDO, C.; SERRANO, R. Energy-yielding metabolism. *In*: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (ed.). **The yeast**. New York: Academic Press, 1989. v. 3, p. 205-259.

INGLEDEW, W. M. Yeast: physiology, nutrition and ethanol production. *In*: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. **The alcohol textbook**. 5. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. cap. 9, p. 101-113.

KÄPPELI, O. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* and related yeast. **Advances in Microbial Physiology**, Maryland Heights, v. 28, p. 181-208, 1986.

KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. Yeast metabolism. *In*: KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. **Yeast and yeast-like organisms**. Weinheim: VCH, 1990. cap. 5, p. 304-390.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIER, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. Biochemistry of alcoholic fermentation and metabolic pathway of wine yeasts. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. Chichester: Wiley, 2006. cap. 2, p. 53-77.

ROSA, C. A.; SOARES JÚNIOR, A. M.; FARIA, J. B. Cachaça de alambique. *In*: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2016. cap. 17, p. 359-369.

VENTURINI FILHO, W. G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T.; NOVAES, F. V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 227-236, 2013.

VENTURINI FILHO, W. G.; BRUNELLI, L. T.; TONIATO, J.; NOJIMOTO, T. Quantificação do metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica por método estequiométrico. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 29, n. 2, p. 135-141, 2014.

VENTURINI FILHO, W. G.; FIGUEIRA, R.; SARTORI, M. M. P.; AUER, S.; ANDRADE, T. L. P. Quantificação do metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica sob diferentes condições ambientais. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 1-10, 2018.

VIEIRA, S. **Análise de variância**. São Paulo: Atlas, 2006. 204 p.