

EFEITO DA ADIÇÃO DE SULFITO SOBRE A PRODUÇÃO DE ALCOÓIS SUPERIORES DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

L.E. Gutierrez*

RESUMO: Foi estudado o efeito de quatro concentrações de sulfito (19, 69, 119, 219 ppm) em mostos de melão de cana em pH 4,0 e o efeito do pH de mosto sulfitado sobre a produção de etanol, acetaldeído e os alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico durante a fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*. Não foram detectadas diferenças significativas entre os teores de etanol dos mostos sulfitados. Houve aumento significativo no teor de acetaldeído e redução significativa nos teores de alcoóis superiores com o aumento da concentração de sulfito. A elevação do pH do mosto sulfitado provocou aumento significativo nos teores de acetaldeído e alcoóis superiores não afetando a produção de etanol.

Termos para indexação: sulfito, fermentação alcoólica, óleo fusel, alcoóis superiores, *Saccharomyces cerevisiae*.

EFFECT OF SULFITE ON HIGHER ALCOHOLS PRODUCTION DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: The effect of sulfited medium and its pH on the etanol, acetaldehyde and higher alcohols production during fermentation of cane molasse by *Saccharomyces cerevisiae* was studied. There was no

* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - 13.400 - Piracicaba, S.P. e CEBTEC/FEALQ.

significant effect of sulfite on ethanol production. The results showed a significant increase in acetaldehyde and a reduction in higher alcohols content with the increase of sulfite concentration. The increase in the pH of sulfited medium caused an increase in acetaldehyde and higher alcohols content and did not affect ethanol production.

Index terms: sulfite, alcoholic fermentation, fusel oil, higher alcohols, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

O sulfito é um dos componentes de melaço que pode afetar o desenvolvimento da fermentação alcoólica. Segundo BASSO (1988), o teor de sulfito no melaço pode alcançar níveis de 700 ppm, o que poderia resultar em mostos com cerca de 175 ppm de SO_2 .

GLACET *et alii* (1975) verificaram que a adição de 1000 a 3000 ppm de sulfito resultou no aumento do tempo da fermentação alcoólica, enquanto UZUKA *et alii* (1985) verificaram que a concentração de acetaldeído aumentou com concentração de sulfito embora o ácido pirúvico não tenha sido afetado.

A descarboxilase pirúvica é capaz de descarboxilar outros cetoácidos além do ácido pirúvico (NORDSTROM, 1963; SUOMALAINEN & OURA, 1957) e essa enzima exige pirofosfato de tiamina como cofator, sendo que sulfito pode destruir a tiamina, diminuindo a atividade dessa enzima (WHITING, 1976). Outras enzimas necessárias para a fermentação alcoólica podem ser inibidas pelo sulfito, como as desidrogenases de gliceraldeído e alcoólica (MAIER *et alii*, 1986).

BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba-SP). Comunicação pessoal, 1988.

Diversos fatores afetam a produção de alcoóis superiores (óleo fusel) durante a fermentação alcoólica. NORDSTROM & CARLSSON (1965) verificaram que a deficiência de magnésio provocou maior formação de alcoóis superiores e FAHRSMANE *et alii* (1985) relataram que a produção de alcoóis superiores foi maior no gênero *Saccharomyces cerevisiae* do que no gênero *Schizosaccharomyces*. REYNAUD *et alii* (1983) verificaram que a metionina e o ácido glutâmico inibiram a formação de óleo fusel. BEECH & DAVENPORT (1970) verificaram que o suco de maçã sulfitado produziu cidra com teores menores de óleo fusel.

A formação de óleo fusel ocorre a partir da descarboxilação de cetoácidos provenientes de aminoácidos segundo experimentos clássicos de Ehrlich (BRAUN, 1957; INGRAHAM & GUYMON, 1960; YOSHIZAWA *et alii*, 1961). SUOMALAINEN & KERANEN (1967) relataram que a adição de valina aumentou o álcool isobutílico, leucina aumentou álcool isomílico e isoleucina aumentou álcool amílico opticamente ativo.

O objetivo do presente trabalho foi o de verificar o efeito de quatro concentrações de sulfito sobre a formação de alcoóis superiores e acetaldeído durante a fermentação alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Mosto: foi obtido por diluição de melão de cana com a seguinte composição: Brix volume: 82,1, açúcares redutores totais: 63,2%, Nitrogênio total: 550 ppm, Potássio; 2,3%, Magnésio: 0,42% e Cálcio: 0,23%. O pH do mosto foi acertado a 4,0 com solução de ácido sulfúrico e esterilizado a 120°C durante 15 minutos. O mosto testemunha apresentou 19 ppm de SO₂ e com a adição de sulfito de sódio foram obtidos mostos com 69, 119 e 219 ppm de sulfito. Açúcares redutores totais do mosto foi de 12,60%.

Ensaio de fermentação: 90 ml de mosto foram ino-

culados com 10 gramas de fermento de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) com 99% de viabilidade celular, e a fermentação conduzida, sem agitação, em tubos de centrífuga de 200 ml a temperatura de $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o final da fermentação, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante utilizado para as análises químicas e o fermento reutilizado para novas fermentações, realizando-se quatro ciclos fermentativos. Açúcares redutores do vinho foi de 0,70%.

Análises químicas: o vinho foi destilado em microdestilador Kjeldahl e a densidade do destilado obtida em densímetro digital Anton-Paar DMA 46, segundo AMORIM *et alii* (1982). Açúcares redutores totais do mosto e açúcares redutores do vinho e sulfito do mosto foram determinados segundo descrito em AMORIM *et alii* (1986). Acetaldeído, alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico foram determinados por cromatografia em fase gasosa (CG-17) com detetor de ionização de chama utilizando-se coluna metálica com HALLCOMID M18 a 15% sobre cromosorb W (CG-1904) com 2 metros de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno, temperatura do vaporizador 160°C , temperatura da coluna 110°C , temperatura do detetor 220°C , gás de arraste nitrogênio com fluxo de 50 ml/min. O volume de amostra injetado foi de 2 microlitros.

Análise estatística: foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições segundo PIMENTEL GOMES (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os teores de etanol, acetaldeído e os alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico do vinho obtido com diversas concentrações de sulfito em pH 4,0. Não foram observadas diferenças significativas no grau alcoólico dos diversos tratamentos, tendo o rendimento da fermentação alcoólica se situado em torno de 85%.

Como pode ser observado na Tabela 1, o sulfito afetou significativamente a produção de acetaldeído e alcoóis superiores. A concentração de acetaldeído aumentou com a adição de sulfito confirmando observações de UZUKA *et alii* (1985).

Os alcoóis superiores detectados no presente trabalho foram reduzidos significativamente com o aumento de concentração de sulfito no mosto (Tabela 1) confirmando observações feitas por BEECH & DAVENPORT (1970) para cidra.

O aumento na concentração de acetaldeído do vinho poderia aumentar a produção de glicerol e portanto reduzir os teores de etanol. Entretanto, esse aumento teórico do glicerol poderia resultar, no máximo, em aumento de cerca de 0,03 ml de etanol/100 ml de vinho.

Como a produção de alcoóis superiores está relacionada diretamente com o metabolismo de aminoácidos (INGRAHAM & GUYMON, 1960; YOSHIZAWA *et alii*, 1961; SUOMALAINEN & KERANEN, 1967), a diminuição na produção de alcoóis superiores provocada pelo sulfito poderia estar relacionada tanto com a redução do metabolismo de aminoácidos pelas leveduras como pela inibição das enzimas descarboxilase pirúvica (WHITING, 1976) e desidrogenases alcoólica e de gliceraldeído-3-fosfato (MAIER *et alii*, 1986).

Na Tabela 2 são apresentados os teores de etanol, acetaldeído e alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico do vinho obtido de mosto sulfitado com 219 ppm de SO_2 e em três valores de pH. A elevação do pH não afetou significativamente o grau alcoólico mas provocou aumento significativo nos níveis de acetaldeído e alcoóis superiores. Provavelmente a forma mais prejudicial ao metabolismo de aminoácidos estaria em pH mais baixo. Com a elevação do pH, diminui a proporção de SO_2 livre e aumenta a forma HSO_3^- e SO_3^{2-} . O acetaldeído aumentou significativamente com o aumento do pH, porque a forma HSO_3^- está em maior proporção (ANACLETO & UDEN, 1982).

Tabela 1. Etanol, acetaldeído e alcoóis superiores de vinho obtido com diferentes concentrações de sulfito (Média de 4 repetições).

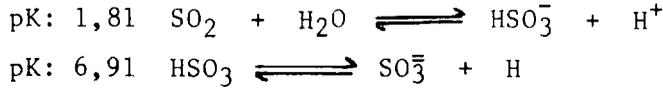
| Sulfito | Etanol | Acetaldeído | Alcoóis | | |
|----------|--------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | | | n-propílico | isobutílico | isoamílico |
| 19 | 6,52a | 34,50a | 26,75a | 55,50a | 129,00a |
| 69 | 6,54a | 90,75ab | 23,25ab | 48,50ab | 124,75ab |
| 119 | 6,52a | 159,25bc | 22,00ab | 40,00bc | 105,50ab |
| 219 | 6,50a | 230,50c | 19,75b | 37,25c | 99,00b |
| C.V. | 0,72% | 33,67% | 11,69% | 7,92% | 12,33% |
| d.m.s.5% | | | | | |

a,b,c: nas colunas, médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ao nível de $p < 0,05$.

Tabela 2. Etanol, acetaldeído e alcoóis superiores de vinho obtido em três valores de pH com mosto de 219 ppm de SO₂ (Média de 4 repetições).

| pH | Etanol % vol. | Acetaldeído mg/l | Alcoóis mg/l | | |
|----------|------------------|---------------------|-----------------|-------------|------------|
| | | | n-propílico | isobutílico | isoamílico |
| 4,0 | 6,54a | 262,50a | 17,00a | 36,50a | 84,50a |
| 4,5 | 6,54a | 298,00a | 22,00ab | 68,50b | 124,50b |
| 5,0 | 6,54a | 322,75b | 24,50b | 72,75b | 138,50b |
| C.V. | 0,53% | 7,18% | 15,35% | 15,16% | 8,81% |
| d.m.s.5% | 0,07 | 41,76 | 6,41 | 17,75 | 20,17 |

a, b, c : nas colunas, médias seguidas de letras diferentes, diferem significativamente ao nível de $p < 0,05$.



Sendo que na forma de HSO_3^- ocorre a reação da adição com acetaldeído, impedindo a ação da desidrogenase alcoólica (CONN & STEMPF, 1966).

CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser mencionadas:

A presença de sulfito em mostos em concentrações de até 219 ppm em pH 4,0 não afetou significativamente a produção de etanol. O sulfito aumentou a produção de acetaldeído e reduziu os teores de alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico.

A elevação do pH de mosto sulfitado reduz o efeito tóxico sobre a produção de alcoóis superiores porém aumenta a formação de acetaldeído.

AGRADECIMENTOS

À FERMENTEC - Assessoria em Fermentação alcoólica pelos recursos fornecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. *Métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica e apalhos de destilação*. Piracicaba, FERMENTEC, 1986. 71p.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. *Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.

- ANACLETO, J. & UDEN, N. van. Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 34: 2477-86, 1982.
- BEECH, F.W. & DAVENPORT, R.R. The role of yeasts in cider-making. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. *The yeasts*. New York, Academic Press, 1970. v.3, p.73-145.
- BRAU, H.M. *Review on the origin and composition of fusel oil*. Rio Piedras, University of Puerto Rico, 1957. 30p. (Technical paper, 17).
- CONN, E.E. & STUMPF, P.K. *Outlines of biochemistry*. New York, John Wiley, 1966.
- FAHRASMANE, L.; JOURET, C.; PARFAIT, A.; GALZY, P. Production of higher alcohols and short-chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations. *Journal of Food Science*, Champaign, 50: 1427-30, 1985.
- GLACET, A.; LETOURNEAU, F.; LEVEQUE, P.; VILLA, P. Kinetic study of sulfite ion inhibition during alcoholic fermentation of beet molasses. *BioScience*, Washington, 4(1): 16-9, 1985. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 103: 36142g, 1985.
- INGRAHAM, J.L. & GUYMON, J.F. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 88: 157-66, 1960.
- MAIER, K.; HINGE, H.; LEUSCHEL, L. Mechanism of sulfite action on the energy metabolism *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, 848: 120-30, 1986.
- NORDSTROM, K. & CARLSSON, B.O. Yeast growth and formation of fusel alcohols. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 71: 171-4, 1965.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*

11.ed. São Paulo, Nobel, 1985. 466 p.

- REYNAUD, V.; LHUGUENOT, J.C.; PARFAIT, A.; BELIN, J.M. Improvement of the nitrogen fraction for improved rum fermentation. *Cah. Ens. Bana*, 4: 63-75, 1983. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 101: 168995f, 1984.
- SUOMALAINEN, H. & KERANEN, A.J.A. Valine, leucine and isoleucine as precursors of branched fatty acids in yeast. *Suomen Kemistilehti B*, Helsinki, 40: 288-9, 1967.
- SUOMALAINEN, H. & CURA, E. Yeast carboxylase and cell permeability. *Acta Chemica Scandinavica*, Copenhagen, 11: 1090, 1957.
- UZUKA, Y.; NOMURA, T.; TANALA, K.; KOMATSU, T.; SHIMADA, M. Effect of sulfur dioxide on the growth of wine east and the accumulation of metabolic intermediates in weakly acid pH medium. *American Journal of Enology and Viticulture*. Davis, 19: 13-8, 1985. Apud *Chemical Abstracts*, 102: 216457b, 1985.
- WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 82:84-92, 1976.
- YOSHIZAWA, K.; FURUKAWA, T.; TADENUMA, M.; YAMADA, M. The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acids by yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*. Tokyo, 25: 326-32, 1961

Recebido para publicação em: 15.07.88

Aprovado para publicação em: 07.11.88