

# **EFEITO COMBINADO DE CONDIÇÕES ALTERADAS DURANTE A FERMENTAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE INVERTASE DE LEVEDURA ENOLÓGICA COMERCIAL**

R. F. D'AVILA<sup>1</sup>, E. FICAGNA<sup>2</sup>, S. D. S. da SILVA<sup>3</sup>, M. H. BRUSCATTO<sup>1</sup>, C. T. SOUSA<sup>4</sup> e R. P. TORALLES<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

<sup>2</sup> Instituto Federal Rio Grande do Sul, Departamento de Viticultura e Enologia

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Nutrição

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

<sup>5</sup> Instituto Federal Sul-Riogrândense, Departamento de Química

E-mail para contato: roseane.davila@gmail.com

**RESUMO** – O processo de correção de açúcares em mosto visa elevar o teor alcoólico dos vinhos produzidos. A sacarose comumente adicionada precisa ser hidrolisada pela enzima invertase secretada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação. Porém, durante o processo, o meio sofre alterações pelo aumento da concentração de álcool, temperatura e acidez, além da presença de sulfitos adicionados. Este trabalho teve por objetivo caracterizar o quanto a atividade da enzima invertase é alterada por modificações nestas variáveis. Como resultados observou-se que a diminuição do pH foi o principal fator que fez decair a atividade enzimática, mesmo às condições de concentração de etanol e temperatura ideais. Quando comparadas estas duas variáveis, observa-se que não há perdas consideráveis da atividade na temperatura ótima da invertase e que a menor atividade observada em temperaturas menores somente ocorre quando o meio possui concentração de etanol mais elevada. A adição de sulfito não se mostrou significativa.

## **1. INTRODUÇÃO**

O vinho é a bebida resultante exclusivamente da fermentação completa ou parcial da uva fresca. Sua composição é complexa, possuindo açúcares, álcoois variados (dentre os quais o álcool etílico é o principal, com até 20% dependendo do tipo de vinho desejado), água, diferentes ácidos livres ou combinados (responsáveis pela acidez fixa e volátil). As condições climáticas da safra vitícola exercem influência preponderante nas características da uva e, conseqüentemente, na composição do vinho. Assim, existe uma influência do clima nas concentrações de açúcar e de ácidos orgânicos, no teor de compostos voláteis e de compostos fenólicos da uva, variáveis que determinam a estrutura e a cor dos vinhos, importantes fatores para sua qualidade (Rizzon e Miele, 2006).

Em safras onde a maturação das uvas não alcança nível satisfatório, especialmente devido as condições climáticas, é comumente realizado o processo de chaptalização, prática enológica que consiste em corrigir o teor de açúcar no mosto para aumentar a graduação alcoólica do vinho em no

máximo 3% (v/v) estabelecida pela legislação brasileira (Brasil, 2004). O teor alcoólico dos vinhos produzido durante o processo fermentativo está diretamente vinculado ao teor de açúcares fermentescíveis existentes na uva a ser vinificada.

A fermentação alcoólica é a transformação anaeróbica de açúcares, sobretudo glucose e frutose, em etanol e dióxido de carbono. No entanto, este é um processo muito mais complexo. Ao mesmo tempo em que esta reação se processa, uma série de outros processos bioquímicos, químicos e físico-químicas ocorrem, tornando possível a transformação do mosto de uva em vinho. Além de etanol, vários outros compostos são produzidos durante toda a fermentação alcoólica, tais como álcoois superiores, ésteres de glicerol, ácido succínico, diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol. Ao mesmo tempo, alguns outros compostos do mosto também são convertidos pelo metabolismo das leveduras. Sem a produção dessas outras substâncias, o vinho teria pouco interesse organoléptico (Zamora, 2009). Embora o processo possa ser realizado pelas leveduras nativas (autóctones) presentes na uva, para garantia e uniformidade na fermentação alcoólica utiliza-se levedura selecionada, disponível na forma de levedura seca ativa (Rizzon e Dall'Agnol, 2007).

A levedura mais utilizada na vinificação é a *Saccharomyces cerevisiae*, uma das principais produtoras da enzima invertase ( $\beta$ -D-frutofuranosidase frutohidrolase E.C.3.2.1.26), identificada de duas diferentes formas: a glicosilada que está localizada no espaço periplasma e encontra-se associada à parede celular da levedura e, outra que não é glicosilada e está concentrada no citoplasma (Zarate e Belda, 1996). A atividade invertase da levedura está relacionada com a invertase do periplasma que hidrolisa a sacarose produzindo uma mistura equimolar de glucose e frutose. Esta enzima tem sido empregada para melhorar a utilização de certos substratos tais como nos processos de fermentação alcoólica (Takeshige e Ouchi, 1995).

As enzimas trabalham de forma máxima em valores específicos de pH, temperaturas e concentrações de substrato. Assim como toda a enzima, a invertase está sujeita à inibição pela alteração dos componentes do meio. Apresentam pH ótimo de 4,0 a 5,5, sendo inativadas em meios com pH superior a 6,0 e inferior a 3,0. As invertases apresentam temperaturas ótimas de 55°C para soluções diluídas de sacarose e de 65°C a 70°C para soluções com concentração superior a 10% (Koblitz, 2010). A concentração de álcool durante a fermentação também exerce papel fundamental na atividade enzimática. Sendo assim, quanto maior a concentração do produto, menor será a atividade enzimática, uma vez que a diminuição da concentração do substrato passa a ser significativa, a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores, até que todo o substrato seja transformado em produto (Marzzoco e Torres, 2007).

A substância mais útil para proteger o vinho contra oxidações é o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) apresentando características antissépticas, antioxidantes e inibidoras de enzimas oxidativas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). A forma mais comum de utilização deste composto são os sais, principalmente metabissulfito de potássio, que apresenta como características a ação solubilizante, ação antioxidásica e ação coagulante (Giovannini e Manfroi, 2009). A quantidade de metabissulfito de potássio a ser adicionada ao mosto, logo após o esmagamento da uva, depende de sua qualidade, mas de 8 a 12g/hL de mosto são suficientes para garantir um efeito anti-séptico contra as bactérias acéticas, lácticas e leveduras indesejáveis. Entretanto, doses muito altas, retardam a fermentação alcoólica, causam odor

desagradável e podem afetar a saúde do consumidor (Rizzon & Dall'Agnol, 2007).

Com base no exposto, o objetivo desta pesquisa foi determinar a influência das variáveis pH, temperatura e concentração de álcool e de SO<sub>2</sub> sobre a atividade da enzima invertase oriunda de uma levedura enológica comercial *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. A enzima foi extraída de uma levedura enológica comercial *Saccharomyces cerevisiae* através de agitação em meio alcalino (pH 9,0) por 24h e posterior centrifugação (5.000rpm) por 5 minutos. As proteínas foram quantificadas segundo a metodologia de Biureto, utilizando o soro albumina bovina (BSA) como padrão.

A atividade da invertase foi determinada através da quantificação da glicose produzida pela ação da invertase com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico. Para determinar o efeito combinado dos fatores pH, temperatura, presença de dióxido de enxofre e concentração de etanol, de modo a simular características do mosto durante o processo de vinificação, foi utilizado delineamento com planejamento composto central para 4 fatores, conforme as codificações da matriz mostradas na Tabela 1, onde X1, X2, X3 e X4 correspondem às variáveis pH, etanol, concentração de SO<sub>2</sub> e temperatura. O ponto central (ensaio 25) foi replicado seis vezes e os demais pontos foram replicados duas vezes. O meio reacional consistiu de 1 mL do extrato enzimático, 1 mL de solução de sacarose 0,2 M, e 1 mL de soluções com diferentes concentrações de pH, etanol e metabissulfito de sódio, conforme a matriz experimental exposta na Tabela 2, totalizando 5 mL. As reações ocorreram durante 10 minutos, tempo em que as amostras permaneceram nas temperaturas indicadas na matriz experimental. Após, os açúcares redutores formados reagiram com 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico durante 5 minutos, as amostras foram diluídas e sua absorbância foi lida a 490 nm (Miller, 1959). A glicose foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzimas que libera 1 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições de ensaio.

Tabela 1 - Codificação das variáveis reacionais e planejamento do experimento

Código de Nível	pH X1	[EtOH] (% v/v) X2	[SO <sub>2</sub> ] (ppm) X3	Temperatura (°C) X4
-2	2,5	8,0	0	10,0
-1	3,0	10,0	75	20,0
0	3,5	12,0	150	30,0
1	4,0	14,0	225	40,0
2	4,5	16,0	300	50,0

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental com as variáveis codificadas, naturais, resposta (Ya) e número de repetições dos ensaios (Nb)

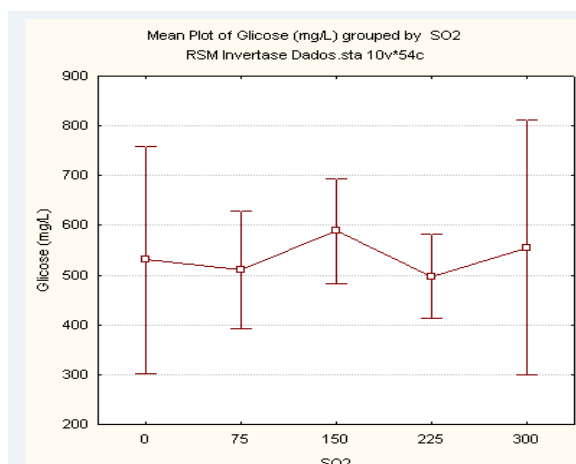
Ensaio	Variáveis codificadas				Variáveis naturais				Ya	Nb
	X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X4		
1	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	3,0	10,0	75,0	20,0	382,9	2
2	-1,00	-1,00	-1,00	1,00	3,0	10,0	75,0	40,0	537,7	2
3	-1,00	-1,00	1,00	-1,00	3,0	10,0	225,0	20,0	391,9	2
4	-1,00	-1,00	1,00	1,00	3,0	10,0	225,0	40,0	501,8	2
5	-1,00	1,00	-1,00	-1,00	3,0	14,0	75,0	20,0	122,6	2
6	-1,00	1,00	-1,00	1,00	3,0	14,0	75,0	40,0	311,1	2
7	-1,00	1,00	1,00	-1,00	3,0	14,0	225,0	20,0	255,0	2
8	-1,00	1,00	1,00	1,00	3,0	14,0	225,0	40,0	349,2	2
9	1,00	-1,00	-1,00	-1,00	4,0	10,0	75,0	20,0	771,0	2
10	1,00	-1,00	-1,00	1,00	4,0	10,0	75,0	40,0	730,7	2
11	1,00	-1,00	1,00	-1,00	4,0	10,0	225,0	20,0	712,7	2
12	1,00	-1,00	1,00	1,00	4,0	10,0	225,0	40,0	537,7	2
13	1,00	1,00	-1,00	-1,00	4,0	14,0	75,0	20,0	562,4	2
14	1,00	1,00	-1,00	1,00	4,0	14,0	75,0	40,0	665,6	2
15	1,00	1,00	1,00	-1,00	4,0	14,0	225,0	20,0	564,6	2
16	1,00	1,00	1,00	1,00	4,0	14,0	225,0	40,0	670,1	2
17	-2,00	0,00	0,00	0,00	2,5	12,0	150,0	30,0	416,5	2
18	2,00	0,00	0,00	0,00	4,5	12,0	150,0	30,0	1098,6	2
19	0,00	-2,00	0,00	0,00	3,5	8,0	150,0	30,0	614,0	2
20	0,00	2,00	0,00	0,00	3,5	16,0	150,0	30,0	472,6	2
21	0,00	0,00	-2,00	0,00	3,5	12,0	0,0	30,0	531,0	2
22	0,00	0,00	2,00	0,00	3,5	12,0	300,0	30,0	555,6	2
23	0,00	0,00	0,00	-2,00	3,5	12,0	150,0	10,0	331,3	2
24	0,00	0,00	0,00	2,00	3,5	12,0	150,0	50,0	629,7	2
25	0,00	0,00	0,00	0,00	3,5	12,0	150,0	30,0	578,1	6

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

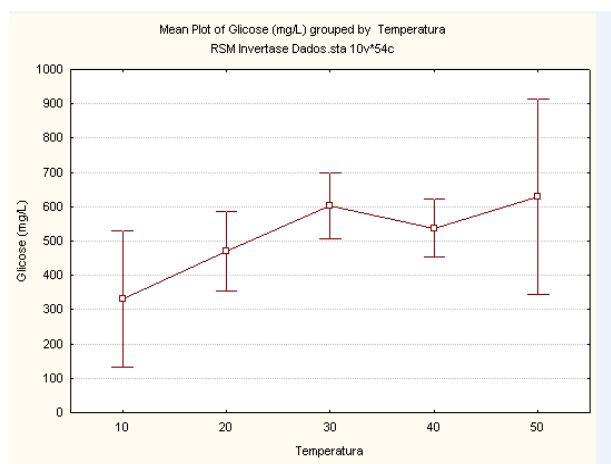
Na tabela 2, além do delineamento do experimento, têm-se os resultados para a medida da atividade de invertase (Ya), onde o ponto 18 foi aquele que apresentou maior atividade, de 1098,6  $\mu\text{mol}$  de glicose/minuto. Em relação ao ponto central, este se diferenciou pelo pH do meio, o que demonstra que entre os parâmetros testados, este apresenta diferenças significativas de atividade enzimática entre os pontos (Figura 1d), onde o pH ótimo foi de 4,5 e abaixo deste ponto a atividade diminuiu. As concentrações de dióxido de enxofre testadas não alteraram a atividade de invertase, conforme pode ser visto na Figura 1a. Uma vez que o máximo de  $\text{SO}_2$  total em qualquer tipo de vinho, segundo a legislação brasileira, é de 35 mg/100 mL (Brasil, 2004), a concentração de 300 ppm,

próxima ao limite permitido, não interfere no processo de utilização dos açúcares do mosto pelas enzimas. Segundo Giovannini e Manfroí (2009) as doses de  $\text{SO}_2$  empregadas comumente durante a vinificação situam-se entre 30 e 150 ppm, sendo que entre os principais fatores envolvidos nesta tomada de decisão estão o grau de maturação da uva (relacionada a sua riqueza em açúcar e acidez) e o estado sanitário das mesmas, bem como a temperatura do mosto no momento da adição.

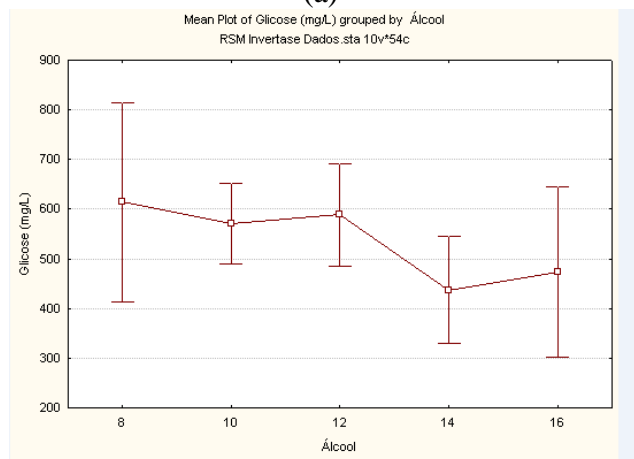
A faixa de temperatura ótima para a enzima situou-se entre 30 e 50°C, sendo que em uma concentração de etanol abaixo de 12% (v/v) não se notou diferença significativa para a atividade enzimática (Figuras 1b e 1c).



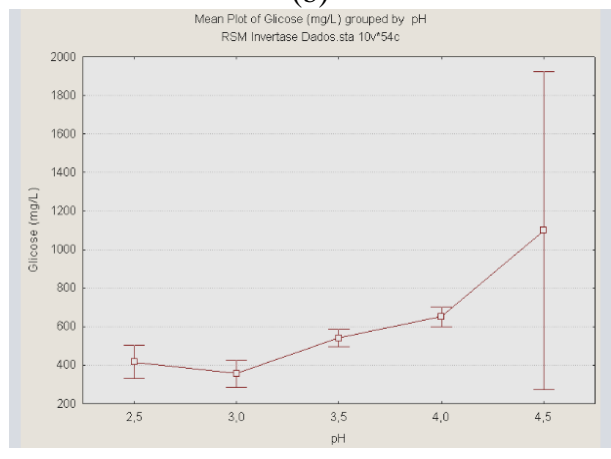
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1 - Gráfico de médias, máximos e mínimos do tipo Box e Whiskers para a atividade de invertase de levedura enológica comercial para efeito individual da concentração de metabissulfito ( $\text{SO}_2$ ) (a), da temperatura (b), da concentração de álcool (c) e do pH do meio (d).

Na análise de superfície de resposta observou-se que em uma faixa de pH abaixo de 4 há a diminuição da atividade enzimática, principalmente em concentrações superiores a 12% (v/v) de

álcool no meio (Figura 2a). Temperaturas de aproximadamente 35°C mostraram-se ótimas para a atuação enzimática. A presença de alta concentração de ácidos, e, por conseguinte pH baixo (menor do que 3,4), revelou-se o fator que promoveu maior redução na atividade em temperaturas abaixo de 20°C, conforme Figura 2b. Em faixas de pH próximas a 4, os ensaios mostraram maior estabilidade da atividade enzimática frente a redução das temperaturas.

Quando comparados os efeitos da concentração de etanol e temperatura, observa-se que quanto maior a concentração de etanol no meio, menor a atividade enzimática e o efeito é pronunciado a temperaturas baixas; as temperaturas elevadas favorecem a atividade enzimática mesmo quando a concentração de etanol atinge níveis elevados (16% v/v) (Figura 2c).

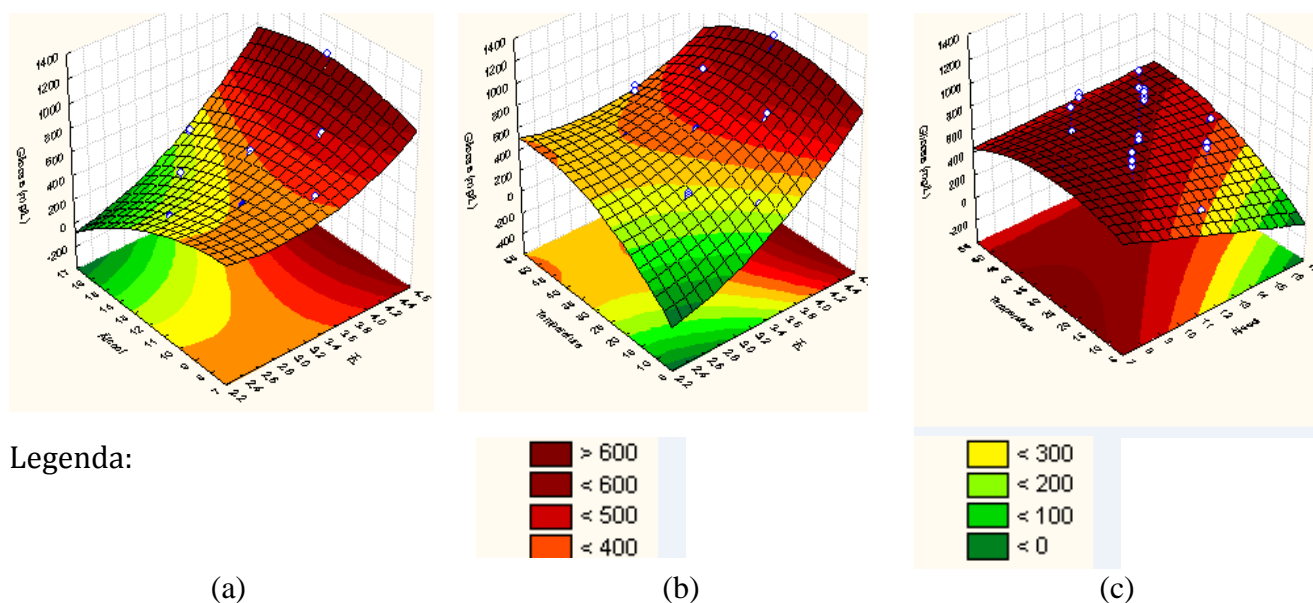


Figura 2 - Efeito interativo dos parâmetros pH (X1) e concentração de álcool (X2) (a), pH (X1) e temperatura (X4) (b) e concentração de álcool (X2) e temperatura (X4) (c) sobre a atividade de invertase obtida de levedura enológica comercial utilizando sacarose 0,2 M como substrato.

Segundo Porntaveewat *et al.* (1990), as condições de atuação enzimática para invertase purificada de uvas Muscat Bailey A são de pH de 2,7-6,4, apresentando atividade ótima a 3,5 e demonstrando termo estabilidade. Neste trabalho, demonstrou-se que as condições de pH próximas de 4,5 foram consideradas mais ideais, porém o pH de mostos de diferentes cultivares como Merlot, Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon tende a condições ácidas logo após o esmagamento da uva, de aproximadamente 3 a 3,3, chegando a 3,2 – 4 após a fermentação maloláctica e estabilização tartárica; além disso, mostos com pH menos ácido possuem maior susceptibilidade à reações oxidativas e biológicas (Rizzon *et al.*, 1998).

Nakanishi e Yokotsuka (1990) comentam que invertases obtidas de uvas viníferas apresentam



alta estabilidade térmica, com temperatura ótima em torno de 75°C, além de atuarem em diferentes faixas de pH, altas concentrações de álcool e de SO<sub>2</sub>. Morata *et al.* (2006), em experimentos utilizando diferentes condições de fermentação de vinhos tintos para *Sacharomyces cerevisiae* e *Sacharomyces uvarum*, empregaram temperatura de 20 e 30°C, concentração de SO<sub>2</sub> de 0, 15 ou 30 mg/l e valores de pH de 3,2, 3,7 ou 4,2. As condições utilizadas nas fermentações abrangem as condições aqui testadas. Na faixa de 20-30°C, a condição ideal para atividade da enzima invertase seria um pH menos ácido (Fig. 3), próximo à condição de 4,2 testada pelos autores. A 20°C se tem uma redução de aproximadamente 50% da atividade próximo a concentração de etanol de 13%, enquanto que a 30°C há uma maior resistência ao aumento da concentração alcoólica (Fig. 4). Com relação à concentração de SO<sub>2</sub>, foram testadas aqui condições com quantidades mais elevadas, não ocorrendo diferença significativa nesta variável.

Concentrações de álcool (% v/v) em vinhos provenientes de uvas Cabernet Sauvignon de diferentes safras apresentaram valores de 9,7 até 12,6 (Rizzon e Miele, 2002) e de vinho de uvas Isabel, de 8 a 9,5 (Rizzon e Miele, 2006). Tal valor dependeu do potencial alcóolico do mosto, uma vez que não foram adicionadas outras fontes de açúcares. Como com a chaptalização o potencial alcóolico alcançado é superior, se justifica o estudo de concentrações maiores sobre a atividade da enzima. Com relação a esta variável, quando a enzima é parcialmente inibida pela concentração alcoólica, já foram alcançados valores elevados do componente.

## 4. CONCLUSÃO

As condições utilizadas durante a fermentação propiciam a atuação da enzima invertase sobre os açúcares adicionados ao mosto, sendo que a concentração de SO<sub>2</sub> foi o único fator avaliado que não afetou em nenhum nível o parâmetro testado. O pH ótimo da enzima é mais alto do que o encontrado normalmente em mostos e, juntamente com o aumento da concentração alcoólica que ocorre durante a fermentação, é fator que reduz a atividade enzimática. A temperatura ótima encontrada foi de 35°C, não sendo este um fator limitante para a invertase durante a fermentação, especialmente em vinhos tintos.

## 5. REFERÊNCIAS

- BARLIKOVA, A.; SVORE, J. E MIERTUS, S. Hybrid biosensor for determinations of sucrose. *Analytica Chimica Acta*, v. 247, p. 83-87, 1991.
- BRASIL. *Lei n. 10970 de 16 de novembro de 2004*. Altera dispositivos da Lei n. 7678 de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados de uva e do vinho, e dá outras providências. DOU: Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2004.
- GIOVANNINI, E.; MANFROI, V. *Viticultura e enologia: elaboração de grandes vinhos nos terroirs brasileiros*. Bento Gonçalves: IFRS, 2009. 344p.

KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2010, 242p.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. *Bioquímica básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007, 386p.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORATA, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, M. C.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ, J. A. Effects of pH, temperature and SO<sub>2</sub> on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, p. 123-129, 2006.

NAKANISHI, K.; YOKOTSUKA, K.; Characterization of Thermostable Invertase from Wine Grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 69, n. 1, p. 16-22, 1990.

PORNTAVEEWAT, W.; TAKAYANAGI, T.; YOKOTSUKA, K. Purification and Properties of Invertase from Muscat Bailey A. Grapes. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 78, n. 4, p. 288-292, 1994.

RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D.; DONÈCHE, B.; LONVAUD, A. *Handbook of Enology*, The microbiology of wine and vinifications. Vol. 1. John Wiley & Sons, 2006.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Avaliação da cv. Cabernet Sauvignon para elaboração de vinho tinto. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 2, p. 192-198, 2002.

RIZZON, L. A.; MIELE, A. Efeito da safra vitícola na composição da uva, do mosto e do vinho Isabel da Serra Gaúcha, Brasil. *Ciência Rural*, v. 36, n. 3, p. 959-964, 2006.

RIZZON, L.A.; DALL'AGNOL, I. *Vinho tinto*. Sistemas de Produção - Agroindústria Familiar – Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 45p. 2007.

RIZZON, L.A.; ZANUZ, M. C.; MIELE, A. Evolução da acidez durante a vinificação de uvas tintas de três regiões vitícolas do Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 2, p. 179-183, 1998.

TAKESHIGE, K.; OUCHI, K. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *J. Fermentation Bioengineering*, v. 79, p. 513-515. 1995.

ZAMORA, Fernando. *Biochemistry of alcoholic fermentation*. In: Wine Chemistry and Biochemistry. Springer New York, p. 3-26. 2009.

ZÁRATE, V.; BELDA, F. Characterization of the heterologous invertase produced by *Schizosaccharomyces pombe* from the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 80, n. 1, p. 45-52, 1996.