

EFEITO DOS ÁCIDOS FÓRMICO E PROPIÔNICO SOBRE A
PRODUÇÃO DE ALCOÓIS SUPERIORES DURANTE A
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

L.E. Gutierrez*

RESUMO: Foi estudado o efeito de concentrações de 250, 500 e 1000 ppm dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de etanol e alcoóis superiores produzidos pela fermentação alcoólica de mosto sintético. Não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos tanto para o ácido fórmico como para o ácido propiônico, embora uma redução não significativa no teor do álcool isoamílico foi observada com a dose de 1000 ppm dos ácidos fórmico e propiônico.

Termos para indexação: ácido fórmico, ácido propiônico, alcoóis superiores, fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*.

THE EFFECT OF FORMIC AND PROPIONIC ACIDS ON HIGHER
ALCOHOLS PRODUCTION DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: The effect of different concentrations of formic and propionic acids on the ethanol and higher alcohols production was studied with synthetic medium. There were no significant differences among ethanol, n-propilic, isobutyllic and isoamilic alcohols in all treatments. However a reduction of isoamilic alcohol

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

content was observed at higher levels of formic and propionic acids.

Index terms: formic acid, propionic acid, higher alcohols, alcoholic fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

A utilização do melaço em maior proporção para a produção de álcool etílico pode afetar a fermentação alcoólica devido a alguns componentes presentes nesta matéria prima. Assim o ácido fórmico pode ser encontrado no melaço em consequência da degradação térmica de açúcares durante o processamento do caldo de cana (HODGE & HILDEBRANDT, 1954; FAGERSON, 1969). Segundo DIERSSEN *et alii* (1956) o ácido fórmico pode ser encontrado em concentrações de até 4000 ppm e o ácido propiônico em até 3000 ppm no melaço. Os mesmos autores salientaram que dos ácidos orgânicos, o mais prejudicial foi o ácido butírico em concentrações acima de 1500 ppm, entretanto não fizeram referências aos efeitos dos ácidos fórmico e propiônico sobre a fermentação alcoólica. KIELEY & O'DRISCEOIL (1971) em diversas amostras de melaço de beterraba não detectaram ácido fórmico e encontraram ácido propiônico em concentrações inferiores a 200 ppm. HEALEY & CARNEVALE (1984) citaram a presença em melaço de cana de ácido fórmico em níveis de 1000 a 4100 ppm e ácido propiônico em concentrações inferiores a 100 ppm.

Trabalhando com extratos livres de células de leve duras, SAMSON *et alii* (1955) verificaram que o ácido propiônico inibiu a produção de gás carbônico anaerobicamente a partir de glucose, concluindo que a inibição da fermentação em células intactas não foi consequên-

cia da ação deste ácido sobre as membranas.

LANGPAULOVA (1986) verificou que concentrações de 800 mg/l de ácido fórmico afetou a produção de etanol de um strain de levedura (LK 01) enquanto o strain 03/26 foi mais sensível. O diferente comportamento das leveduras em relação a ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica também foi relatado por SHVETZ *et alii* (1976).

HOFFSTER & KELLNER (1971) verificaram que o ácido propiônico inibiu a formação fermentativa do etanol pelas leveduras enquanto que KAMEL & AWAMRY (1979) relataram que dose de 1500 miligramas de propionato por litro inibiu o crescimento de leveduras levando ao acúmulo de cetoácidos. E também MOON (1983) verificou um efeito prejudicial do ácido propiônico sobre o crescimento de *Saccharomyces uvarum*.

Segundo BRAU (1957) a formação de alcoóis superiores depende de inúmeros fatores entre eles, a natureza do mosto a ser fermentado, a levedura utilizada e a presença de nitrogênio na forma amoniacal.

SUOMALAINEN & KAHANPAA (1963) verificaram que a adição de L-valina, L-leucina e L-isoleucina aumentaram a formação de alcoóis isobutílico, isoamílico e amílico opticamente ativo, respectivamente, enquanto OSHIZAWA *et alii* (1961) relataram que o álcool n-propílico foi produzido a partir de treonina ou alfa-amino-butílico.

INGRAHAM & GUYMON (1960) relataram que a fermentação alcoólica realizada por *Saccharomyces cerevisiae* é sempre acompanhada pela presença de alcoóis superiores e que o álcool isoamílico é encontrado em maior proporção seguido pelo isobutílico e n-propílico. Assim pode-se observar que o processo de síntese e degradação de aminoácidos está relacionado com a formação de alcoóis superiores pelas leveduras.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar o efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de alcoóis superiores durante a fermentação alcoólica.

MATERIAL E MÉTODOS

Mosto: para se evitar a interferência de outros componentes do melão sobre a fermentação alcoólica, os ensaios de fermentação foram conduzidos com mosto sintético com a seguinte composição: 125 g de sacarose, 0,669 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $MgSO_4$, 0,94 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 g de $CaCl_2$, 2,0 g de extrato de levedura, 6 g de ácido cítrico e os micronutrientes: 2 mg de $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$, 2 mg de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 2 mg de H_3BO_3 , 1 mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1 mg de $CoCl_2$ e 1 mg de KI. Após a adição de 250, 500 e 1000 miligramas por litro de ácidos fórmico e propiônico, o pH foi acertado a 4,0 com solução de NaOH, esterilizado a 120°C durante 15 minutos e o volume completado a 1000 ml com água esterilizada. O extrato de levedura foi adicionado com o objetivo de fornecer vitaminas necessárias ao processo fermentativo.

Fermentação: 90 ml do mosto sintético foram inoculados com 10 gramas de fermento de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) com 99,5 % de viabilidade celular. A fermentação foi conduzida a $30 \pm 1^\circ C$, sem agitação em frascos de 200 ml. Após o final da fermentação o vinho foi centrifugado e o sobrenadante analisado para etanol e alcoóis superiores. Os ensaios foram repetidos durante quatro dias e cada repetição consistiu da média de 2 frascos de fermentação.

Análises químicas: o vinho foi destilado em microdestilador Kjeldahl e o grau alcoólico obtido por densimetria utilizando-se densímetro digital Anton-Paar DMA-46 segundo AMORIM *et alii* (1982). Os alcoóis superiores foram analisados por cromatografia em fase gasosa (CG-17, com detetor de ionização de chama) nas se-

guintes condições: coluna metálica empacotada com Hallcomid M 18 a 15 % sobre cromosorb P (CG 1904), com 2 m de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno, gás de arraste nitrogênio com fluxo de 50 ml/min., temperatura de vaporizador, 150°C, temperatura do detector 220°C, temperatura da coluna a 110°C, o volume de amostra injetado foi de 2 microlitros, para a quantificação foram utilizados padrões puros de álcool n-propílico, isobutílico e isoamílico. A coluna não separa o álcool isoamílico do álcool amílico opticamente ativo, portanto os resultados apresentados expressam a soma dos dois alcoóis.

Análise estatística: foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições segundo PIMENTEL GOMES (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados do grau alcoólico dos vinhos obtidos com as adições dos ácidos fórmico e propiônico. Como pode ser observado, o grau alcoólico não foi afetado significativamente pelas quantidades de ácidos fórmico e propiônico utilizadas. O fato de não encontrarmos efeito prejudicial desses ácidos nas concentrações utilizadas pode ser explicado pela maior resistência da levedura utilizada no presente trabalho, pois LANGPAULOVA (1986) e SHVETZ *et alii* (1976) encontraram diferenças de sensibilidade entre strains de leveduras em relação aos ácidos fórmico e propiônico.

Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os teores de alcoóis superiores dos vinhos obtidos pelo tratamento do mosto com as adições dos ácidos fórmico e propiônico, respectivamente.

Os alcoóis superiores detectados no presente trabalho foram n-propílico, isobutílico e iso-amílico. Es-

ses alcoóis são os principais produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica em melão de cana (BRAU, 1957), maçã (BEECH & DAVENPORT, 1970), mosto sintético (YOHIZAWA *et alii*, 1961), cerveja (CHEN & GHELUWE, 1976) e mosto de uva (RIZZON, 1987).

Não foram observadas diferenças significativas nos teores de alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico nos vinhos obtidos. Assim nas quantidades utilizadas, os ácidos fórmico e propiônico não afetaram significativamente o grau alcoólico (Tabela 1) e alcoóis superiores (Tabelas 2 e 3).

A presença dos ácidos orgânicos no melão é muito variável, porque depende do grau de infecção da matéria prima e da intensidade do tratamento térmico. Análises preliminares conduzidas neste laboratório em diversas amostras de melão, indicaram quantidades dos ácidos fórmico, propiônico e butírico, quando presentes, inferiores a 1000 ppm. Fato também observado por KIELY & O'DRISCEOLI (1971) para melão de beterraba. Entretanto, HEALY & CARNEVALE (1984) citaram a presença de ácido fórmico em concentrações maiores do que 1000 ppm. Pelos dados do presente trabalho, essas concentrações não prejudicariam a fermentação alcoólica de mostos preparados por diluição desses melões.

Pode-se notar nas Tabelas 2 e 3 uma redução não significativas no teor de álcool isoamílico com o aumento das concentrações dos ácidos fórmico e propiônico. Provavelmente, esses ácidos em maiores concentrações, afetem o metabolismo do aminoácido leucina, precursor do álcool isoamílico (INGRAM & GUYTON, 1960) e dessa forma possa inibir o processo fermentativo conforme verificado por HOFFSTER & KELLNER (1971), KAMEL & AWAMRY (1979) e MOON (1983).

Tabela 1 - Grau alcoólico nos vinhos obtidos com a adição de diversas concentrações dos ácidos fórmico e propiônico. Expresso em % volume (média de 4 repetições).

Ácidos	Concentração em mg/litro			
	Testemunha	250	500	1000
Fórmico	7,40	7,38	7,38	7,36
Propiônico	7,32	7,36	7,38	7,35

Teste F não foi significativo ao nível de $p < 0,05$.

C.V. (fórmico): 2,50 %

C.V. (propiônico): 3,02 %

Tabela 2 - Alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico dos vinhos obtidos com diversas concentrações do ácido fórmico. Expressos em mg/litro. Médias de 4 repetições.

Ácido fórmico mg/litro	Alcoóis		
	n-pro- pílico	iso- butílico	iso- amílico
0	39,0	81,7	164,7
250	40,0	80,7	157,7
500	40,2	79,7	165,7
1000	37,5	75,5	152,5
C.V.	27,66 %	31,34 %	22,0 %

Teste F não foi significativo a $p < 0,50$.

Tabela 3 - Alcoóis n-propílico, isobutílico e isoamílico dos vinhos obtidos em diversas concentrações de ácido propiônico. Expresso em mg/litro. Média de 4 repetições.

Propiônico mg/litro	Alcoóis		
	n-propílico	isobutílico	isoamílico
0	36,2	74,7	151,0
250	37,7	79,7	147,7
500	36,5	76,5	140,2
1000	36,2	74,5	139,7
C.V.	52,19 %	25,12 %	14,10 %

Teste F não foi significativo a $p < 0,50$.

CONCLUSÕES

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

Não houve efeito significativo das doses de 250, 500 e 1000 ppm dos ácidos fórmico e propiônico sobre o grau alcoólico dos vinhos.

Não houve efeito significativo sobre os alcoóis superiores, embora uma redução não significativa tenha sido observada nos teores de álcool isoamílico.

AGRADEDIMENTOS

A FERMENTEC-Assessoria em Fermentação Alcoólica pelos recursos fornecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. *Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58 p.
- 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).
- CHEN, E.C.H. & GHELUWE, G. Amino nitrogen uptake and the formation of fusel alcohols. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 34: 19-24, 1976.
- DIERSSEN, G.A.; HOLTEGAARD, K.; JENSEN, B.; ROSEN, K. Volatile carboxylic acids in molasses and their inhibitory action on fermentation. *International Sugar Journal*, London, 58: 35-9, 1956.
- FAGERSON, I.S. Thermal degradation of carbohydrates - a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 17: 747-50, 1969.
- HEALEY, K.W. & CARNEVALE, J. Determination of volatile fatty acids in molasses by gas-liquid chromatography of their benzyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 32: 1363-6, 1984.
- HODGE, H.M. & HILDEBRANDT, F.M. Alcoholic fermentation of molasses. In: UNDERKOFER, L.A. & KICKEY, R.J., ed. *Industrial fermentations*. New York, Chemical Publishing, 1954, v.1, cap.3.
- HOFFSTER, R. & KELLNER, M. Treatment of chemically preserved wet corn in distillery operation. *Brann-tweinwirtschaft*, Berlin, 111: 1-4, 1971. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 74: 139498g, 1971.
- INGRAHAM, J.L. & GUYMON, J.F. The formation of higher

- aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 88: 157-66, 1960.
- KAMEL, M.Y. & AWAMRY, Z.A. Influence of fatty acids on some microorganisms. *Zeitschrift fuer Allgemeine Mikrobiologie, Morphologie und Okologie der Mikroorganismen*, Berlin, 19: 57-60, 1979. Apud *Chemical Abstracts*, 90: 117730n, 1979.
- KIELY, M. & O'DRISCEOIL, P. Lactic and volatile acids in beet sugar manufacture. *International Sugar Journal*, London, 73: 135-9, 1971.
- LANGPAULOVA, J. Effects of volatile organic acid in molasses on alcoholic fermentation and yeast biomass production. *Kvasny Prumysl*, Prague, 32(5): 103-6, 1986. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus, 105: 15120c, 1986.
- MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid-tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 55: 453-60, 1983.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental* 11.ed. São Paulo, Nobel, 1985. 466p.
- RIZZON, L.A. Composição química dos vinhos da microregião homogênea vinicultora de Caxias do sul - compostos voláteis. *Comunicado Técnico. Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho*, Bento Gonçalves, (5): 1-4, 1987.
- SAMSON, F.E.; KATZ, A.M.; HARRIS, D.L. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeasts metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, New York, 54: 406-23, 1955.
- SHVETZ, V.N.; OGORODNIKOVA, A.N.; SLYUSARENKO, T.P.; KRAVETZ, V.I. Effects of volatile organic acids in molasses on alcohol fermentation, quality and yield of alcohol and baker's yeasts. *Ferment. Spirt.Prom.*, 1: 40-3, 1976. Apud *Chemical Abstracts*, Columbus,

84: 119911x, 1976.

SUOMALAINEN, H. & KAHANPAA, H. Formation of fusel alcohols from amino acids with branched chains. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 69: 473-8, 1963.

YOSHIZAWA, K.; FUKURAWA, T.; TADENUMA, M.; YAMADA, M. The formation of higher alcohols in the fermentation of aminoacids by yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, 20: 326-32, 1961.

Rebecido para publicação em: 15.07.88

Aprovado para publicação em: 07.11.88