

# Fermentação alcoólica de caldo de cana utilizando grãos de *kefir*<sup>1</sup>

## Alcoholic fermentation of sugar cane juice with kefir granules

Anita Saraiva Dornelles<sup>2</sup> e Sueli Rodrigues<sup>3</sup>

**Resumo** - A principal matéria-prima utilizada no Brasil para fermentação alcoólica é a cana-de-açúcar e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na maior parte das destilarias. Entretanto, outros microrganismos são também capazes de produzir etanol utilizando matérias-primas açucaradas como substrato. Neste trabalho, é apresentado um estudo de viabilidade para produção de etanol através da fermentação alcoólica com grânulos de *kefir* utilizando caldo-de-cana como substrato. Os grãos de *kefir* são constituídos de uma microflora variada, tendo como principais constituintes bactérias do gênero lactobacilos e leveduras (*Saccharomyces*, *Kluyermyces*, *Candida* e *Pichia*). Estes grânulos são tradicionalmente utilizados para produção de leites fermentados de baixo teor alcoólico. A produção de bebidas alcoólicas através destes grânulos nunca foi estudada. Através de um planejamento fatorial, foi possível verificar a influência do teor de açúcar e massa de inóculo no rendimento em etanol para fermentações conduzidas com os grânulos de *kefir* e com o fermento de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*). Embora o fermentado obtido com o *kefir* tenha resultado em maiores teores de açúcar residual e menores teores de etanol e quando comparado com a fermentação com a levedura, o produto apresentou aroma diferenciado e agradável, sendo de potencial aplicação para produção de álcool potável (cachaça e aguardente de cana).

**Termos para indexação:** planejamento fatorial, produção de etanol e *kefir*.

**Abstract** - Sugar cane is the main raw material used in Brazil in alcoholic fermentation and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main microorganism used in industrial distillers. However, other microorganisms are also able to produce ethanol using substrates containing sugars. In this work, kefir granules were employed to produce ethanol using sugar cane molasses as substrate. These granules are composed by several microorganisms that include bacteria (lactobacilli) and yeasts (*Saccharomyces*, *Kluyermyces*, *Candida* and *Pichia*). Kefir granules are traditionally used to produce fermented milk with low alcohol content. The production of alcoholic beverages using kefir granules was never studied before. Using a factorial design we can observe the influence of the sugar concentration and the initial biomass in the ethanol yield for the fermentation using kefir granules and baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). In spite of the obtained product with kefir presented higher levels of residual sugars and lower ethanol levels, the obtained fermented broth using kefir presented a pleasure and unique odor than the one obtained using baker's yeast. The Process with kefir showed good potential to produce potable alcohol (sugar cane spirits).

**Index terms:** factorial planning, ethanol production and kefir.

---

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 06/04/2005; aprovado em 06/02/2006.

<sup>2</sup> Química, estudante de mestrado do Dep. Tecnologia de Alimentos da UFC, e-mail: anitasaraivadornelles@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Eng. Química, Profa. Dra. Dep. Tecnologia de Alimentos, Av Mister Hull,1977, Bloco 858, Campus do Pici, CEP 60356-000, Fortaleza-CE, Fone: (85) 4008-9646, Fax: (85)4008-9751, e-mail: sueli@ufc.br

## Introdução

A cana-de-açúcar é uma matéria prima abundante e de baixo custo no mercado brasileiro o que possibilita a produção de etanol em larga escala para diversos usos que variam desde o uso combustível até o consumo humano através da produção de cachaça. O Ceará ocupa um lugar privilegiado dentre os grandes produtores de cachaça do Brasil (4º lugar dentre os produtores nacionais).

De acordo com Athanasiades et al. (2002), os grãos de *kefir* são constituídos de uma microbiota variada, tendo como principais constituintes bactérias do gênero lactobacilos e leveduras (*Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Candida* e *Pichia*). Estes grânulos têm sido utilizados há milênios na produção de um fermentado a base de leite de diversos animais (vaca, búfala, égua, cabra, etc) em diversos países. A bebida fermentada a base de leite é freqüentemente associada à longevidade sendo considerada terapêutica. As atribuições da bebida têm despertado o interesse de outros mercados e encorajado a pesquisa na área, recentemente.

O atual processo de produção de cachaça e aguardente, utiliza leveduras (*Sacharomyces cerevisiae*) como agente fermentador e matérias primas açucaradas tais como: melaço e caldo-de-cana. O principal processo produtivo é realizado em batelada. Neste trabalho, o processo fermentativo foi conduzido utilizando-se grânulos de *kefir* em caldo-de-cana como substrato com a finalidade de avaliar o potencial da utilização do *kefir* na produção de etanol para posterior fabricação de cachaça e aguardente.

## Material e Métodos

### Microrganismos

O *kefir* utilizado neste trabalho é pertencente ao Laboratório de Biotecnologia (LABIOTEC/DETAL/UFC). Os grânulos são mantidos em solução aquosa de rapadura à temperatura ambiente sendo repicados uma vez por semana em meio de cultivo novo obtido através da diluição da rapadura em água. Já a *Saccharomyces cerevisiae* utilizada neste trabalho foi obtida na forma seca (fermento seco de padaria) junto ao comércio local.

### Análise da matéria prima

Como substrato para a fermentação foi utilizado caldo-de-cana fresco adquirido no comercio local. O caldo foi caracterizado quanto ao teor de sólidos totais (°Brix) por refratometria, pH inicial e teor de açúcares determi-

nados pelo método do DNS, conforme Miller (1959), após inversão com HCl, conforme Pregnotatto & Pregnotatto (1985). Para determinação dos açúcares redutores foi utilizado um espectrofotômetro Micronal modelo B512. O pH foi determinado por potenciometria direta utilizando um pHmetro Marconi modelo PA 200, o teor de sólidos totais foi determinado por refratometria através de um refratômetro de campo Optech (0-32 %). Todas as análises foram feitas em triplicata.

### Fermentação

Os ensaios foram realizados através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com um ponto central, conforme Barros Neto et al. (2002), onde foram variados a massa inicial de inóculo e o teor inicial de sólidos totais do caldo-de-cana (concentração de sacarose). Os experimentos se constituíram de cinco ensaios de fermentação, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e mais cinco ensaios utilizando grânulos de *kefir*, sendo realizado um planejamento para a levedura e um para *kefir*. Ambos os planejamentos foram realizados em duplicata, tanto para o *kefir* como para a levedura a massa de inóculo inicial foi calculada em base seca (a massa úmida de *kefir* é aproximadamente 10 vezes maior que sua massa seca).

A Tabela 1 apresenta os níveis dos fatores considerados no planejamento, o teor de açúcar correspondente ao teor inicial de sólidos totais e o pH inicial do meio. Para obtenção dos valores apresentados na Tabela 1 o caldo bruto foi diluído sendo utilizado um volume final de 50 mL. A variação do pH se deve à diluição do caldo, uma vez que não foram realizadas correções no mosto.

A fermentação foi conduzida estaticamente à temperatura ambiente (30 °C) em *Erlenmeyers* de 250 mL protegidos com tampões de algodão por 7 dias. Após este período foram analisados o teor de etanol, de açúcares residuais, de sólidos totais e o pH final do meio. Os resultados obtidos foram avaliados através de gráficos de superfície de resposta com suporte do software Statistica 5.0 v (Statsoft).

**Tabela 1** - Condições iniciais da fermentação (*kefir* e *S. cerevisiae*).

Ensaio	Biomassa em b. seca (g/50 mL)	°Brix	Açúcares iniciais (g/L)	PH
1	2,50	19,0	121,44	4,96
2	2,50	9,8	79,20	5,11
3	1,25	19,0	121,44	4,96
4	1,25	9,8	79,20	5,11
5	1,88	14,0	107,80	5,06

### Análise do caldo fermentado

Decorrido os 7 dias de fermentação as células foram removida por centrifugação a 11806 g por 10 minutos utilizando-se uma centrífuga Sigma 6-15, e o caldo fermentado foi analisado quanto ao açúcar residual, teor de sólidos totais, pH e teor alcoólico sendo este último analisado por ebulimetria conforme Atkins (1994). O rendimento do processo foi calculado em termos da razão entre o etanol produzido e o açúcar consumido conforme equação a seguir:

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{\text{Etanol produzido (g/L)}}{\text{Açúcar consumido (g/L)}} \times 100 \quad (1)$$

## Resultados e Discussão

Neste trabalho, a fermentação alcoólica foi avaliada através da determinação de suas variáveis majoritárias: açúcar residual (não consumido); teor de etanol produzido durante a fermentação e rendimento do processo. Na Tabela 2 são apresentados os resultados obtidos após 7 dias de fermentação com os grãos de *kefir*, enquanto que a Tabela 3 apresenta os resultados obtidos após 7 dias de fermentação com a *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 verifica-se, de forma geral, que o pH final obtido para as fermentações realizadas com o *kefir* é mais baixo que o obtido para os ensaios realizados com a levedura. Os valores mais baixos de pH se devem a uma maior

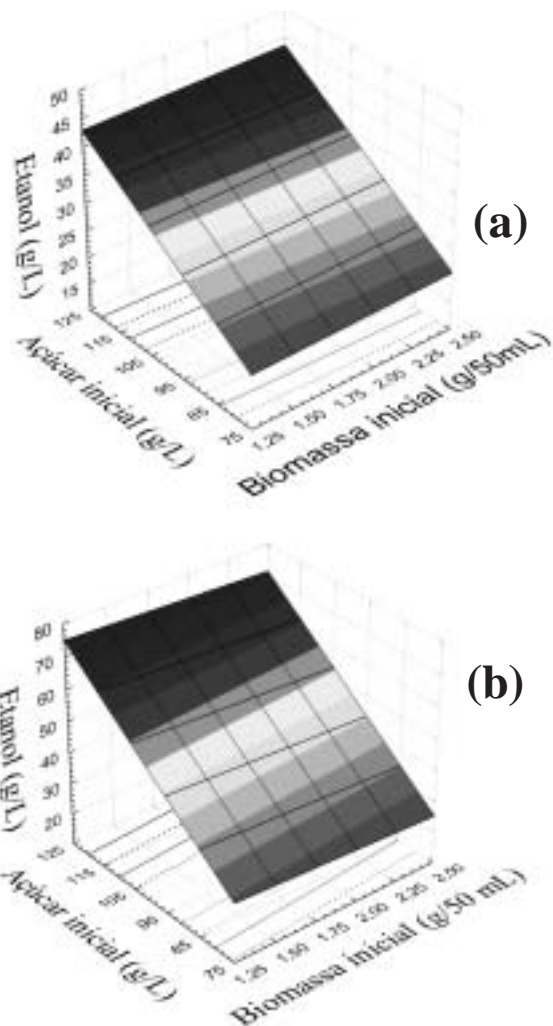
produção de ácidos orgânicos pelo *kefir*, que contém além de leveduras, bactérias lácticas. Observa-se também que a fermentação com o *kefir* apresentou níveis um pouco superiores de açúcar residual quando comparado com a fermentação com a levedura. A fermentação com levedura quando apresenta rendimentos máximos na faixa de 50% quando todo o açúcar é consumido, Aquarone et al. (2001). Dessa forma, pode-se dizer que os resultados apresentados na Tabela 3 para os ensaios 1; 3 e 5 são concordantes com os esperados para este processo. Entretanto os resultados obtidos nas condições dos ensaios 2 e 4 ficaram abaixo do esperado. Os resultados apresentados nas Tabelas 2 e 3 em termos de etanol produzido e rendimento foram analisados através de gráficos de superfície de resposta apresentados nas Figuras 1 e 2.

**Tabela 2** - Resultados obtidos para o caldo fermentado com *kefir*.

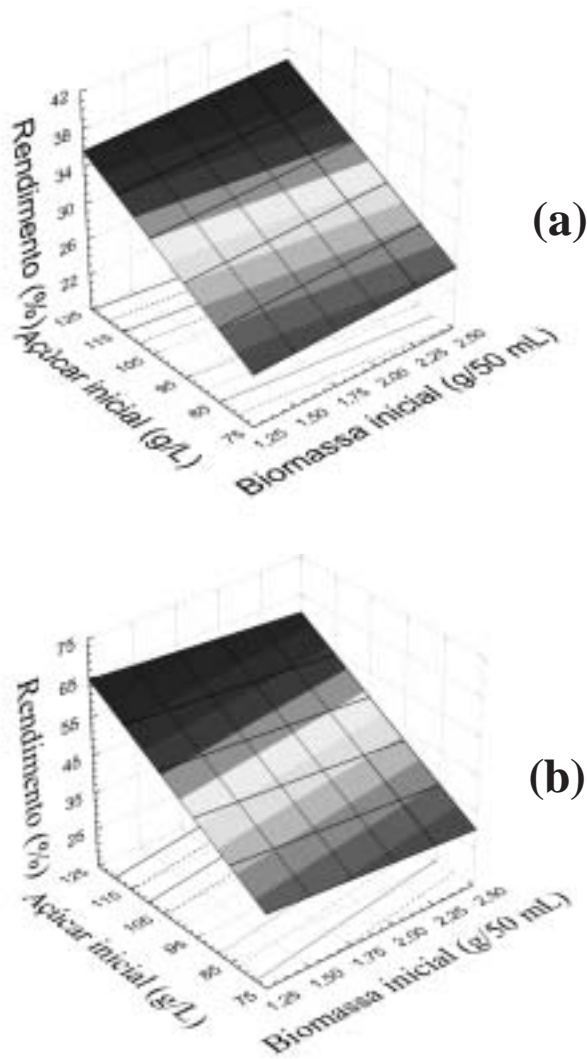
Ensaio	°Brix	Açúcar residual (g/L)	pH	Etanol (g/L)	Rendimento (%)
1	5	4,17	3,21	41,60	35,47
2	3	0,99	3,18	20,00	25,57
3	6	4,40	3,10	44,00	37,59
4	3	2,26	2,96	16,00	20,80
5	4	2,30	3,08	24,00	22,75

**Tabela 3** - Resultados obtidos para o caldo fermentado com a *Saccharomyces cerevisiae*.

Ensaio	°Brix	Açúcar residual (g/L)	pH	Etanol (g/L)	Rendimento (%)
1	8	2,12	4,48	66,40	55,65
2	5	0,22g	4,35	16,80	21,27
3	7	2,06g	4,20	67,20	56,29
4	4	0,29g	3,84	24,80	31,42
5	6	0,35g	4,18	56,00	52,11



**Figura 1** - Superfície de resposta do etanol produzido em função da biomassa inicial e do (açúcar inicial e da biomassa inicial. a) utilizando grãos de *kefir*; b) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

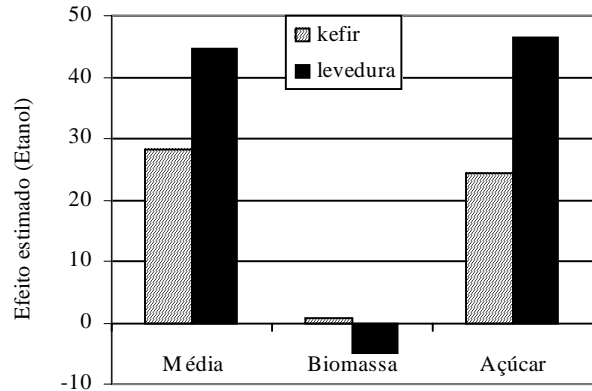


**Figura 2** - Superfície de resposta do rendimento etanol produzido em função da biomassa inicial e do açúcar inicial. a) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*; b) utilizando kefir.

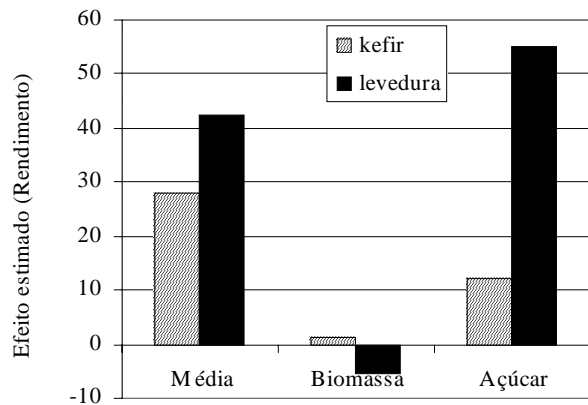
Os resultados apresentados na Figura 1 (a) indicam que quanto maior a quantidade de açúcar inicial, maior é a quantidade de etanol produzido. A biomassa inicial não exerce uma influência significativa no teor de etanol produzido. O mesmo perfil é observado nos resultados apresentados pela Figura 1(b), onde a quantidade de etanol produzido também é fortemente influenciada pela quantidade de açúcar inicial. Entretanto, no caso da fermentação com a levedura, a Figura 1(b) mostra que a elevação da biomassa pode causar uma ligeira queda no teor de etanol produzido. Comparando-se os teores alcoólicos finais obtidos para o kefir e para a levedura observa-se que, de forma geral, os teores alcoólicos obtidos com a levedura são maiores. Na Figura 2 é apresentado o rendimento em etanol obtido para as fermentações em estudo.

Os resultados apresentados na Figura 2 indicam que quanto maior o teor de açúcar maior o rendimento em etanol do processo para ambos os microorganismos utilizados. Estes resultados são coerentes com os resultados apresentados na Figura 1. Comparando-se os rendimentos obtidos para os dois microorganismos empregados verifica-se que rendimentos significativamente superiores são obtidos para a levedura. Os rendimentos máximos obtidos para ambos os processos (*kefir* e levedura) correspondem ao ensaio número 3 (Tabela 1), tendo sido obtido um rendimento máximo em etanol de 37,59% quando se utiliza o *kefir* e 56,29% quando se utiliza a levedura. Vale ressaltar que o produto fermentado obtido com o *kefir* resultou em um aroma mais agradável que o obtido quando a levedura é utilizada.

As Figuras 3 e 4 apresentam a estimativa dos efeitos principais do açúcar e da biomassa inicial na produ-



**Figura 3** - Efeitos estimados para a produção de etanol.



**Figura 4** - Efeitos estimados para o rendimento em etanol.

ção e no rendimento do etanol para as fermentações em estudo.

Os efeitos apresentados na Figura 3 confirmam as observações feitas para a Figura 1, onde a biomassa tem um efeito muito pequeno quando comparado com o açúcar inicial sendo inclusive um pouco negativo no caso da fermentação da levedura. Os efeitos apresentados na Figura 4 confirmam as observações feitas para a Figura 2 onde novamente a biomassa tem um efeito pequeno em relação ao açúcar inicial. Os efeitos de interação não foram significativos e por isso não foram apresentados.

## Conclusão

De acordo com os resultados obtidos esta fermentação é viável, uma vez que houve consumo de açúcar e produção de etanol. A fermentação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resulta em uma maior quantidade de etanol produzido, quando comparada com a fermentação dos grânulos de *kefir*.

## Referências Bibliográficas

- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. L. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo, Edgard Blücher, 2001. v.3, 520 p.
- ATHANASIADES, I.; BOSKOU, D.; KANELLAKI, M.; KIOSSEOGLU, V. E KOUTINAS, A. A. Whey liquid waste of dairy industry as raw material for potable alcohol production by kefir granules. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v50, p.7231-7234, 2002.
- ATKINS, P. W. **Physical chemistry**, 5th ed. Oxford, Oxford University Press, 1994. 850 p.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.. **Planejamento e otimização de experimentos**, 2. ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 2002. 450p.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- PREGNOLATTO, W.; PREGNOLATTO, N. P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos para análise de alimentos**, 3. ed., São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, 1985.