

# BRAGANTIA

*Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas*  
INSTITUTO AGRÔNOMICO

Vol. 13

Campinas, junho de 1954

N.º 13

## FERMENTAÇÃO DO CALDO DA CANA DE AÇÚCAR (*SACCHARUM OFFICINARUM* L.) VAR. CO. 290. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SAIS DE AMÔNIO E FARELO DE ARROZ SÔBRE O RENDIMENTO ALCOÓLICO (\*)

C. G. TEIXEIRA e A. SALATI, *engenheiros-agrônomo, Laboratório de Microbiologia da Seção de Tecnologia Agrícola, Instituto Agrônomo de Campinas*

### RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo para verificar a influência da adição de sais de amônio e de farelo de arroz sôbre o rendimento alcoólico obtido pela fermentação do caldo de cana de açúcar da variedade Co. 290.

Os dados obtidos nos levaram às seguintes conclusões :

1. O caldo de cana da variedade Co. 290 é pobre em elementos nutritivos para o fermento alcoólico.
2. A adição de 0,1% de sulfato ou fosfato de amônio melhora o processo de fermentação.
3. Os rendimentos alcoólicos mais elevados são obtidos quando o caldo de cana é enriquecido com 0,1% de sulfato ou fosfato de amônio e 0,1% de farelo de arroz. O farelo de arroz parece ter sua atividade ligada ao seu alto teor em vitaminas, principalmente a B<sub>1</sub>.

### 1 — INTRODUÇÃO

Os muitos pesquisadores que trabalharam com *Saccharomyces cerevisiae* Hansen observaram que êste fermento necessita, para atingir bom desenvolvimento, de um substrato rico em substâncias nitrogenadas e com certo teor de vitaminas. Na nutrição dos fermentos, os sais de amônio desempenham papel de grande importância.

Pasteur (8) foi o primeiro investigador que observou a influência dos sais de amônio no metabolismo dos fermentos.

Ehrlich (2) verificou que os sais de amônio são facilmente transformados em proteínas para o fermento, e a presença deles no meio em fermentação evita a formação de óleo de fúsel e ácido succínico.

Meisenheimer (6) estudou, por autólise, em presença de tolueno, as substâncias nitrogenadas existentes nas células de fermento. O nitrogênio,

(\*) Trabalho apresentado no II Congresso Panamericano de Agronomia, realizado em Piracicaba e S. Pedro, de 29 de março a 6 de abril de 1954.

Recebido para publicação em 31 de março de 1954.

na forma amoniacal, atingiu a 11% nas proteínas constituintes das células do fermento.

Hoffman (3) observou que o cloreto de amônio, quando adicionado à massa de pão, produz um tremendo aumento na formação de CO<sup>2</sup>.

Zeller (17) observou também que diversos sais de amônio estimulam de maneira bem definida a fermentação alcoólica. As experiências mostraram que o aumento na capacidade de fermentação parece estar relacionado com a formação de um complexo de açúcar com os sais de amônio.

Smythe (13) verificou que a asparagina e a glutamina exercem um efeito estimulante análogo ao provocado pelos sais de amônio sobre as células de fermento. Os sais de amônio reduziram significativamente o período de indução de extrato de células de fermento, preparado com estirpe de fermento para panificação.

Muntz (7) estudou a ação dos íons potássio e amônio na fermentação alcoólica. Das suas experiências concluiu que ambos os íons são necessários para a formação de hexoses bifosfatadas a partir de hexose monofosfatada. No sistema que não contém potássio ou amônio, a glicose é transformada em hexose monofosfatada, e estes ésteres se acumulam à medida que a fermentação se processa. Quando se adiciona potássio ou amônio à mistura em fermentação, a glicose é fermentada e a formação de CO<sup>2</sup> corresponde com bastante precisão à esperada pela equação de Harden e Young. Esta é uma das fases intermediárias na transformação da hexose em álcool. Acredita-se que na fermentação alcoólica a maior parte dos açúcares sofre a seguinte transformação :



Massart e Horens (5) observaram que o sulfato de amônio, em presença de pequenas quantidades de glicose, produz um aumento no consumo de oxigênio pela levedura de cerveja. Este aumento seria um índice de assimilação de nitrogênio amoniacal.

As vitaminas exercem também papel relevante na fisiologia dos fermentos, sendo umas mais importantes do que outras.

Williams e Roehm (16) verificaram que certos componentes da vitamina B podem atuar como estimulantes do crescimento de certas estirpes de fermento.

Williams e Bradway (15) constataram que certas estirpes de fermento devem ter seu crescimento estimulado pelos componentes da vitamina B. Verificaram que a vitamina antineurítica afeta de maneira bem marcante o crescimento de diversas estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen.

Schultz e outros (12) verificaram que a vitamina B<sub>1</sub> (tiamina) exerce ação preponderante na velocidade de fermentação alcoólica.

Em estudos realizados por Leonian e Lilly (4) sobre o efeito das vitaminas no desenvolvimento de dez estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, foi observado que a exigência em tiamina, biotina e outras vitaminas, variou de estirpe para estirpe.

Burkholder (1) investigou também a deficiência em vitaminas nos fermentos. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, a biotina produziu aumento considerável no crescimento do fermento. As exigências em vitaminas variaram para as diversas espécies de fermentos estudados.

Pruzansky (9) observou que o "mold bran" (preparado de amilase fúngica) aumenta o rendimento alcoólico dos mostos de cereais, quando é utilizado como agente sacarificante em substituição ao malte. Atribuiu-se ao conteúdo em vitamina do "mold bran", o fator responsável pela elevação do rendimento alcoólico.

Stepp e outros (14) citam o farelo de arroz como substância rica em vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>6</sub>. O teor em vitamina B<sub>1</sub> varia entre 1.100 e 1.500 gamas/100 g. É pobre em vitamina B<sub>2</sub>.

Rosenberg (10) classifica o farelo de arroz como material rico em vitaminas B<sub>1</sub> e B<sub>6</sub>, e consideravelmente rico em ácido pantotênico. Os grãos em geral são também ricos em biotina.

Rudolph (11) atribui-lhe os seguintes valores em vitaminas :

	Gamas/100 g
Vitamina B <sub>1</sub> -----	1.000 — 2.500
Vitamina B <sub>6</sub> (arroz integral) -----	188
Ácido pantotênico -----	15 — 27

Em nossas experiências observamos que a adição de farelo de arroz ao caldo de cana, complementado por sais de amônio, melhora consideravelmente o processo de fermentação, resultando em alto rendimento alcoólico.

## 2 — PREPARO DO MOSTO

O caldo de cana da variedade Co. 290 foi diluído a aproximadamente 17° Brix e acidificado com ácido sulfúrico, para se obter pH entre 4,6 e 5,0.

Para estudar o efeito dos sais de amônio e do farelo de arroz sobre a fermentação alcoólica, foram feitos os seguintes enriquecimentos do caldo de cana :

### TRATAMENTOS

1 -----	0,1% de sulfato de amônio — (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
2 -----	0,1% de fosfato de amônio — (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
3 -----	0,1% de farelo de arroz
4 -----	{ 0,1% de sulfato de amônio
	{ 0,1% de fosfato de amônio
5 -----	{ 0,1% de sulfato de amônio
	{ 0,1% de farelo de arroz
6 -----	{ 0,1% de fosfato de amônio
	{ 0,1% de farelo de arroz
7 -----	{ 0,1% de sulfato de amônio
	{ 0,1% de fosfato de amônio
	{ 0,1% de farelo de arroz
8 -----	Testemunha, sem enriquecimento

O caldo, preparado de acôrdo com os diversos tratamentos, foi colocado, em porções de 360 cc, em frascos Erlenmeyer de 500 cc tamponados com algodão. Êsses frascos foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, a uma pressão de 15 libras/polegada quadrada.

Do mosto inicial, sem fermentar, foram retiradas amostras para determinação do Brix, acidez e açúcares totais.

Os frascos esterilizados e resfriados foram semeados com uma alça de cultura de fermento alcoólico (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen, n.º F-1 da coleção do Instituto Agrônômico). A seguir, foram levados à estufa, regulada para aproximadamente 30°C. A análise foi feita após 80 horas de fermentação.

### 3 — ANÁLISE DOS MOSTOS FERMENTADOS

Os mostos fermentados foram analisados para determinação do teor alcoólico, acidez, Brix e açúcares totais.

O Brix foi determinado por meio de sacarímetro de Brix, tendo sido as leituras corrigidas para 20°C.

A acidez é expressa em centímetros cúbicos de NaOH N/10 necessários para titular 10 cc de mosto fermentado, utilizando fenolftaleína como indicador.

Os açúcares totais são expressos em gramas de glicose por 100 cc de mosto. As determinações foram feitas pelo método de Eynon-Lane.

QUADRO 1. — Dados analíticos referentes aos diversos tratamentos do caldo de cana (1)

Tratamentos	Brix		Acidez		pH		Açúcares		Rendimento alcoólico	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	vol./100 cc	teórico %
1 a -----	17,05	-0,28	3,46	6,15	4,90	3,90	16,55	0,57	9,78	91,36
1 b -----	17,65	1,19	3,00	5,60	4,70	3,69	17,20	1,78	9,28	83,55
2 a -----	17,05	-0,21	4,21	6,87	4,94	3,93	16,55	0,56	9,56	89,46
2 b -----	17,65	1,02	3,70	6,44	4,73	3,74	17,20	1,64	9,44	84,72
3 a -----	17,05	4,15	3,02	5,31	4,90	4,39	16,55	4,56	7,40	69,25
3 b -----	17,65	4,14	2,60	4,89	4,85	4,28	17,20	4,60	7,56	68,01
4 a -----	17,05	0,80	4,64	7,67	4,88	3,67	16,55	1,20	9,42	88,15
4 b -----	17,65	1,38	4,20	7,13	4,66	3,51	17,20	1,85	9,18	82,65
5 a -----	17,05	-0,55	3,45	6,08	4,89	3,94	16,55	0,19	9,91	93,01
5 b -----	17,65	-0,70	3,35	5,45	4,78	3,78	17,20	0,35	10,14	91,29
6 a -----	17,05	-0,75	4,30	7,15	4,95	3,97	16,55	0,21	9,97	93,29
6 b -----	17,65	-0,55	4,20	6,40	4,72	3,80	17,20	0,42	10,15	91,38
7 a -----	17,05	0,07	4,64	7,50	4,91	3,64	16,55	0,66	9,60	89,77
7 b -----	17,65	0,00	4,00	4,35	4,66	3,43	17,20	0,50	10,01	90,09
8 a -----	17,05	3,40	2,90	6,20	4,91	4,37	16,55	4,17	7,63	74,68
8 b -----	17,65	4,35	2,50	5,40	4,78	4,23	17,20	4,79	7,58	68,22

(1) Média de três repetições

Para a determinação do teor alcoólico, transferem-se 100 cc do mosto fermentado, medidos em frasco volumétrico, para um frasco Kjeldahl. Lava-se duas vezes o frasco volumétrico com água destilada, e essa água de lavagem é adicionada ao mosto existente no frasco Kjeldahl. Destila-se o

mosto e recebe-se o destilado em um frasco volumétrico de 100 cc. Recolhem-se neste aproximadamente 97-98 cc do destilado. Completa-se o volume com água destilada. O teor alcoólico é determinado por meio de refratômetro de imersão a uma temperatura de 25°C. As leituras devem ser feitas quando a temperatura do destilado fôr exatamente 25°C, para evitar erros. Determinado o teor alcoólico do destilado, calcula-se o rendimento.

O quadro 1 nos fornece os dados analíticos referentes aos oito tratamentos.

Observa-se que os melhores rendimentos alcoólicos foram obtidos de mostos enriquecidos com sais de amônio e farelo de arroz.

#### 4 — ANÁLISE ESTATÍSTICA

No quadro 2 estão tabelados os rendimentos alcoólicos obtidos nos diversos tratamentos à base de sais de amônio e farelo de arroz.

QUADRO 2. — Rendimento alcoólico de mostos enriquecidos com sais de amônio e farelo de arroz

Repetições	Tratamentos								Totais
	1	2	3	4	5	6	7	8	
I .....	91,49	90,18	68,00	89,80	92,14	92,42	90,64	84,84	699,51
II .....	91,77	92,42	68,19	87,84	93,45	93,73	89,52	67,35	684,27
III .....	90,83	85,78	71,56	86,81	93,45	93,73	89,15	71,84	683,15
IV .....	82,80	82,71	69,57	80,82	90,18	89,55	88,29	67,41	651,33
V .....	82,08	84,42	67,68	83,61	91,53	92,52	90,54	65,97	658,35
VI .....	85,77	87,03	66,78	83,52	92,16	92,07	91,44	71,28	670,05
Totais .....	524,74	522,54	411,78	512,40	552,91	554,02	539,58	428,69	4046,66

Procedendo-se à análise estatística dos dados do quadro 2, obtém-se o seguinte :

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Variância	F
Blocos .....	5	201,65	40,33	4,68
S .....	1	941,64	-----	109,11 <sup>xx</sup>
P .....	1	922,43	-----	106,88 <sup>xx</sup>
SP .....	1	1427,46	-----	165,40 <sup>xx</sup>
F .....	1	101,85	-----	11,80 <sup>xx</sup>
SF .....	1	34,65	-----	4,01 <sup>x</sup>
FP .....	1	46,81	-----	5,42 <sup>x</sup>
SPF .....	1	50,80	-----	5,88 <sup>x</sup>
Tratamentos .....	7	3525,64	503,66	58,36
Erro .....	35	302,09	8,63	
Total .....	47	4029,38		

## 5 — CONCLUSÕES

A análise estatística nos permite tirar as seguintes conclusões :

1. A adição de sulfato ou de fosfato de amônio provoca um efeito altamente significativo, evidenciado pelo aumento no rendimento alcoólico obtido em relação à testemunha. Estatisticamente não houve diferença entre aquêles dois tratamentos.

2. O caldo enriquecido com sulfato e fosfato de amônio apresenta uma interação negativa. Supõe-se que o amônio adicionado ao caldo, na forma de sulfato ou de fosfato, é suficiente para suprir a escassez em amônio que êle apresentou como substrato para o fermento alcoólico. O amônio, além de certo limite, parece ser prejudicial.

3. O efeito médio do farelo de arroz é significativo. Sòzinho, não resulta em qualquer melhora no processo de fermentação, porém, como complemento do sulfato ou do fosfato de amônio, melhora consideravelmente o processo de fermentação do caldo de cana da variedade Co. 290, produzindo, em ambos os casos, acréscimo semelhante no rendimento alcoólico.

Esta afirmativa poderá ser melhor avaliada pela análise dos acréscimos médios obtidos nos tratamentos com e sem farelo de arroz.

Esta análise nos fornece os seguintes dados :

		P O	P 1			
F	O -----	953,43	1034,94	1988,37	sF = 81,51	médio = 6,79
F	1 -----	964,69	1093,60	2058,29	cF = 128,91	médio = 10,74
		1918,12	2128,54	4046,66		difer. = 3,95

		S O	S 1			
F	O -----	951,23	1037,14	1988,37	sF = 85,91	médio = 7,16
F	1 -----	965,80	1092,49	2058,29	cF = 126,69	médio = 10,56
		1917,03	2129,63	4046,66		difer. = 3,40

THE INFLUENCE OF ADDING AMMONIUM SALTS AND RICE POLISHINGS  
ON THE RATE OF ALCOHOLIC FERMENTAION IN JUICE OF CO. 290  
SUGAR CANE

SUMMARY

The sugar cane variety Co. 290 is widely distributed in the State of São Paulo. Its juice does not ferment very well because it seems to be deficient in nutrients for the yeast. Comparative tests were carried out to determine the influence of ammonium salts and rice polishings on the alcohol yield when these substances were added to the juice of this variety prior to fermentation. The following conclusions are based on the results of these tests :

1. The juice from plants of the variety Co. 290 is poor in nutrient elements for the yeast.
2. The addition of 0.1 per cent ammonium sulphate or phosphate improves the process of fermentation.
3. The best alcohol yields are obtained when the juice is enriched with 0.1 per cent ammonium sulphate or phosphate, plus rice polishings at the same rate. The rice polishings seem to be active because of their high content in vitamins, mainly vitamin B<sub>1</sub>.

#### LITERATURA CITADA

1. BURKHOLDER, P. R. Vitamin deficiencies in yeasts. *Amer. J. Bot.* 30:206-211. 1943.
2. EHRLICH, F. Ueber die Entstehung der Bernsteinsauere bei der alkoholischen Gaerung. *Biochem. Z.* 18:391-423. 1909.
3. HOFFMAN, C. H. The utilization of ammonium chloride by yeast. *J. industr. Engng Chem.* 9:148-151. 1917.
4. LEONIAN, L. G. & LILLY, V. G. The effect of vitamins on ten strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Amer. J. Bot.* 29:459-464. 1942.
5. MASSART, L. & HORENS, J. L'assimilation d'azote aminé par les Levures. *Enzymologia* 15:359-361. 1953.
6. MEISENHEIMER, J. The nitrogenous substances of yeasts. *Wschr. Brau.* 32:325-326. 1915.
7. MUNTZ, J. A. The rôle of potassium and ammonium in alcoholic fermentation. *J. biol. Chem.* 171:653-665. 1947.
8. PASTEUR, L. Mémoire de la fermentation alcoolique. *Ann. Chim. (Phys.)* 58:323-426. 1860.
9. PRUZANSKY, J. J. Microbial growth factors in commercial products of bacterial and fungal origin. *Iowa St. Coll. J. Sci.* 25:340-341. 1950-51.
10. ROSENBERG, H. R. Chemistry and physiology of the vitamins. New York, Interscience Publishers Inc., 1942. 674 p.
11. RUDOLPH, W. Vitamine der Hefe. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M. B. H., 1948. 94 p.
12. SCHULTZ, A., ATKIN, L. & FREY, C. N. A fermentation test for vitamin B<sub>1</sub>. *J. Amer. chem. Soc.* 59:948-949. 1937.
13. SMYTHE, C. V. The effect of certain tissue extracts of ammonia salts and of certain amides on the rate of fermentation by bakers' yeast. *Enzymologia* 6:9-14. 1939.
14. STEPP, W., KUEHNAU, J. & SCHROEDER, H. Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart, Ferdinand Enke, 1939. 283 p.
15. WILLIAMS, R. J. & BRADWAY, E. M. The further fractionation of yeast nutrilites and their relationship to vitamin B and Wildiers' "Bios". *J. Amer. chem. Soc.* 53:783-789. 1931.
16. ——— & ROEHM, R. R. The effect of antineuritic vitamin preparation on the growth of yeasts. *J. biol. Chem.* 87:581-590. 1930.
17. ZELLER, H. Wirkung vom Ammonsalzen auf die Hefegaerung. IV. *Biochem. Z.* 175:135-161. 1926.