

BRAGANTIA

Boletim Técnico da Divisão de Experimentação e Pesquisas
INSTITUTO AGRÔNOMICO

Vol. 10

Campinas, Outubro de 1950

N.º 10

PRODUÇÃO DE ALCÓOL DE MANDIOCA

UTILIZAÇÃO DE BOLORES NA SACARIFICAÇÃO DO AMIDO

C. G. TEIXEIRA

Engenheiro agrônomo, Secção de Fitopatologia, Instituto Agrônomo de Campinas

1 - INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas segregadas por bolores na sacarificação de substâncias amiláceas é conhecida no Oriente desde os tempos imemoriais. Nessa região, a matéria-prima mais empregada para a produção de álcool etílico é o arroz. A conversão do amido em açúcares fermentáveis é realizada pelo emprêgo de culturas de bolores que possuem as enzimas sacarificantes. Estas culturas utilizadas na sacarificação do arroz recebem, no Japão, o nome de "koji" e, no Sião, de "ragi". Jalavicharana (3) estudou a microflora do "ragi" e verificou a presença de espécies de *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, etc. Predominou, entretanto, o *Aspergillus flavus* Link. No "koji", preparado no Japão, há predominância do *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn.

Este processo de sacarificação utilizado nos países asiáticos é ainda bem primitivo e redundante em baixo rendimento alcoólico, devido a uma sacarificação imperfeita, e o produto obtido não é muito uniforme.

Métodos modernos para a utilização de bolores como agentes sacarificantes das substâncias amiláceas estão sendo desenvolvidos nestes últimos anos. A utilização de bolores selecionados, com alto poder enzimático, e o aperfeiçoamento de processos industriais para multiplicá-los, redundariam certamente em alto rendimento alcoólico, em virtude de uma sacarificação bastante eficiente.

Nos Estados Unidos, em 1914, Takamine (8) publicou resultados de experiências realizadas em escala industrial e nas quais utilizou culturas de *Aspergillus oryzae* como agente sacarificante. O rendimento alcoólico obtido foi igual ao de mostos sacarificados com malte de cevada.

Os bolores têm sido usados em escala industrial para sacarificação do amido sob a forma de farelo embolorado (*mold bran*) ou pelo processo amilo. O farelo embolorado é obtido pelo crescimento do bolor selecionado em farelo de cereal umedecido e passado pela autoclave, que é conservado em salas onde a temperatura, umidade do ar e arejamento são controlados cuidadosamente. Após um período de crescimento de 30-40 horas, o farelo

embolorado é removido desta sala incubadora e pôsto a secar. Êste produto, depois de sêco, vai substituir o malte na destilaria. No processo amilo, estirpes selecionadas de *Rhizopus* ou *Mucor* são cultivadas em goma de amido pré-liquidificada, cozida e arejada. Dentro de 24-28 horas, quantidade suficiente de enzimas é segregada para sacarificar o amido existente na goma.

Ambos os processos apresentam certas desvantagens. O preparo do farelo embolorado é um processo trabalhoso, ocupa muito espaço e exige equipamento especial. Além disso, é necessário empregar um farelo de cereal como substrato. No processo amilo, todo o mosto deve ser previamente liquidificado e depois arejado durante o crescimento do fungo, o que encarece e dificulta a operação.

Le Mense (4) e outros estudaram a viabilidade de se obterem enzimas sacarificantes segregadas por bolores, que são multiplicados em culturas submersas e suficientemente arejadas. Várias espécies de *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Monilia* foram cultivadas e submetidas a teste, quanto ao poder enzimático. Entre elas, destacou-se uma estirpe de *Aspergillus niger* van Tieghem, da coleção do Northern Regional Research Laboratory, Illinois, EE. UU., sob o número 337. O próprio Le Mense (5), em colaboração com outros pesquisadores, publicou um trabalho dando detalhes e o preço de custo de uma instalação para produzir cultura submersa de fungos utilizados como agentes sacarificantes do amido.

No norte do Brasil, os pequenos agricultores produzem ainda uma espécie de aguardente de mandioca, por um processo bastante primitivo, em que a sacarificação do amido é feita por meio de fungos. A aguardente resultante recebe o nome de tiquira (6).

Banzon e outros (2) realizaram experiências utilizando farelo embolorado na sacarificação do amido de mandioca. Observaram que o farelo embolorado é um agente mais ativo que o malte de cevada na sacarificação dêsse amido. Um rendimento teórico, de cerca de 70%, foi obtido pela sacarificação da mandioca com 8-10% de malte de cevada. Pela utilização de 10% de farelo embolorado, na sacarificação do amido de mandioca, foi obtido um rendimento teórico entre 80-85%.

Em vista do preço elevado do malte de cevada, tem-se usado em nosso meio o malte de milho. Êste malte é produzido na própria destilaria. Ê uma operação demorada e que exige muito cuidado, a fim de evitar contaminação por meio de bactérias e bolores existentes no ar.

A utilização de culturas submersas na sacarificação de substâncias amiláceas, para produção de álcool, resultaria numa simplificação do processo e seria a mais adequada para o nosso país, onde a temperatura elevada e a umidade do ar são agentes desfavoráveis para a produção de um bom malte.

As experiências realizadas tiveram como objetivo verificar a viabilidade da utilização, em escala industrial, de cultura submersa de fungos na sacarificação do amido de mandioca. Os resultados experimentais foram bastante satisfatórios. Obtiveram-se rendimentos alcoólicos superiores aos que são atualmente conseguidos em nosso país. Além disso, o processo é o que parece mais adequado para as regiões de clima quente e úmido.

2 - CULTURA SUBMERSA DE BOLOR

O mais sério empecilho para o desenvolvimento da indústria de álcool de substâncias amiláceas em nosso meio é a escassez de malte e a dificuldade de obtê-lo e preservá-lo. Somente as cervejarias usam malte de cevada e a maior parte deste malte é importada. Em virtude do elevado preço do malte de cevada (cerca de Cr\$ 4,00 o quilo), a sua utilização nas destilarias torna-se impraticável, por causar a elevação do custo de produção do álcool obtido. O problema se resume em achar um substituto para o malte, que redunde em rendimentos alcoólicos iguais ou superiores aos obtidos de mostos sacarificados com malte.

2.1 - VANTAGEM DA CULTURA SUBMERSA

Várias são as vantagens oferecidas pela utilização de culturas submersas na sacarificação do amido. Entre elas, podem-se citar as seguintes : a) o custo da operação de sacarificação é menor que o da sacarificação com o malte ; b) elimina-se uma das operações mais difíceis na destilaria, que é a de produção de malte ; c) a operação de fermentação pode ser realizada assépticamente, o que não é possível quando se usa malte na sacarificação ; d) a sacarificação é mais eficiente que pelo uso de malte de cevada ; e) substratos simples e de baixo preço podem ser utilizados como meio de cultura para a multiplicação do fungo ; f) o rendimento alcoólico obtido é igual, ou superior, ao de mostos sacarificados com malte ; g) não é necessária nenhuma modificação na aparelhagem utilizada para a produção de álcool de substâncias amiláceas, pelo processo clássico da maltagem.

2.2 - PREPARO DA CULTURA SUBMERSA

Em experiências realizadas pelo autor (9), obtiveram-se ótimos resultados na multiplicação de *Aspergillus niger* estirpe NRRL-337, utilizando o seguinte substrato :

Farelo de vinhaça desidratada ⁽¹⁾	5,0%
Milho moído	1,0%
Carbonato de cálcio	0,5%

Coloca-se uma certa quantidade de água corrente em um recipiente de vidro onde vai ser preparado o meio de cultura e adiciona-se, a seguir, o farelo de vinhaça. Ferve-se em uma outra vasilha uma quantidade de água suficiente para produzir uma goma de milho de viscosidade média. O milho moído é misturado com uma pequena porção de água fria. Quando a água da vasilha estiver em ebulição, junta-se o milho moído vagarosamente, com agitação constante. Após dez minutos de cozimento, a goma de milho é transferida para o vidro onde vai ser preparado o meio de cultura. Junta-se, a seguir, carbonato de cálcio. Completa-se o volume com água corrente. O vidro é tamponado com algodão e esterilizado em autoclave a 125°C, durante três horas.

⁽¹⁾ Tradução da expressão inglesa *distillers'dried solubles*.

Os mostos de raspa de mandioca sacarificados com culturas de fungo, obtidas neste substrato, apresentaram um alto rendimento alcoólico (quadro 1).

O meio de cultura na base de vinhaça desidratada é ótimo para a multiplicação do *Aspergillus niger*. Nos Estados Unidos, onde o farelo de vinhaça

QUADRO 1.—Resultados de fermentação de mostos de raspa da mandioca, sacarificados com malte, de cevada e de milho, e com culturas submersas de *Aspergillus niger*, propagadas em diferentes substratos

Processos de sacarificação		Concentração do mosto		Rendimento alcoólico		Aproveitamento industrial (rendimento teórico)	
Agente	Porcentagem usada (1)	Raspa	Amido	Leitura no refratômetro	Álcool obtido de 1 000 kg de raspa		
SACARIFICAÇÃO COM MALTE							
Malte de cevada *	7	17,6	13,2	6,8	416,6	74,1	
Malte de milho **	{ 10 13,8 16,0	-----	-----	-----	316,0 410,0 450,0	----- ----- -----	
SACARIFICAÇÃO COM FUNGO (2)							
<i>A. niger</i>	(substratos)						
	Farelo de vinhaça	10	17,6	13,6	8,6	485,6	90,5
	Torta de algodão	10	15,3	10,5	7,2	472,4	95,5
	Farinha de soja integral	10	15,3	10,5	7,2	472,4	95,5

Fonte : * = dados obtidos pelo autor (9). ** = dados obtidos por Almeida (1)

(1) Para o malte, percentagem gravimétrica e, para o fungo, volumétrica

(2) Os dados referentes aos substratos preparados com torta de algodão e soja integral representam a média de 12 fermentadores

pode ser adquirido com facilidade e a preço razoável, a utilização deste meio de cultura é ideal.

Em virtude da dificuldade, entre nós, de obtenção de farelo de vinhaça, procurou-se encontrar um outro meio de cultura que o pudesse substituir, onde o fungo se desenvolvesse bem e apresentasse um alto poder sacarificante. A condição essencial seria a utilização de substâncias de fácil aquisição no comércio e de baixo preço, condição primordial para que o processo pudesse ser de valor econômico. Esse substrato deveria ser rico em nitrogênio facilmente assimilável e em complexo vitamínico B.

Entre os diversos substratos experimentados, dois foram bastante satisfatórios, e têm a seguinte composição em relação ao peso em água :

SUBSTRATO 1

Torta de algodão peneirada	3,0%
Raspa de mandioca	2,0%
Farelo de arroz	0,5%

SUBSTRATO 2

Farinha de soja integral	3,0%
Arroz integral moído	2,0%

Essas culturas são preparadas em vasilhames de vidro com capacidade para 20 litros, nos quais são colocados 12 litros de meio de cultura. O

processo de preparação dos meios de culturas constituídos pelos substratos 1 e 2 é idêntico ao já descrito para o farelo de vinhaça desidratada. O arroz ou a raspa de mandioca devem ser cozidos separadamente. Não foi adicionado aos meios de culturas o carbonato de cálcio. Os vidros contendo o meio de cultura são esterilizados e, a seguir, resfriados. Os vidros são semeados com 50 cc de cultura submersa de *Aspergillus niger* estirpe NRRL-337. Esta cultura é obtida semeando-se um frasco Erlenmeyer contendo os 50 cc de meio de cultura esterilizado com esporos obtidos de tubo com cultura pura do fungo. O frasco Erlenmeyer, após semeadura, é arejado durante 48 horas por meio de agitação (fig. 1).

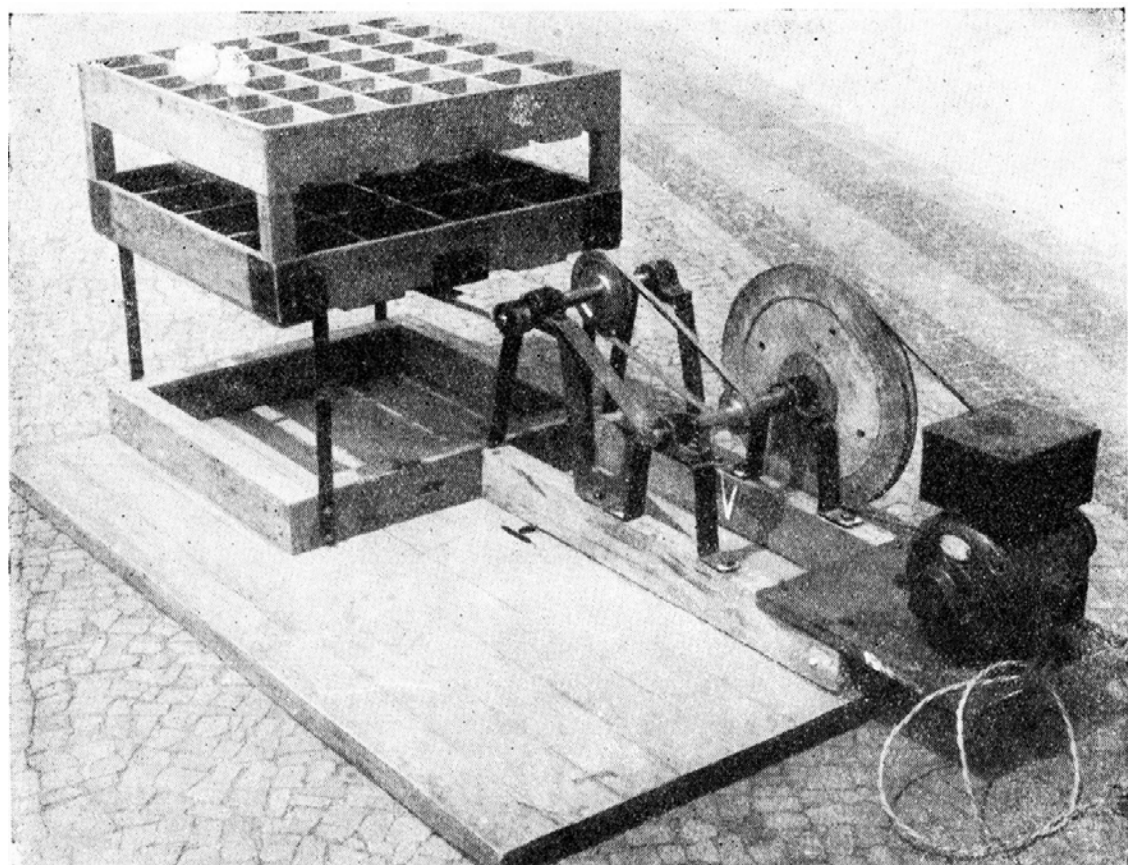


FIGURA 1.—Agitador para arejamento de culturas submersas de fungos.

Esta cultura, que foi arejada durante 48 horas, vai servir para semear o substrato do vasilhame de 20 litros. O arejamento da cultura nos recipientes de vidro se faz pela introdução de ar esterilizado e úmido, como mostra a figura 2.

O fungo é multiplicado nos recipientes de vidro à temperatura ambiente (25-30°C) durante 72 horas. Decorrido êsse período de arejamento, a cultura se apresenta bastante desenvolvida e com alto poder sacarificante. Conserva-se, a seguir, em geladeira, para ser utilizada posteriormente nas experiências de sacarificação da raspa de mandioca.

3 - PREPARO DO MOSTO

O mosto de raspa de mandioca, sacarificado com cultura submersa de *Aspergillus niger*, é preparado de acôrdo com a técnica preconizada por Stark e outros (7), como segue :

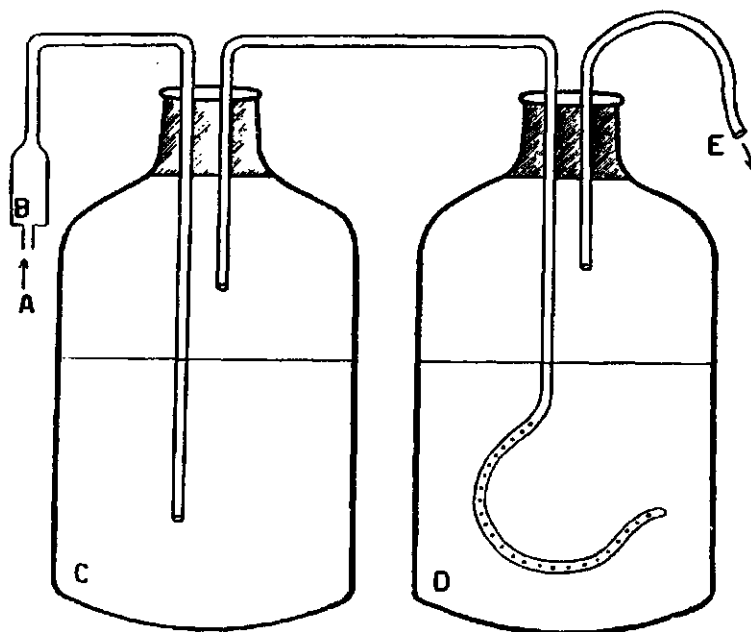


FIGURA 2.—Recipientes de vidro para multiplicação de fungos em cultura submersa. *A* — ar comprimido; *B* — filtro de algodão; *C* — vidro com água esterilizada; *D* — cultura submersa do fungo; *E* — tubo para escape do ar.

a) aquece-se a uma temperatura de 48°C uma quantidade de água igual a cêrca de 3/5 do volume total do mosto a preparar ;

b) juntam-se 2,5% da cultura submersa, calculados sôbre o volume total do mosto a ser preparado, para facilitar a liquidificação da goma ;

c) eleva-se a temperatura a 54°C e junta-se a raspa de mandioca ;

d) ajusta-se o pH entre 5,4 e 5,6 com ácido sulfúrico N/1 ;

e) a goma, constantemente agitada, é mantida à temperatura de ebulição do banho-maria durante uma hora e, em seguida, posta em autoclave a 125°C, durante uma hora ;

f) a goma é resfriada a 60-63°C, e 10% de cultura submersa do bolor, calculados sôbre o volume total de mosto a preparar, são adicionados para a sacarificação do amido ; conserva-se a esta temperatura durante dez minutos, e, a seguir, resfria-se a 30°C ;

g) ajusta-se o pH a mais ou menos 4,6—4,8 com ácido sulfúrico N/1 e completa-se o volume com água corrente esterilizada, de modo que se obtenha um mosto final com a concentração desejada ; os mostos obtidos de cada cozimento são fermentados em três frascos (fig. 3) e semeados com 2% de pé de fermentação de cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, estirpe 1-Y.

Os mostos preparados são fermentados durante cêrca de 65 horas a uma temperatura constante de 30°C. Em seguida, determina-se o teor alcoólico dos diferentes mostos preparados e calcula-se o rendimento.

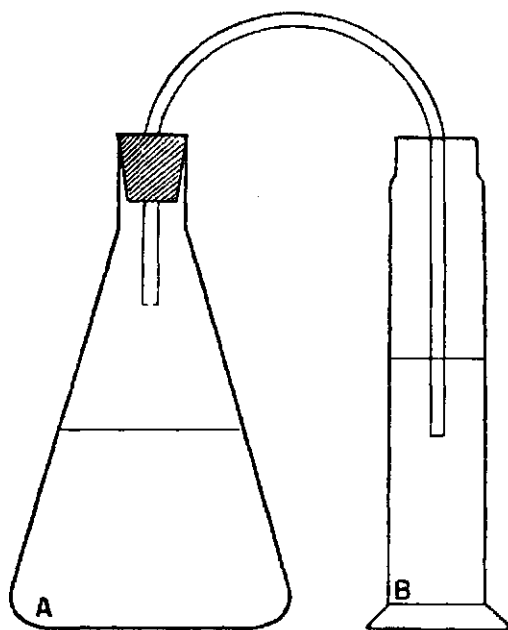


FIGURA 3.—Fermentador para testes em laboratório. *A* — frasco contendo o mosto a ser fermentado; *B* — proveta com água para borbulhamento dos gases resultantes da fermentação.

4 - ANÁLISE DOS MOSTOS FERMENTADOS

Os mostos fermentados são analisados a fim de se determinar o teor alcoólico, acidez e Brix.

Transferem-se 100 cc' do mosto fermentado, medidos em frasco volumétrico, para um frasco Kjeldhal. Lava-se duas vezes o frasco volumétrico com água destilada, e essa água de lavagem é adicionada ao mosto existente no frasco Kjeldhal. Destila-se o mosto e recebe-se o destilado em um frasco volumétrico de 100 cc. Recolhem-se no frasco volumétrico aproximadamente 97-98 cc de destilado. Completa-se o volume com água destilada. O teor alcoólico do destilado é determinado por meio do 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 mosto fermentado, que não foi destilado, é filtrado e determina-se a acidez e o Brix do filtrado.

O quadro 1 apresenta os dados comparativos, em relação ao rendimento alcoólico, quando se utiliza malte de cevada, malte de milho e cultura submersa de fungo na sacarificação da raspa de mandioca. Os dados referentes ao rendimento alcoólico utilizando cultura submersa de fungo e malte de cevada são referentes às experiências realizadas pelo autor nos Estados Unidos (9). Os dados relativos à sacarificação do amido de mandioca com malte de milho foram obtidos do trabalho de Almeida (1). Enquanto se obteve, para mostos sacarificados com malte de cevada, um rendimento alcoólico de 74% do teórico, os mostos sacarificados com cultura

submersa de *Aspergillus niger* apresentaram um rendimento alcoólico de 91% do teórico. Os nossos resultados concordam com os de Banzon (2), que, tendo trabalhado também com raspa de mandioca, observou que a sacarificação por meio de culturas de fungos é mais eficiente do que pelo malte de cevada.

Preparamos mostos de raspa de mandioca, pela sacarificação com culturas submersas desenvolvidas nos substratos na base de torta de algodão e de soja integral. Pelo exame do quadro 1, verifica-se que ambos os substratos ofereceram culturas submersas com alto poder sacarificante e que resultaram em mostos com alto teor alcoólico.

O quadro 2 mostra que a variação da concentração do mosto entre 15 e 17% praticamente não resulta em variação alguma no rendimento alcoólico. A cultura submersa utilizada na sacarificação foi obtida pela propagação do fungo no substrato na base de torta de algodão.

QUADRO 2.—Resultados analíticos de mostos sacarificados com dez por cento de culturas submersas de fungos e propagadas em substratos na base de torta de algodão

Concentração dos mostos em percentagem		Numeração dos cozimentos	Índice de acidez do mosto		Brix		Rendimento alcoólico		Aproveitamento industrial (rendimento teórico)
Raspa	Amido		No início da fermentação	No final da fermentação	No início da fermentação	No final da fermentação	Leitura no refratômetro (1)	Álcool obtido de 1.000 kg de raspa	
			pH	pH			%	litro	%
CULTURAS SUBMERSAS DE <i>Aspergillus niger</i>									
15,2	10,1	1	4,10	4,10	11,3	— 0,6	7,03	461,3	96,7
		2	5,05	4,15	13,1	— 0,7	7,75	460,5	96,8
		3	5,00	4,15	13,3	— 0,6	7,82	464,7	97,7
16,8	11,2	4	4,90	4,10	13,3	— 0,8	7,84	465,8	97,9
		5	4,85	4,05	13,3	— 0,3	7,83	465,2	97,8
		6	4,85	4,10	13,1	— 0,5	7,84	465,8	97,9
		7	4,90	4,10	13,2	— 0,7	7,72	458,7	96,6
17,6	11,7	8	4,85	4,10	13,6	— 0,7	8,08	457,8	95,9
		9	4,85	4,10	13,4	— 0,7	8,18	463,5	97,1
CULTURAS SUBMERSAS DE <i>Aspergillus oryzae</i>									
15,2	10,1	10	5,20	4,25	11,9	+ 0,9	6,17	404,9	84,8
		11	5,00	4,25	12,1	+ 0,9	6,85	407,0	85,2
16,8	11,2	12	4,95	4,20	12,6	+ 1,1	6,57	390,4	82,2
		13	4,65	4,15	12,4	+ 1,1	6,57	390,4	82,2
		14	4,90	4,20	13,0	+ 1,1	6,63	393,9	82,8

(1) Médias de três fermentadores

Experiências foram feitas para determinar o poder sacarificante de alguns bolores existentes na coleção do Instituto Agrônomo. Uma estirpe de *Aspergillus oryzae*, isolada originalmente de dorna de fermentação de saqué (vinho de arroz), Fazenda Monte Deste, município de Campinas, foi a que apresentou maior atividade enzimática. Este fungo foi multiplicado durante 48 horas no substrato na base de torta de algodão. Após 48 horas, a cultura tornou-se bastante densa e não foi possível propagar o

fungo por um período de 72 horas. Mostos de raspa de mandioca foram obtidos pela sacarificação com cultura submersa deste fungo, e os resultados estão registados na parte inferior do quadro 2.

Pelo exame do quadro 2, observa-se que as culturas submersas de *Aspergillus niger* possuem um poder sacarificante mais elevado que as culturas de *Aspergillus oryzae*, o que é evidenciado pela análise do rendimento alcoólico obtido de mostos sacarificados pelos dois fungos. A cultura de *Aspergillus niger* parece ser a mais adaptada para cultivo em cultura submersa, desenvolvendo uma atividade enzimática bastante elevada e produzindo ótima sacarificação do amido.

5 - VALOR NUTRITIVO DA VINHAÇA

O mosto fermentado, sacarificado com cultura submersa de *Aspergillus niger*, propagado no meio, na base de torta de algodão, foi filtrado e o resíduo retido no filtro foi seco a 80°C. O resíduo seco foi analisado pelo Dr. Manuel Becker, Departamento da Produção Animal da Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo, tendo revelado a seguinte composição :

COMPOSIÇÃO

Umidade (110°C).....	6,99%
Proteína.....	25,20%
Matéria mineral.....	8,73%
Matéria graxa.....	6,89%
Fibras.....	12,24%
E. N. Az.....	39,95%

Pela análise do resíduo, verificou-se que apresenta um teor elevado de proteína e que poderá ser de grande valor na alimentação de gado e aves. A utilização deste subproduto da destilaria poderá resultar em uma redução do custo do álcool obtido. Sendo de alto valor nutritivo, a sua utilização contribuirá para melhorar o valor alimentício das rações do gado e das aves. Nos Estados Unidos, o subproduto de destilaria é consumido em grande escala para a alimentação desses animais. A importância deste subproduto tem aumentado de tal modo que a tendência é a de se tornar o principal produto da destilaria, constituindo o álcool um subproduto. Em nosso meio, onde a alimentação para o gado é deficiente em proteínas, seria de grande interesse investigar a viabilidade da utilização desse subproduto da destilaria na alimentação dos rebanhos.

S U M M A R Y

It has been shown that cassava starch can be converted into alcohol most efficiently when fungal enzyme preparations from submerged cultures are used to hydrolyze the starch into sugar. The use of barley malt in the process for conversion of cassava starch has resulted in alcohol yields of 70-74% of the theoretical. Cassava mashes converted by submerged fungal cultures (*Aspergillus niger* van Tieghem, strain NRRL-337) resulted in alcohol yields up to 90% of the theoretical.

Substitutes for the distillers'dried solubles-corn medium were tried. Screened cotton seed meal and soybean meal proved to be a satisfactory substitute for distillers'dried solubles. Dehydrated cassava meal was effectively used in place of corn meal.

A comparative study was carried out using several molds from the Collection of the Instituto Agronômico for the purpose of determining their enzyme activity. The mold that presented the highest enzyme potency was found to be the strain of *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn strain F-27 which had been originally isolated from saké (rice wine).

Studies of the dehydrated residues (7% moisture) from hydrolized and fermented mash were found to contain approximately 25% protein indicating their possible value in animal feeds.

Simple substrates can be used for the propagation of the mold which is a very efficient conversion agent. It is, indeed, the best saccharifying agent for the countries where a good malt is not available at a low price.

LITERATURA CITADA

1. Almeida, J. R. *Em* Fabricação do álcool de mandioca, pg. 1-92, Tipografia Jornal de Piracicaba, Piracicaba. 1943.
2. Banzon, E. I. e outros. Fermentative utilization of cassava. The production of ethanol. Iowa State College Jour. Sci. 23 : 219-235. 1949.
3. Jalavicharana, K. Conversion of rice by submerged culture microbial enzyme preparations. Joseph E. Seagram & Sons, Inc., Res. Lab. Report 1710-F : 1-15, tab. 1-6. 1950.
4. Le Mense, E. H. e outros. Production of mold amylase in submerged culture. Jour. Bact. 54 : 149-159. 1947.
5. Le Mense, E. H. e outros. Grain alcohol fermentations. Submerged mold amylase as a saccharifying agent. Ind. Eng. Chem. 41 : 100-103. 1949.
6. Maia, R. Tiquira. Aguardente de mandioca. Rev. Tecnol. Bebidas 2 (3) : 9-10. 1949.
7. Stark, W. H. e outros. Laboratory cooking, mashing, and fermentation. Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 15 : 443-446. 1943.
8. Takamine, J. Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the application of its amyloclastic enzyme to the fermentation industry. The Jour. Ind. Eng. Chem. 6 : 824-828. 1914.
9. Teixeira, C. e outros. Ethyl alcohol from cassava. Ind. Eng. Chem. 42 : 1781-1783. 1950.