

BRAGANTIA

Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Estado de São Paulo

Vol. 16

Campinas, dezembro de 1957

N.º 17

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR VAR. Co. 290.

IV — EFEITO DA ADIÇÃO DE TIAMINA E MANGANÊS SOBRE O RENDIMENTO ALCOÓLICO (*)

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

RESUMO

Realizou-se uma experiência comparativa para verificar a influência da adição de tiamina e sulfato de manganês sobre o rendimento alcoólico obtido pela fermentação do caldo de cana de açúcar da variedade Co. 290. Verificou-se que tanto a tiamina como o sulfato de manganês provocam um aumento no rendimento alcoólico. Pela adição das duas substâncias ao caldo de cana a ser fermentado, obtêm-se rendimentos alcoólicos superiores àquêles resultantes da adição de cada uma delas em separado. Rendimentos alcoólicos mais elevados foram ainda obtidos pela adição de farelo de arroz ao caldo de cana a ser fermentado. O farelo de arroz parece ser altamente benéfico na fermentação alcoólica em virtude do seu teor elevado em tiamina e, talvez, outras substâncias de importância para a nutrição e atividade do fermento alcoólico, tais como o ácido pantotênico e o manganês.

1 — INTRODUÇÃO

Em experiências anteriores (17), verificamos que da adição de sulfato de amônio e farelo de arroz ao caldo de cana da variedade Co.290 resulta uma aceleração da fermentação alcoólica, e, ao mesmo tempo, os rendimentos obtidos são também melhores. Daí deduzimos ser o caldo da variedade Co.290 deficiente em nitrogênio e em outros elementos essenciais para o metabolismo do fermento alcoólico. Para o seu bom desenvolvimento e máxima atividade, exige o fermento alcoólico um substrato rico em substâncias nitrogenadas, com um certo teor de vitaminas e sais minerais.

Trabalhos de vários pesquisadores (1, 4, 7, 8, 9, 10, 15, 19) demonstraram a importância dos sais de amônio no metabolismo do fermento alcoólico.

Por outro lado, o farelo de arroz (17), quando adicionado ao caldo de cana, contribuiu de maneira marcante para elevar o ren-

(*) Trabalho apresentado na II Jornada Brasileira de Bromatologia, Petrópolis, abril de 1957. Recebido para publicação em 23 de agosto de 1957.

dimento alcoólico obtido. Por esta razão, resolvemos tentar pesquisar quais os possíveis elementos encontrados no farelo de arroz que seriam responsáveis por esta elevação no rendimento alcoólico.

Rosenberg (11) classifica o farelo de arroz como material rico em vitaminas B₁ e B₆ e consideravelmente rico em ácido pantotênico.

Rudolph (12) atribui-lhe os seguintes valores em vitaminas:

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

Foi observado por vários pesquisadores (5, 13, 18) que a tiamina é importante na nutrição de certos fermentos, principalmente na do fermento alcoólico.

Lima (6) observou também que na ausência de manganês a produção de gás resultante da fermentação alcoólica foi sempre mais lenta que em presença de pequenas doses de sulfato de manganês. Observou que o sulfato de manganês em doses compreendidas entre 0,01 a 0,08 g/l favorecia a fermentação alcoólica. O consumo de açúcar foi máximo em meio nutritivo que recebeu 0,02 g/l de MnSO₄.

Os íônios magnésio, manganês ou cobalto exercem papel preponderante como ativadores do processo de fosforilação da glicose, nos estágios iniciais do processo de transformação do açúcar em álcool (14, 16).

Pelas razões expostas, nos propuzemos investigar a influência da adição de tiamina e sulfato de manganês sobre a fermentação do caldo de cana da variedade Co.290, comparativamente com tratamento em que o caldo de cana foi enriquecido com farelo de arroz. Os resultados obtidos constituem o objeto do presente trabalho.

2 — MATERIAL E MÉTODOS

O caldo de cana da variedade Co.290 foi diluído a aproximadamente 16º Brix. Ajustou-se o pH para 4,8 com ácido sulfúrico a 10%.

Foram feitos os seguintes tratamentos:

- 1 — Testemunha, caldo sem enriquecimento
- 2 — Caldo enriquecido com 1 g/l de (NH₄)₂SO₄
- 3 — Caldo enriquecido com 200 gamas/l de tiamina +
1 g/l de (NH₄)₂SO₄
- 4 — Caldo enriquecido com 0,02 g/l de MnSO₄ +
1 g/l de (NH₄)₂SO₄

5 — Caldo enriquecido com 200 gamas/l de tiamina + 0,02 g/l de $MnSO_4$ + 1 g/l de $(NH_4)_2SO_4$

6 — Caldo enriquecido com 1 g/l de farelo de arroz + 1 g/l de $(NH_4)_2SO_4$

O caldo dos diversos tratamentos foi distribuído em porções de 360 ml em Erlenmeyers de 500 ml e esterilizados durante 30 minutos a 121°C (15 lb/pol²).

Os frascos foram divididos em três blocos de doze, cada bloco compreendendo duas repetições de cada tratamento. Trabalhou-se com um bloco por semana, semeando-se de cada tratamento um frasco com a cultura F-29 e outro com a cultura F-34. As culturas utilizadas são representadas por duas estirpes diferentes de *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, da coleção do Instituto Agrônômico.

Os frascos semeados com uma alça de fermento foram mantidos durante 70 horas em estufa regulada para 30°C.

As médias dos tratamentos com igual número de repetições foram comparadas pelo teste de Tukey (2). Na comparação das médias dos tratamentos 2, 3, 4 e 5 com a de parcela perdida foi empregado o teste de Schefée (2).

3 — RESULTADOS

Os rendimentos alcoólicos obtidos para os diversos tratamentos foram os do quadro 1.

QUADRO 1.—Rendimentos alcoólicos obtidos nos diversos tratamentos do caldo de cana

| Tratamentos | 1.º Bloco | | 2.º Bloco | | 3.º Bloco | | Médias | Totais |
|-------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|-------|--------|--------|
| | F-29 | F-34 | F-29 | F-34 | F-29 | F-34 | | |
| 1 | 14,25 | 21,41 | 21,41 | 21,41 | 21,41 | 18,47 | 118,36 | 19,73 |
| 2 | 88,24 | 87,59 | 90,16 | 84,47 | 90,81 | 83,82 | 525,09 | 87,51 |
| 3 | 90,16 | 86,95 | 91,82 | 85,84 | 92,09 | 85,75 | 532,61 | 88,77 |
| 4 | 87,59 | 88,14 | 90,81 | 88,24 | 90,16 | 83,18 | 528,12 | 88,02 |
| 5 | 90,81 | 85,84 | 89,52 | 89,52 | 90,16 | 92,46 | 538,31 | 89,38 |
| 6 | 93,57 | | 86,76 | 89,25 | 94,02 | 90,16 | 535,76 | 90,48 |

No quadro 2 estão registados os resultados analíticos dos mostos antes e depois de fermentados, sendo o teor inicial de nitrogênio no caldo o seguinte:

Caldo diluído a 16º Brix 0,035%
Caldo diluído + 1 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ 0,061%

QUADRO 2.—Resultados analíticos obtidos na fermentação alcoólica nos seis diferentes tratamentos do caldo de cana-de-açúcar da variedade Co.290 (*)

| Tratamentos | Estirpes de fermento | Brix | pH | | Acidez | | Açúcares | | Alcool vol./100 | Rendimento % do teórico |
|--------------|----------------------|--------|---------|-------|---------|-------|----------|------|-----------------|-------------------------|
| | | Final | Inicial | Final | Inicial | Final | Inicial | | | |
| 1 | F-29 | 13,43 | 4,80 | 4,10 | 1,20 | 2,50 | 16,93 | 0,54 | 2,07 | 19,02 |
| 2 | F-34 | 13,31 | 4,80 | 4,10 | 1,20 | 2,35 | 16,93 | 0,54 | 2,22 | 20,43 |
| 3 | F-29 | — 0,25 | 4,80 | 3,30 | 1,20 | 5,15 | 16,93 | 0,34 | 9,76 | 89,74 |
| 4 | F-34 | 0,30 | 4,80 | 3,00 | 1,20 | 4,85 | 16,93 | 0,34 | 9,28 | 85,29 |
| 5 | F-29 | — 0,80 | 4,80 | 3,05 | 1,20 | 4,95 | 16,93 | 0,34 | 9,94 | 91,36 |
| 6 | F-34 | 0,80 | 4,80 | 3,05 | 1,20 | 5,10 | 16,93 | 0,34 | 9,88 | 86,18 |
| 7 | F-29 | — 0,48 | 4,80 | 5,00 | 1,20 | 4,80 | 16,93 | 0,55 | 9,74 | 89,52 |
| 8 | F-34 | 0,43 | 4,80 | 3,00 | 1,20 | 4,95 | 16,93 | 0,33 | 9,41 | 86,52 |
| 9 | F-29 | — 0,78 | 4,80 | 3,05 | 1,20 | 4,90 | 16,93 | 0,33 | 9,81 | 90,16 |
| 10 | F-34 | 0,15 | 4,80 | 3,05 | 1,20 | 5,10 | 16,93 | 0,14 | 9,70 | 89,27 |
| 11 | F-29 | — 1,05 | 4,80 | 2,95 | 1,20 | 5,30 | 16,93 | 0,14 | 9,95 | 91,45 |
| 12 | F-34 | — 0,10 | 4,80 | 3,10 | 1,20 | 5,40 | 16,93 | 0,94 | 9,76 | 89,71 |

(*) Médias de três repetições

Perdeu-se uma das parcelas do 1.º bloco, de modo que a análise estatística foi feita mediante a estimativa de um valor que substituiu o que deveria ser obtido nessa parcela (2).

A análise da variância para os dados do quadro 2 é a seguinte:

| Origem da variação | G. L. | Soma dos quadrados | Variância | F |
|--|-------|--------------------|-----------|---------|
| Blocos | 2 | 3,51 | 1,76 | |
| Estirpes | 1 | 49,53 | 49,53 | 7,77** |
| Diversos enriquecimentos do caldo | 5 | 23.959,89 | 4.791,98 | 75,23** |
| Experimentos x estirpes . . . | 5 | 40,11 | 8,02 | 1,25 |
| Resíduo | 21 | 133,84 | 6,37 | |
| Total | 34 | 24.186,88 | | |

4 — CONCLUSÕES

A análise estatística nos levou às seguintes conclusões:

a) Na comparação das médias dos tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 obtivemos o valor 4,55 para a diferença mínima significativa no nível de 5%. Os tratamentos 2, 3, 4 e 5 não diferiram entre si. Separou-se o tratamento n. 1 com rendimento alcoólico muito baixo. O tratamento n. 6 não difere do grupo de tratamentos 2, 3, 4 e 5.

b) A maior média se obteve com o caldo enriquecido com farelo de arroz, seguindo-se o tratamento que recebeu tiamina, sulfato de amônio e sulfato de manganês. As médias dos tratamentos em que houve adição de tiamina mais sulfato de amônio e, sulfato de manganês mais sulfato de amônio, foram praticamente iguais e um pouco mais elevadas que aquelas dos tratamentos que receberam apenas sulfato de amônio.

c) Ficou, assim, comprovado mais uma vez que o caldo de cana-de-açúcar da variedade Co.290 é deficiente em substâncias nitrogenadas indispensáveis para o bom desenvolvimento e atividade da levedura alcoólica. Em vista dos resultados obtidos, parece que a tiamina e o manganês são elementos úteis para o desenvolvimento das duas estirpes de fermento utilizadas em nossas experiências. O farelo de arroz substitui plenamente estas duas substâncias, que devem existir em quantidade suficiente para a máxima atividade do fermento neste subproduto do arroz.

d) Houve pequena diferença no comportamento das duas estirpes utilizadas, sendo a média geral dos rendimentos alcoólicos obtidos com a estirpe F-29 superior àquela obtida para a estirpe F-34.

e) O fato de têmos trabalhado com três blocos em semanas diferentes não foi significativa para o experimento.

ON THE INFLUENCE OF THIAMINE AND MANGANESE SULFATE IN THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF SUGAR CANE JUICE VAR. Co.290

SUMMARY

Experiments were carried out to evaluate the influence of the addition of thiamine and manganese sulfate in the alcoholic fermentation of the sugar cane juice var. Co. 290. The results showed an activation of the alcoholic fermentation resulting in better alcoholic yields. The addition of the two substances together resulted in better yields than those obtained from fermenting juices enriched with only one of them. Still better yields were obtained by the enrichment of the sugar cane juice with rice polishings. Rice polishings seem to be active because of their high content in thiamine and/or perhaps by the presence of other substances which are useful for the yeast nutrition and activity such as pantothenic acid and manganese.

LITERATURA CITADA

1. EHRLICH, F. Ueber die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. *Biochem. Z.* 18:391-423. 1909.
2. GOMES, F. PIMENTEL. A comparação entre médias de tratamentos na análise da variância. *Ann. Esc. Agric. Queiroz* 11:1-12. 1954.
3. ——— Curso de Estatística Experimental. I Parte — Experimentos Simples. Piracicaba, Escola Sup. de Agric. "Luiz de Queiroz", 1955. VI, 63 p.
4. HOFFMAN, C. H. The utilization of ammonium chloride by yeast. *J. industr. Engng Chem.* 9:148-151. 1917.
5. LEONIAN, L. & LILLY, V. G. The effect of vitamins on ten strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Amer. J. Bot.* 29:459-464. 1942.
6. LIMA, U. DE ALMEIDA. Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividades do *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. [Piracicaba], Instituto Zimotécnico, 1954. 54 p. (Boletim n. 8)
7. MASSART, L. & HORENS, J. L'assimilation d'azote aminé par les Levures. *Enzymologia* 15:359-361. 1953.
8. MEISENHEIMER, J. The nitrogenous substances of yeasts. *Wschr. Brau.* 32:325-326. 1915.
9. MUNTZ, J. A. The role of potassium and ammonium in alcoholic fermentation. *J. biol. Chem.* 171:653-665. 1947.
10. PASTEUR, L. Mémoire de la fermentation alcoolique. *Ann. Chim. (Phys.)* 58:323-426. 1915.
11. ROSENBERG, H. R. Chemistry and physiology of the vitamins. New York, Interscience Publishers Inc., 1942. 674 p.
12. RUDOLPH, W. Vitamine der Hefe. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M. B. H., 1948. 94 p.

13. SCHULTZ, A., ATKIN, L. & FREY, C. N. A fermentation test for vitamin B₁. J. Amer. Chem. Soc. 59:948-949. 1937.
14. SKINNER, C. E., EMMONS, C. W. & TSUCHIYA, H. M. Henrici's molds, yeasts, and actinomycets, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1948. 409 p.
15. 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.
16. SUMNER, J. B. & SOMERS, G. F. Chemistry and methods of enzymes. New York, Academic Press Inc., 1953. 462 p.
17. TEIXEIRA, C. G. & SALATI, A. A fermentação do caldo da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) var. Co. 290. Influência da adição de sais de amônio e farelo de arroz sobre o rendimento alcoólico. Bragantia 13:[157]-163. 1954.
18. 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.
19. ZELLER, H. Wirkung von Ammonsalzen auf die Hefegaerung. IV. Biochem. Z. 175:135-161. 1926.