

GERALDO CLARET DE MELLO AYRES

Engenheiro-Agrônomo

Departamento de Química

Instituto Zimotécnico, U. S. P.

**INFLUÊNCIA DE VITAMINA B₁, NUTRIENTE NITROGENADO
E ESTIRPE DE LEVEDURA SÔBRE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA DO CALDO DE CANA DE AÇÚCAR,
VARIEDADE C.P. 27/139**

Tese de Doutorado

apresentada à

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», U. S. P.

Piracicaba, Outubro de 1955.

Ed. de Heloísa

ERRATA

<u>Pág.</u>	<u>Linha</u>	<u>Onde se lê</u>	<u>Leia-se</u>
2	20	exige	exigem
2	29	hidrogenação	hidrogenação,
5	6	estudou	estudou,
6	6	em imático	enzimático
7	1a.		suprima-se esta linha
7	16	inisol	inositol
9	3	ensáio	ensaio
12	1	no	ao
19	8	balão,	balão
19	27	após à	após a
19	28	as	às
22	19	3.4.9.5	3.4.9.4
23	10	menor,	menor;
23	11	correspondente;	correspondente,
23	16	milímetro	mililitro
36	3	em 12,	em zero, 12,
46	1	n ^{os} XXIX a XXVI	n ^{os} XXIX a XXXVI
50	3	às	em
58	penúltima	repsentam	representam
72	penúltima	oficial	oficial,
73	última	realizamos	realizámos
76	5	que,	que
76	7	inóculos	inóculos,
77	11	dêsde às 12	dêsde as 12
77	13	chegamos	chegámos
77	20	XXVI	XXI
79	15	à	a
79	25	jultamente	justamente
80	1	O pH 5,60	O pH inicial de 5,60
80	9	que,	que
80	11	finais,	finais
80	12	que,	que
80	17	esperimentos	experimentos
88	7	56 - VERONA,)	56 - VERONA, O,
31	1	VII	VIII

H. de Mello Ayres

Í N D I C E

	<u>pág.</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3. 1. Generalidades	9
3. 2. Esquematização dos trabalhos	10
3. 3. Material	12
3. 3. 1. Mosto	12
3. 3. 2. Inóculos.....	13
3. 3. 2. 1. Culturas puras	13
3. 3. 2. 2. Fermento comercial	14
3. 3. 3. Nutriente nitrogenado	14
3. 3. 4. Vitamina B ₁	14
3. 4. Métodos	14
3. 4. 1. Generalidades	14
3. 4. 2. Análises do caldo de cana	15
3. 4. 3. Preparo e distribuição do mosto	15
3. 4. 4. Tratamentos	16
3. 4. 5. Preparo do inóculo	17
3. 4. 6. Inoculação	18
3. 4. 7. Amostragem	19
3. 4. 8. Análises	19
3. 4. 9. Cálculos	21
3. 4. 9. 1. Teôres de açúcares to- tais fermentescíveis ...	21
3. 4. 9. 2. Teôres alcoólicos	21
3. 4. 9. 3. Rendimento	22

3.4.9.4. Cálculo quantitativo das leveduras	22
4. RESULTADOS OBTIDOS	23
4.1. Fase II	24
4.1.1. Teôres de açúcares totais fermentescíveis e alcoólicos (quadros de nºs I a VIII)	24
4.1.2. Rendimentos (quadros de nºs IX a XVI)...	32
4.1.3. Rendimentos em média (quadros de nºs XVII a XX)	36
4.2. Fase III	38
4.2.1. Teôres de açúcares totais fermentescíveis e alcoólicos (quadros de nºs XXI a XXVIII)	38
4.2.2. Rendimentos (quadros de nºs XXIX a XXXVI)	46
4.2.3. Rendimentos em média (quadros de nºs XXXVII a XL)	50
4.3. Fase IV	52
4.3.1. Teôres de açúcares totais fermentescíveis e alcoólicos (quadros de nºs XLI a XLIV)	52
4.3.2. Rendimentos (quadros de nºs XLV a XLVIII)	56
4.3.3. Número de leveduras por balão (quadro II)	58
4.4. pH finais (quadro de nº L)	59
5. INTERPRETAÇÃO ESTATÍSTICA	60
5.1. Análise da variância	60
5.1.1. Fase II (quadros de nºs LI a LV)	60
5.1.2. Fase III (quadros de nºs LVI a LVIII)...	65
5.1.3. Fase IV (quadro de nº LIX) Contagem de leveduras	68
5.2. Comparação dos tratamentos	69
5.2.1. Fase II	69
5.2.1.1. Comparação tiamina x sulfato (quadro de nº LX)	69
5.2.1.2. Comparação sulfato x sulfato + tiamina (quadro de nº LXI)...	69
5.2.1.3. Comparação tiamina x sulfato + tiamina (quadro de nº LXII)..	69

5.2.2. Fase III	70
5.2.2.1. Comparação sulfato x tiamina (quadro de nº LXIII)	70
5.2.2.2. Comparação sulfato x sulfato + tiamina (quadro de nº LXIV)..	70
5.2.2.3. Comparação tiamina x sulfato + tiamina (quadro de nº LXV)...	70
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	71
6.1. Generalidades	71
6.1.1. Material	71
6.1.1.1. Substrato para as fermentações..	71
6.1.1.2. Substrato para o revigoramento..	72
6.1.1.3. Inóculos	72
6.1.2. Métodos	72
6.2. Fase II	73
6.3. Fase III	76
6.4. Fase IV	79
6.5. Discussão geral	79
7. CONCLUSÕES	80
8. SUMÁRIO	81
9. SUMMARY AND CONCLUSIONS	82
10. BIBLIOGRAFIA CITADA	83
11. AGRADECIMENTO	89

Edelberto J. J. J.

1. INTRODUÇÃO

O estudo, planejamento e execução d'êste trabalho a respeito da influência da vitamina B1 sôbre a fermentação alcoólica do caldo de cana foram norteados por princípios já estabelecidos pela Bioquímica e por normas elaboradas pela Tecnologia.

A Bioquímica admite como fatos cientificamente provados que:-

- a) a fermentação alcoólica no curso de seu desenrolar envolve uma série de fenômenos, entre os quais, já na fase final do processo, está a descarboxilação do ácido pirúvico a aldeído acético (Esquema de Embden-Meyrhnof-Parnas);
- b) o enzima que cataliza esta desmólise é a carboxíase;
- c) a cocarboxíase - grupamento prostético da carboxíase - é o difosfato de tiamina;
- d) a tiamina, para alguns microorganismos constitue-se em fator de crescimento;
- e) a ação fisiológica da vitamina B1 traduz-se na aceleração do processo metabólico, já que permite ou pelo menos favorece uma das reações da longa série em que se constitui a fermentação alcoólica, desde a inversão da sacarose até à formação de álcool etílico e gás carbônico;
- f) o nitrogênio desempenha papel importante no metabolismo do Saccharomyces cerevisiae H.

A indústria alcooleira constitui-se em fator relevante na economia brasileira. Corroboram esta assertiva os dados referentes à produção de aguardente, álcool etílico e álcool-motor, fornecidos pelo I.B.G.E. (17) e concernentes ao ano de 1948 e que são, respectivamente, 15.887.000, 470.000, e 633.579.000 de litros.

O volume de produção cresce continuamente, e a indústria já se desenvolve em melhores bases, racionalizando-se em técnica e organização. E, porém, um campo aberto à recepção de novos melhoramentos.

Trasladando as modernas aquisições da Bioquímica como Ciência, para a Tecnologia como Indústria, dentro de limitações impostas pela técnica industrial da fermentação alcoólica, poderemos melhorar ainda mais as condições desta florescente atividade.

Um dos motivos que nos levaram a realizar o presente trabalho é justamente este:- introduzir na técnica industrial, melhores condições visando melhor rendimento e maiores facilidades no processo fermentativo como consequências da pronunciada aceleração provocada pela ação da vitamina B₁, isolada, ou agindo simultaneamente com nutriente nitrogenado.

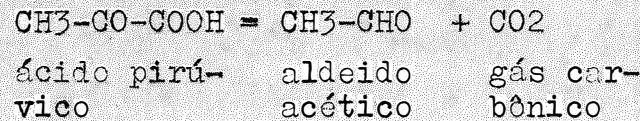
Cumpre-nos igualmente salientar como fator de estímulo ao estudo do problema, o interêsse tomado pela Cia HOFFMANN - La ROCHE S.A., que nos enviou vitaminas e fatores de crescimento em quantidades suficientes para a realização deste trabalho e para a instalação de novos experimentos, futuramente.

Por outro lado, a apresentação deste nosso trabalho para julgamento à douta Banca examinadora é motivada pela observância aos regulamentos do Instituto Zimotécnico que exige a defesa de tese, dentro dos dois primeiros anos de contrato, para efeito de obtenção do título de doutor, pelos técnicos que constituem o seu quadro de pesquisadores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Em 1910, NEUBAUER E FROMHERZ (37) sugeriram que o ácido pirúvico seria um produto intermediário na fermentação alcoólica por leveduras, e que esse mesmo ácido, por descarboxilação daria formação a acetaldeído e gás carbônico. O acetaldeído, posteriormente seria reduzido, por hidrogenação a álcool etílico.

No ano seguinte, NEUBERG e KARCZAG (38) confirmaram a idéia dos autores supra citados, quando, trabalhando com leveduras, provaram que estes microorganismos, de fato, possuem em sua estrutura celular, um enzima que catalizava a desmólise do ácido pirúvico, produzindo aldeído acético e gás carbônico, conforme a equação química:-



O enzima catalizador daquele fenômeno bioquímico seria a carboxilase.

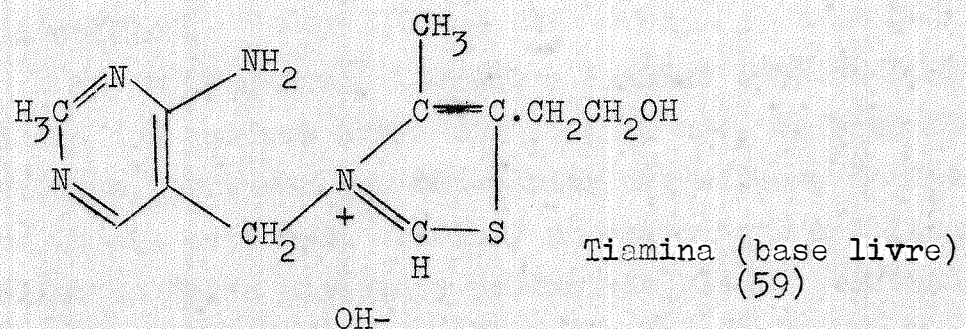
NELSON et al (36), em 1921, estudando as necessidades das leveduras, em relação a fatores nutricionais, concluíram que vitaminas do complexo B não se constituíam em metabólicos essenciais, já que os microorganismos em questão eram capazes de sintetiza-las.

HELLER (15) trabalhando com diferentes estirpes de Saccharomyces cerevisiae H. para investigação de suas necessidades vitamínicas, concordou com as observações feitas e conclusões emitidas por NELSON e colaboradores (36).

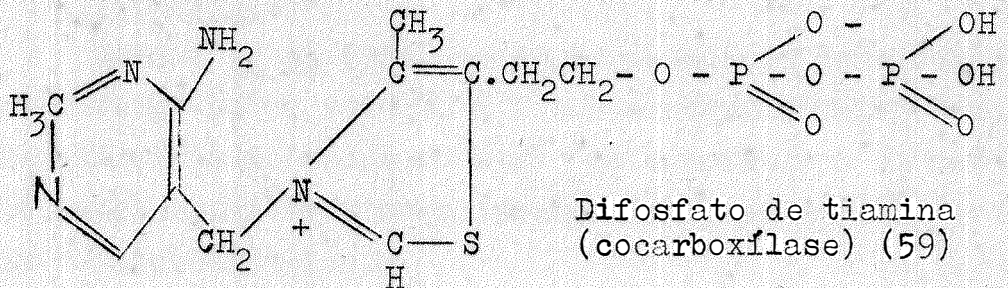
WINDAUS et al (63), em 1931, obtiveram vitamina B1, pura, extraíndo-a de leveduras, e estabeleceram sua fórmula empírica.

Foi, porém, AUHAGEN (7), em 1932, quem esclareceu importante questão a respeito da cinética da carboxilase, ao provar que este enzima necessita se completar pelo seu coenzima, para se tornar ativo, como agente catalizador da decarboxilação de certos alfa-ceto-ácidos, inclusive o ácido pirúvico. Lavando células de leveduras em tampão de fosfato alcalino, o autor removeu o coenzima do sistema carboxilase, inativando-o; e daí, emitir seu conceito sobre a organização complexa do sistema carboxilase, que seria constituído por uma parte ou núcleo protéico e por outra termo-estável, o seu coenzima.

WILLIAMS et al (62) e GREWE (14), trabalhando independentemente elucidaram a estrutura química da vitamina B1, que é uma condensação de tiazol e pirimidina:



Como que completando os trabalhos de AUHAGEN, LOHMANN e SCHUSTER (31), em 1937, conseguiram isolar o coenzima da carboxilase - a cocarboxilase - e identificaram-no quimicamente, como pirofosfato de tiamina:



Nesse mesmo ano, SCHULTZ et al (42) verificaram que a vitamina B1 acelerava sensivelmente a fermentação alcoólica.

TAUBER (47) ainda em 1937, publicou trabalhos sugerindo que, realmente, uma das funções da vitamina B1, no metabolismo dos seres vivos seria a de comportar-se como coenzima da carboxilase, após sua conversão a éster pirofosfórico, pela célula viva, pois que seria possível sintetizar-se a cocarboxilase a partir da tiamina.

STERN e HOFER (45) elaboraram, de fato, a síntese da cocarboxilase, partindo de vitamina B1, e, de acordo com outros autores, deram ao produto o significado de grupamento prostético da carboxilase.

OCHOA (39), em 1938, verificou que a adição de vitamina B1, sintética, estimulava fortemente a ação da cocarboxilase pura, e formulou a hipótese de que o grupo pirimidínico da tiamina seria o responsável por esta ativação.

Nesse mesmo ano, TAUBER (48,49,50) que continuava a pesquisar o assunto, conseguiu sintetizar quantidades apreciáveis de cocarboxilase, fosforilando a tiamina, e apresentou inclusive, métodos para a realização desta síntese.

WEIJLARD e TAUBER (57) também prepararam sinteticamente a cocarboxilase, e após identifica-la, verificaram seu comportamento bioquímico, em comparação ao produto natural, e concluíram pela igualdade entre ambas as substâncias, no concernente à função de grupamento prostético da carboxilase.

Em 1939, LIEBKNECHT (29) verificou que o difosfato de tiamina era encontrado em quantidades 10 a 20 vezes maior

res em leveduras de cervejaria do que nas de panificação; e também constatou que havia diferenças nos teores de cocarboxilase entre leveduras da mesma categoria, porém, de raças diferentes.

WEIL-MALHERBE (58) servindo-se de leveduras isentas de cocarboxilase, mediante remoção do coenzima, estudou em seguida, questões pertinentes à carboxilase. Concluiu que a adição de cocarboxilase produz vigorosa atividade descarboxiladora ao enzima, em sua desmólise do ácido pirúvico. Deduziu, ainda, que a tiamina e monofosfato de tiamina mostraram-se inativos como coenzima da carboxilase. Outra conclusão importante a que chegou o referido autor, é que o monofosfato de tiamina não é produto intermediário na síntese in vivo do difosfato de tiamina, que é realmente, o grupamento prostético da carboxilase.

Em relação às necessidades em fontes de nitrogênio, SMYTHE (44) em 1939, verificou que a asparagina e glutamina exerciam efeito estimulante sobre as leveduras, de maneira semelhante ao provocado por sais de amônio. Constatou, o autor, redução no período de indução das células pelo substrato.

ALMEIDA (1), em 1940, chamou a atenção para o importante papel desempenhado pelos nutrientes nitrogenados no metabolismo das leveduras, considerando que êsses microorganismos não conseguem absorver nitrogênio sob forma gasosa.

LIPTON e ELVEHJEM (30), pesquisando a influência da tiamina sobre o metabolismo de leveduras, concluíram que a ativação da cocarboxilase pela vitamina B1 varia em intensidade, com a raça de levedura considerada. Leveduras de panificação mostraram-se mais sensíveis que as de cervejaria à ação estimulante da aneurina. Sugeriram a existência de alguma substância, nas leveduras mais susceptíveis à ação da tiamina, que adsorveria a cocarboxilase, impedindo a ação desembaraçada do sistema carboxilase, dêste modo deficiente em coenzima; um excesso de vitamina B1 saturaria êste adsorvente, permitindo condições propícias à complementação da carboxilase pelo seu coenzima não adsorvido, resultando em consequência, um sistema enzimático completo em sua estrutura e vigoroso em atividade.

MELNIK e STERN (34), ainda em 1940, fizeram longo estudo sobre a carboxilase, e evidenciaram diversas propriedades e particularidades do enzima, obtido de células de Saccharomyces cerevisiae H. Estabeleceram em 6,10 o pH ótimo para a atividade e estabilidade da carboxilase. Mostraram, também, que traços de cobre inibem o sistema enzimático.

WESTENBRINK et al (60,61) sugeriram que o estímulo do sistema carboxilase pela tiamina, seria consequência da ação inibidora da vitamina B1 sobre a fosfatase, agente catalizador da desfosforilação da cocarboxilase.

Em 1941, GREEN, HERBUT e SUBRAHMANYAN (13) purificaram a carboxilase e estudaram suas propriedades. Definiram como unidade da atividade do enzima, a quantidade de carboxilase que cataliza a produção de 109 c mm de CO₂ em 3 minutos e a 30° C. Verificaram também que a atividade do enzima varia não apenas em relação ao pH, mas também, com a natureza e concentração da solução tampão. Os autores ainda consideraram como sendo de 100% a inibição do enzima, pela prata, cobre e mercúrio.

LASER (25) pesquisando o comportamento de diferentes leveduras em face da adição de tiamina ao substrato, verificou, à semelhança de outros autores, que os microorganismos reagiram de maneiras diversas.

Em 1942, LEONIAN e LILLY (28) concluíram, após estudos sobre o metabolismo de leveduras, que as exigências em tiamina, biotina e outras vitaminas, variaram até mesmo entre estirpes de uma única espécie. A mesma conclusão chegou BURKHOLDER (8), em 1943, que trabalhou com raças de Saccharomyces cerevisiae H.

MUNTZ (35), em 1947, averiguando a ação de íons de potássio e amônio, na fermentação alcoólica, concluiu que ambos os íons eram necessários à formação de hexoses bifosfatadas, a partir de hesose monofosfatada. Na falta ou insuficiência destes íons, a fermentação sofreu um atraso nesta fase de seu processo bioquímico.

ATKIN et al (6), em 1949, após investigarem o metabolismo de diversas leveduras, classificaram-nas em cinco grupos, segundo critério seletivo baseado em suas necessidades em fatores de crescimento. Dentre os grupamentos, salientamos aquele constituído por raças de leveduras que exigem

amos aquêles constituído por raças de leveduras que exigem no substrato, tiamina pré-formada, para poderem subsistir, além de outras vitaminas. Constituiriam, portanto, estirpes de leveduras incapazes de sintetizar a aneurina.

Em 1951, JACKSON et al (18) conseguiram isolar, dentre leveduras de cervejaria, uma estirpe, para a qual a tiamina se constituia em fator de crescimento.

LENTHARDT e NIELSEN (27), em 1952, mostraram que havia necessidade de Mg^{++} e pH 6,80 a 6,90 para um ótimo de produção de cocarboxilase pelos microorganismos.

Ainda nesse ano, RIBÉREAU-GAYON e PEYNAUD (40), ao pesquisarem a influência da tiamina em fermentações de mosto de uvas, chegaram à conclusão de que, a velocidade de fermentação aumentou pela adição ao mosto, de vitamina B1, e essa aceleração foi superior àquela provocada pela suplementação ao mosto de inositol e biotina.

SINGER e PENSKEY (43) isolaram e caracterizaram a carboxilase em 1952, e, mostraram ser de 6,30 o valor pH ótimo para o enzima apresentar atividade ideal, sob temperatura de 30° C e Mg^{++} agindo como ativador.

FRUTON e SIMMONDS (11), em 1953, relataram que a fosforilação da tiamina à cocarboxilase podia ser realizada quimicamente ou também por via enzimática, com adenosina trifosfato (ATP) funcionando como agente fosforilante.

KNUCHEL, DESHUSSES e CORBAZ (22), investigando o efeito da tiamina sobre fermentação de mosto de uvas, concluíram que a vitamina B1 acelerou a fermentação, e conduziu à formação de buquê mais agradável.

MAESEN (32), em 1953, estudou sob diversos aspectos, o quantitativo inclusive, a ação da tiamina e de sais de amônio sobre fermentação por leveduras de panificação e cervejaria, de mosto de glucose, sob pH 5,60 e em condições de anaerobiose. A adição simultânea de sais de amônio, em doses fortes, e tiamina provocou a maior aceleração, mantendo elevado o ritmo fermentativo. As doses aplicadas de sulfato de amônio foram de 0,01 a 0,1%; as de tiamina de 0,059 gamas por mililitro. Dentre as múltiplas conclusões que o trabalho permitiu deduzir, salientamos aquelas que asseguram ser a ação da tiamina sobre a fermentação por leveduras de

Edoardo G. J. res

panificação, quantitativamente relacionada com a formação de carboxilase, em presença ou ausência de sulfato de amônio, e que, a levedura de cervejaria usada no trabalho, foi auto-suficiente em suas necessidades em cocarboxilase, por isso que a adição de tiamina ao meio não alterou o aspecto da fermentação.

MASSART e HORENS (33), observaram que o sulfato de amônio, em presença de glucose, incrementou o consumo de oxigênio por levedura de cervejaria. Consideraram este aumento de consumo de oxigênio como proporcional à assimilação de nitrogênio amoniacal.

CASAS (9) e DUPUY e FLAUZI (10), em 1954, o primeiro trabalhando na produção de vinhos brancos, e os dois últimos com mosto de "grape fruit", concordaram na existência de ação aceleradora da tiamina adicionada aos mostos fermentados por leveduras.

TEIXEIRA e SALATI (51,52), trabalhando com mosto de caldo de cana de açúcar, variedade Co 290, concluíram que a adição de sais de amônio e farelo de arroz melhorou o processo fermentativo, e aumentou o rendimento alcoólico. Atribuíram a influência do farelo de arroz como consequência do seu teor em tiamina (21). Raças diferentes de leveduras apresentaram comportamentos diversos em relação à eficiência fermentativa do mosto dessa variedade de cana de açúcar.

Em 1954, TREVELYAN e HARRISON (54,55) investigaram o metabolismo de leveduras em relação ao efeito da tiamina. O estudo cinético sobre a diminuição do teor de piruvato intracelular, em relação à aplicação da vitamina B1, sugeriu que a alteração neste fenômeno bioquímico, seria consequência da maior produção de sistema carboxilase. O aumento na intensidade da ação da aneurina, aplicada em doses crescentes, até 0,1 grama por grama de levedura, não seguiu paralelamente a curva dada pelas diferentes doses de tiamina.

Elvira de Almeida Aguiar

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Generalidades

A organização dos ensaios e instalação dos experimentos foram estabelecidas de molde a permitirem ulterior análise estatística, para julgamento matemático dos resultados obtidos. Daí, a observância aos quesitos fundamentais exigidos para o desenvolvimento da análise estatística levada a efeito no transcurso dos trabalhos que constituem esta tese, a saber:

- a) repetição,
 - b) casualização,
 - c) contrôle local e
 - f) conhecimento do material trabalhado (12).
- a) Repetição:- Todos os experimentos foram repetidos uma vez.
- b) Casualização:- Sempre que possível, a casualização foi o critério adotado nas operações relacionadas aos experimentos. Assim, a ordem cronológica da realização dos ensaios, em relação ao inóculo utilizado foi estabelecida mediante sorteio; as posições dos balões na câmara de fermentação foram tomadas ao acaso, bem como a ordem na retirada das amostras.
- c) Contrôle local:- Estabelecemos condições as mais uniformes possíveis, dentro de cada parte do trabalho, de modo tal que as diferenças observadas e existentes nos resultados obtidos devem ser consequência dos tratamentos realizados e dos inóculos utilizados, que foram, em última análise, as únicas variáveis existentes.

Nos métodos analíticos, estabelecemos um "modus operandii" estandardizado, evitando inovações ou alterações nos processos utilizados, durante o transcorrer de todos os experimentos, e que pudessem carrear, ao depois, interpretações inexatas.

- d) Conhecimento do material trabalhado: - Procuramos conhecer em detalhes, as substâncias básicas utilizadas nas experiências. O nutriente nitrogenado e a vitamina B1 eram drogas puras, pró-análise; analisamos o caldo de cana utilizado de modo a defini-lo segundo suas propriedades físico-químicas; e identificamos, pelos respectivos protocolos, os mi-

croorganismos que fermentaram o mosto, no presente trabalho.

3.2. Esquematização dos trabalhos

Dividimos o nosso trabalho em partes ou etapas, cada uma delas dependendo em suas características dos resultados obtidos nas anteriores de modo à condução de sistemas experimentais e condições de trabalho as mais racionais possíveis.

A interpretação estatística, porém, para cada parte do trabalho é independente, porque precisamos alterar as condições básicas de cada etapa da tese, para melhor apreciação dos fenômenos bioquímicos ocorridos, por isso que as comparações de resultados entre diferentes condições de trabalho, são feitas sem o julgamento matemático.

O esquema geral dos trabalhos realizados em condições de laboratório é o seguinte:-

Parte I - Conhecimento e identificação do mosto trabalhado.

Parte II - Realização de fermentações nas seguintes bases:-

a) Mosto:- caldo de cana C.P. 27 / 139 com as seguintes características:

Brix = 16º

pH - 4,50

b) relação inóculo / mosto = 1:9

c) duração das fermentações: 72 horas

d) tratamentos: duas doses de vitamina B1 (0,5 e 1 mg/litro) e dose única de sulfato de amônio (0,2 g/litro)

A ordem cronológica para utilização dos inóculos, obtida mediante sorteio, para esta fase do trabalho, foi a seguinte:

Fermentação nº 1 - Fermento Fleischmann

" nº 2 - IZ 1032

" nº 3 - IZ 1035

" nº 4 - IZ 3

" nº 5 - Fermento Fleischmann

J. de Mello Aguiar

=11=

Fermentação nº 6 - IZ 1032
" nº 7 - IZ 1035
" nº 8 - IZ 3

Parte III - Realização de fermentações nas seguintes bases:

a) Mosto: caldo de cana variedade C.P. 27 / 139 com as características:-

Brix = 16º

pH = 5,60

b) relação inóculo / mosto: 1:4

c) duração das fermentações: 48 horas

d) tratamentos: dose única de tiamina (0,5 mg/litro) e dose única de sulfato de amônio (1 g/litro)

A ordem cronológica para utilização dos inóculos, por sorteio, estabeleceu a seguinte escala:

Fermentação nº 9 - Fermento Fleischmann
" nº 10 - IZ 1035
" nº 11 - IZ 1032
" nº 12 - IZ 3
" nº 13 - IZ 1035
" nº 14 - IZ 3
" nº 15 - Fermento Fleischmann
" nº 16 - IZ 1032

Parte IV - Fermentações em condições em tudo iguais às da fase III, para contagem de microorganismos (leveduras).

A ordem do uso dos inóculos, segundo sorteio realizado, foi a seguinte:

Fermentação nº 17 - IZ 3
" nº 18 - IZ 1032
" nº 19 - IZ 1035
" nº 20 - Fermento Fleischmann.

Objetivo dos trabalhos: Pesquisar a influência da vitamina B1 em diferentes doses, em relação ao sulfato de amônio, competitiva e simultaneamente, na aceleração e rendimentos das fermentações de mosto de caldo de cana, sob diferentes condições de pH, velocidade da fermentação e tipo de inóculo utilizado. Verificar se a ação da tiamina se re-

H. de Mello Aguiar

=12=

laciona apenas ao metabolismo fermentativo ou se também no processo reprodutivo.

3.3. Material

3.3.1. Mosto

Utilizamos-nos de caldo de cana de açúcar, variedade C.P. 27 / 139, cultivada em terras da Fazenda Areão, do patrimônio da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" e da Fazenda São José, integrante da organização "Société de Sucreries Brésiliennes", para as fermentações realizadas no trabalho.

Como o trabalho abrangeu, em relação à duração, um lapso de tempo de alguns meses, fermentamos mostos de cana não uniformes em sua maturação, conforme se verifica pelos resultados analíticos médios adiantes expostos:

Épocas Análise	Junho-Julho Cana não completamen te madura	Ag.-Set. Cana ma- dura(1)	Outubro Cana bem madura	Médias
Brix	19,22	20,10	20,30	19,87
Densidade	1,07938	1,08335	1,00420	1,08231
Pol	14,65	16,85	17,14	16,21
Pureza	76,22	83,83	84,43	81,52
Redutores(g/%)	1,98	1,08	0,87	1,31
Sacarose real	19,67	19,78	20,01	19,82
Açúcares totais fermentescíveis (g/%)	22,63	21,84	21,88	22,12
Acidês sulfúri- ca $\frac{1}{100}$ %	0,5390	0,4410	0,4410	0,4736
pH	5,40	5,60	5,60	5,53
Cinzas	0,20	0,15	0,15	0,17
Coeficiente glucósico	10,06	5,46	4,34	6,62
Não açúcares	4,57	3,25	3,16	3,66
Açúcar provável	12,822	15,550	15,876	14,747

3.3.2. Inóculos

Estudamos o comportamento de diferentes raças de leveduras em resposta à adição de tiamina e sulfato de amônio ao mosto.

Paralelamente aos ensaios realizados com microorganismos oriundos de culturas puras (4), observamos também o comportamento de fermento Fleischmann.

3.2.2.1. Culturas puras

IZ 1032 - Saccharomyces cerevisiae H. - isolado em Piracicaba, e mantido em meio sólido de levedura autolizada e glucose, em temperatura ambiente.

IZ 3 - Saccharomyces cerevisiae H. - originário da coleção do Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, U.S.A., sob nº Y 132. Mantido na micoteca do Instituto Zimotécnico em meio sólido de batata-dextrose-agar, sob temperatura ambiente.

IZ - 1035 - Suspensão de leveduras, mantida sob temperatura ambiente, em meio líquido de levedura autolizada e glucose, originária do Instituto Agrônomo de Campinas, São Paulo, e classificada como fermento de aguardente. A suspensão, catalogada em sua origem, como IAC (F 1, F 2, F29 e F 34) apresentava a seguinte ficha de identificação:

F 1 - Saccharomyces cerevisiae H. - fermento da coleção do NRRL, Peoria, Illinois, U.S.A. sob nº Y 132. Coleção da Seagram SC 206.

F 2 - Saccharomyces cerevisiae H. - fermento utilizado na destilaria Seagram, com ótimos resultados na fermentação de mosto de mandioca.

F 29 - Saccharomyces cerevisiae H. - fermento utilizado na fermentação de melaço, em Java. (Java molasses yeast - American Type Culture Collection nº 4125). Coleção da Seagram SC 90.

F 34 - Saccharomyces cerevisiae H. - estirpe de "Magne" para a fermentação comercial de melaço, da American Type Culture Collection nº 4132. Coleção da Seagram SC 84.

J. S. de Almeida

3.3.2.2. Fermento comercial

Utilizamos-nos diretamente do fermento prensado Fleischmann, fresco, adquirido imediatamente antes de seu emprego.

3.3.3 Nutriente nitrogenado

Empregamos o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio adicional às leveduras. Utilizamos-nos do sal marca "Mallindckrodt", puro, pró-análise.

Fizemos soluções de concentrações calculadas, em água esterilizada, de modo a realizarmos a adição do sulfato de amônio volumetricamente medido em pipeta. Dissolvemos 20 gramas do sal em água e completamos o volume a 100 ml, o que nos permitiu obter, em 1 ml da solução, 0,2 g e em 5 ml, 1 grama de sulfato de amônio.

3.3.4. Vitamina B1

Servimo-nos do cloreto de tiamina, gentilmente enviado pela Cia. Hoffmann-La Roche para a realização deste trabalho.

Imediatamente antes do seu uso, fizemos soluções aquosas da vitamina, em concentrações calculadas. Dissolvemos 50 mg da vitamina B1 em água esterilizada e completamos o volume a 100 ml; 1 ml da sol. continha 0,5 mg e 2 ml continham 1 mg da tiamina.

3.4. Métodos

3.4.1. Generalidades

Realizamos tôdas as fermentações em condições de laboratório.

Pequeno volume de mosto, fermentações lentas e assepsia no transcorrer de todo o trabalho são as características que escolhemos para definir a condição de trabalho em laboratório, afora os detalhes inerentes a esta forma de se conduzir as experiências.

Volume de mosto:- Estabelecemos em um litro o vo-

Georgette Gypes

=15=

lume individual de mosto inoculado. Com esta finalidade fixamos em 100:900 e 200:800ml as relações inóculo / mosto para respectivamente as II, III e IV fases do trabalho, conforme detalhamos em 3.2. Estas relações permitiram o cálculo das aplicações de vitamina e nutriente nitrogenado em respectivamente miligrama e grama por litro.

Duração das fermentações:- As relações inóculo / mosto, supra mencionadas traduziram-se em fermentações lentas, de duração ao redor de 72 e 48 horas, respectivamente, o que nos permitiu bom número de análises intermediárias, no transcorrer das fermentações.

Assepsia:- Preocupamo-nos, sempre, em seguir as normas usuais em laboratório, no concernente à assepsia, em tôdas as operações do trabalho.

3.4.2. Análises do caldo de cana

Realizamos análises no mosto, conforme métodos analíticos preconizados por Almeida (1) e LEME Jr. (26), antes da correção do mosto em relação a pH e grau Brix e da esterilização, para podermos caracterizar as propriedades físico-químicas do caldo de cana variedade C.P. 27 / 139, antes da autoclavagem e in natura.

3.4.3. Preparo e distribuição do mosto

Obtivemos o caldo moendo as canas recém cortadas, nas instalações da 8a. Cadeira - Tecnologia Agrícola - da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Após coarmos o caldo verificamos o grau Brix. No caso do areômetro acusar leitura superior a 16º, corrigimo-lo para esse valor, mediante adição suficiente de água destilada.

Corrigimos o pH do caldo, após acertado o Brix, para 4,50 e 5,60, respectivamente, com ácido sulfúrico N e soda N para as diferentes fases do trabalho, de acordo com as condições estabelecidas. Utilizamos-nos de potenciômetro para leitura dos valores pH.

Distribuimos o mosto em:

H. M. O. A. O.

=16=

- a) balões "Pyrex", de fundo chato, de 2 litros de capacidade, recebendo cada um, exatamente 900 ml (para a parte II do trabalho), e 800 ml (para as partes III e IV), medidos em proveta graduada de 1.000 ml. Pérolas de vidro foram colocadas no interior dos balões para efeito mecânico na agitação dos mesmos, quando da retirada das amostras. Estes balões destinaram-se às fermentações propriamente ditas;
- b) frascos kitassato de 2 litros de capacidade, providos de tubos de borracha na saída lateral, dotada de pinça de Hofmann, recebendo cada um deles 1000 ml ou 900 ml do mosto, respectivamente, para a aeração de inóculos de fermento Fleischmann e para o arejamento daqueles oriundos de culturas puras;
- c) balões de 500 ml de capacidade, com aproximadamente 200 ml de mosto, para permitir a dosagem de açúcares totais fermentescíveis no mosto autoclavado e antes da inoculação.

Todos os frascos foram tamponados com algodão, recobertos individualmente com papel manilha e esterilizados em autoclave, durante 30 minutos sob pressão de 0,8 atm e temperatura de 115°.

Cada série de fermentações (chamaremos de série, uma coleção de balões com as mesmas características básicas no mosto, com os respectivos tratamentos, e para um determinado inóculo) compõe-se portanto, do seguinte:

- a) 1 balão pequeno, com mosto autoclavado, para análise do teor de açúcares totais fermentescíveis antes da inoculação;
- b) 1 frasco kitassato para aeração do inóculo;
- c) balões fermentadores (6 para a parte II e 4 para as partes III e IV).

3.4.4. Tratamentos

Com pipetas esterilizadas fizemos as adições de sulfato de amônio e tiamina nos balões, após autoclavagem.

Os balões receberam os seguintes tratamentos:-

a) Parte II:

Balão nº 1 - Testemunha

" nº 2 - Sulfato de amônio (0,2 g/litro)

" nº 3 - Tiamina (0,5 mg/litro)

Edelberto Ayres

=17=

Balão nº 4 - Tiamina (0,5 mg/litro) + Sulfato de amônio
(0,2 g/litro)

" nº 5 - Tiamina (1 mg/litro)

" nº 6 - Tiamina (1 mg/litro) + Sulfato de amônio
(0,2 g/litro)

b) Partes III e IV

Balão nº 1 - Testemunha

" nº 2 - Sulfato de amônio (1 g/litro)

" nº 3 - Tiamina (0,5 mg/litro)

" nº 4 - Tiamina (0,5 mg/litro) + Sulfato de amônio
(1 g/litro)

3.4.5. Preparo do inóculo

Distinguimos duas fases no preparo dos inóculos provenientes de culturas puras (IZ 3, IZ 1032 e IZ 1035), a saber:-

a) revigoração da levedura;

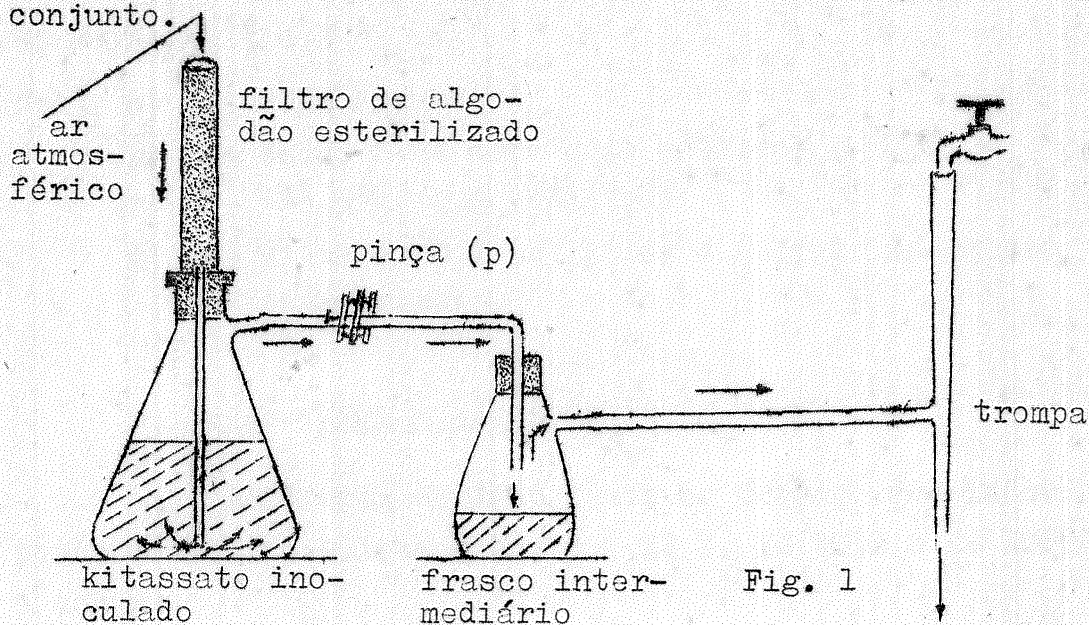
b) multiplicação celular com arejamento.

Quando trabalhamos com fermento Fleischmann, apenas executamos a segunda fase.

a) Revigoração:- O revigoração das culturas foi realizado nas dependências e por Técnicos do Departamento de Microbiologia do Instituto Zimotécnico. As operações foram as seguintes: - uma alça de platina da cultura pura, da micoteca do I.Z., nos casos das leveduras IZ 3 e IZ 1032, e 1 ml da suspensão de leveduras IZ 1035 foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 ml de malte líquido, 96 horas antes do arejamento programado. Processou-se incubação por 48 horas, em estufa a 27° C. Findo êste prazo, o conteúdo total do tubo, após agitação foi transferido para frasco Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, e contendo 125 ml de malte líquido. Novamente incubação a 27° C durante 48 horas. Após êsse período de tempo, dávamos por finda a fase de revigoração da levedura.

b) Arejamento:- Vertemos o conteúdo da cultura revigorada, do Erlenmeyer, para balão kitassato preparado conforme detalhamos em 3.4.4. Tamponamos o kitassato com rolinha de borracha atravessada por filtro de algodão esterili-

zado. Ligamos a saída lateral do kitassato a frasco intermediário, por meio do tubo de borracha, e este último à trompa de vácuo, adaptada em torneira de água corrente. Somente após pleno funcionamento da trompa, é que abrimos a pinça (p) fig. 1, assegurando, desta maneira, assepsia ao conjunto.



Realizamos a aeração durante 24 horas, tempo suficiente para obtenção de bom desenvolvimento reprodutivo das células de levedura. O arejamento processou-se em câmara de fermentação com aproximadamente 18 metros cúbicos, sob temperatura regulada para 27° C.

No preparo do inóculo de fermento Fleischmann, conforme dissemos, partimos diretamente da fase de aeração. Vinte gramas do fermento comercial, recentemente adquirido foram suspensas em 1000 ml de caldo existentes no kitassato adrede preparado e realizamos imediatamente a aeração, como nos casos relacionados às culturas puras.

3.4.6. Inoculação

Decorridas as 24 horas de arejamento inoculamos os balões fermentadores.

Após agitação do kitassato, para homogeneização do conteúdo, medimos 100 e 200 ml do inóculo, adicionando-os aos balões que compunham as diversas séries de fermentações, conforme pertencentes à fase II ou às fases III e IV do tra-

H. de Sá

balho.

Frascos Erlenmeyers, marcados para 100 e 200 ml, secos, em estufa, tamponados com algodão, envoltos em papel manilha e esterilizados em estufa a 150° C, durante uma hora, serviram de medida para a obtenção de volumes iguais de inóculos, para os diversos balões. Conferimos, desta maneira, o quanto possível, igual número de células a todos os balões componentes de uma mesma série. A inoculação de cada balão, exigiu um frasco-medida individual, o que nos permitiu assegurar a máxima assepsia na operação.

Uma vez inoculados, conservamos os balões em câmara de fermentação sob temperatura de 27° C.

3.4.7. Amostragem

Retiramos amostras do mosto inoculado de 12 em 12 horas, a partir de zero hora até o final das fermentações, o que ocorreu por volta de 72 horas naquelas em que a relação inóculo / mosto foi de 1:9 e, ao redor de 48 horas, naquelas em que essa relação foi de 1:4.

De cada balão, nas horas estabelecidas, após agitação dos mesmos, para uniformização do meio, retiramos aproximadamente 140 ml do conteúdo quando da operação referente às séries de fermentações da fase II e 200 ml dos balões das séries concernentes às fases III e IV do trabalho.

Frascos Erlenmeyers, secos em estufa, receberam, por derramamento, à proteção de bico de gás, as alíquotas dos balões.

Imediatamente após à coleta das amostras, procedemos as análises.

3.4.8. Análises

As análises foram realizadas em relação aos teores de açúcares totais fermentescíveis, expressos em glicose, pelo método de Eynon-Lane(5,24), e em relação aos teores alcoólicos existentes nos momentos de retirada das amostras, até o final das fermentações, quando praticamente todo

o açúcar do mosto já fôra metabolizado, pelo método Salleron (1).

As alíquotas foram coadas em peneira de malha fina, homogeneizadas e divididas em duas porções: - uma constituída de 100 ml, medidos em balão graduado de 100 ml, foi destinada à destilação, para análise do teor alcoólico; a outra foi usada para as dosagens de açúcares totais fermentescíveis, pipetada e diluída conforme as necessidades impostas pelos limites do método (5).

Nas amostras finais, além das análises para açúcares e teores alcoólicos, também medimos o pH dos vinhos, em potenciômetro.

Nas fermentações correspondentes à fase IV - com a finalidade de investigarmos sob aspecto quantitativo, a flora existente nos mostos - além das análises iniciais, intermediárias e finais para açúcares e teores alcoólicos, fizemos contagens das leveduras. Imediatamente após a dosagem por Eynon-Lane (5) acusar zero por cento de açúcares no mosto, ou decorridas 48 horas para as fermentações mais lentas, mas, em vias de paralização, retiramos as amostras para aplicação do método analítico para a contagem dos microorganismos (53).

Após agitação dos balões, para homogeneização do conteúdo, retiramos amostras que foram coadas em condições assépticas, por intermédio de frascos Erlenmeyers dotados de peneira de pano de algodão e esterilizados a seco. Diluímos um ml do filtrado, conforme os requisitos do método, fizemos as diluições sucessivas e inoculamos, para cada grau de diluição, placas de Petri em duplicata. Utilizamos meio de malte como substrato nas caixas de Petri, para o desenvolvimento e posterior contagem das colônias de leveduras.

Todos os dados obtidos, bem como as condições e características de que se revestiram as diferentes séries de fermentações, foram anotadas em fichas-protocolo

3.4.9. Cálculos

3.4.9.1. Teôres de açúcares totais fermentescíveis

Apresentando o protocolo as diluições feitas, as leituras das quantidades gastas da solução contendo redutores necessárias para reduzir o cobre do licor de Soxhlet e o título do licor, fizemos os cálculos para a obtenção dos teôres de açúcares totais fermentescíveis encontrados no início, transcurso e final das fermentações.

Os teôres de açúcares existentes em zero hora nos permitiram calcular os teôres alcoólicos possíveis de serem conseguidos, e que serviram de base para os cálculos dos rendimentos apresentados pelas fermentações, em todos os momentos das análises.

Os teôres de açúcares totais fermentescíveis calculados no transcorrer das fermentações, por diferença com os teôres existentes em zero hora, serviram de base para cálculo dos teôres alcoólicos possíveis de existir, em relação ao açúcar consumido e percentagem de álcool existente em zero hora. Estes cálculos controlaram os teôres alcoólicos obtidos nas dosagens dos mesmos.

3.4.9.2. Teôres alcoólicos

Fizemos as determinações dos teôres alcoólicos nas amostras iniciais, intermediárias e finais, por densidade, e em balança "Fischer".

As densidades procuramos na tabela oferecida por ALMEIDA (1) suas correspondências em álcool, dadas por cento e por volume, em relação à água destilada a 15° C, temperatura em que estabelecemos o equilíbrio na balança hidrostática.

No protocolo, assinalamos as densidades obtidas, os teôres alcoólicos possíveis e os teôres alcoólicos realmente encontrados nos destilados.

3.4.9.3. Rendimentos

Calculamos os rendimentos alcoólicos apresentados pelas fermentações, em por cento do ideal, conforme estabeleceu ALMEIDA (1), partindo da clássica equação de Gay-Lussac:



Os balões inoculados, em zero hora, já apresentavam teores alcoólicos, trazidos pelo inóculo, visto que o efeito Pasteur não foi 100% obtido nas aerações. Estas percentagens de álcool precisaram ser levadas em conta, nos cálculos dos rendimentos. Então, uma vez calculados os teores alcoólicos possíveis, em relação ao açúcar inicial, ao produto adicionamos os teores alcoólicos encontrados em zero hora. Os totais seriam os rendimentos alcoólicos ideais, produzidos se todo o açúcar do mosto fôsse transformado exclusivamente em álcool etílico e gás carbônico. Relacionamos êstes totais a 100; os teores alcoólicos encontrados, nas análises das amostras, por regra de três nos forneceram os rendimentos por cento do ideal, das fermentações.

3.4.9.5. Cálculo quantitativo das leveduras

Visto o método das diluições em placa ser baseado em progressão geométrica, cuja razão é 10, uma vez estabelecida a diluição menor ($1:10^6$), as seguintes foram: $1:10^7$ e $1:10^8$.

Para o cálculo do número de leveduras, por balão, usamos as fórmulas:

$$N = \frac{p + q + r}{1 + \frac{1}{10} + \frac{1}{100}} \times 10^6 \text{ que, simplificada será}$$

$$N = \frac{p + q + r}{1,11} \times 10^6 \quad (\text{fórmula I}) \text{ e}$$

$$N (\text{média}) = \frac{N + M}{2} \quad (\text{fórmula II})$$

, em que:

N = número de microorganismos existentes por ml de vinho;

p = número de colônias da placa com a menor diluição;

q = número de colônias da placa de diluição média;

r = número de colônias da placa de diluição maior;

N(média) = média aritmética das duplicatas em relação às placas;

N = quantidade de colônias calculadas em uma série, pela fórmula I;

M = quantidade de colônias calculadas na série duplicata, pela fórmula I.

O valor 10^6 corresponde à diluição menor, visto considerarmos 1 o seu numerador correspondente; os numeradores para as duas diluições subseqüentes serão, então, o inverso de suas diluições isto é 1/10 e 1/100.

Considerando como constante o valor 10^6 os resultados devem ser ou multiplicados por 1.000.000 ou considerados como expressando milhões de leveduras por milímetro dos vinhos analisados.

4. RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos das fermentações realizadas, em relação às quantidades de açúcares totais fermentescíveis, aos teores alcoólicos, rendimentos, e pH, foram inseridos em quadros, de maneira a condensar a visualização dos referidos valores, possibilitando melhor apreciação entre os dados analíticos dos diferentes tratamentos.

Apresentamos todos os dados necessários e suficientes para suportarem análise estatística, em tôdas as fases do trabalho.

J. S. de Oliveira

=25=

QUADRO II

Série de fermentações nº 2
Inóculo:- IZ 1032 (Piracicaba)

Teores de açúcares totais fermentescíveis em g/%

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	16,98	16,98	16,98	16,98	16,98	16,98
12	14,87	14,67	14,91	14,67	14,63	14,51
24	10,44	10,08	9,89	9,50	9,94	9,57
36	7,10	6,34	6,50	5,47	6,26	5,51
48	4,10	3,09	3,45	2,43	3,41	2,43
60	2,05	1,12	1,64	0,76	1,54	0,78
72	0,87	0,32	0,72	0,33	0,70	0,30

Teores alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
12	1,48	1,48	1,41	1,41	1,60	
24	3,57	3,57	3,85	3,85	3,85	4,29
36	5,63	5,94	5,78	6,31	6,01	6,09
48	7,24	8,40	8,08	8,57	8,15	8,40
60	9,15	9,83	9,41	9,74	9,23	9,74
72	9,63	9,91	9,91	10,08	9,83	10,00

QUADRO III

Série de fermentações nº 3
Inóculo:- IZ 1035 (Campinas)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis em g/%

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	16,92	16,92	16,92	16,92	16,92	16,92
12	15,54	15,44	15,16	15,47	15,34	15,23
24	11,60	11,61	11,30	11,26	11,44	11,24
36	9,01	8,85	8,24	7,97	8,30	7,94
48	6,43	5,85	5,49	4,86	5,41	4,77
60	4,17	3,33	3,06	2,21	2,94	2,22
72	2,20	1,41	1,14	0,72	1,12	0,66

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73	0,73
12	1,34	1,34	1,41	1,41	1,34	1,48
24	2,99	2,72	3,07	3,42	3,42	3,42
36	4,95	5,10	5,10	5,56	5,17	5,32
48	6,31	6,62	7,32	7,67	7,24	7,40
60	8,08	8,23	8,73	9,06	8,82	8,99
72	9,63	9,74	10,08	10,24	9,83	10,34

QUADRO IV

Série de fermentações nº 4
Inóculo:- IZ 3 (Peoria)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis em g/%

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	16,98	16,98	16,98	16,98	16,98	16,98
12	15,25	14,95	15,04	14,95	14,91	14,91
24	10,74	10,71	10,09	9,81	9,90	9,77
36	7,50	6,44	5,85	4,95	5,62	5,09
48	3,88	3,14	2,04	1,50	2,34	1,53
60	1,75	1,12	0,69	0,27	0,60	0,30
72	0,52	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
12	1,34	1,41	1,48	1,41	1,54	1,34
24	3,49	3,63	4,07	4,07	4,07	
36	5,78	6,31	6,62	7,09	7,09	6,70
48	7,91	8,15	8,64	8,99	8,73	8,82
60	8,90	9,49	9,74	9,63	9,83	9,83
72	10,17	10,17	10,43	10,17	10,17	9,91

Le de Mello Ayres

=28=

QUADRO V

Série de fermentações nº 5
Inóculo:- Fermento Fleischmann

Teóres de açúcares totais fermentescíveis (g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	14,02	14,02	14,02	14,02	14,02	14,02
12	12,13	12,00	11,86	11,93	11,86	11,80
24	8,20	7,52	7,86	7,10	8,00	7,27
36	5,46	4,73	5,18	4,06	5,33	4,13
48	3,04	2,03	2,67	1,51	2,67	1,57
60	1,47	0,83	1,14	0,43	1,20	0,46
72	0,44	0,00	0,33	0,00	0,35	0,00

Teóres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
12	1,41	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
24	3,70	3,78	3,85	4,07	3,85	4,14
36	4,95	5,63	5,39	6,31	5,48	6,01
48	6,78	7,51	7,09	7,67	7,02	7,40
60	7,51	7,83	7,58	7,99	7,47	8,08
72	8,23	8,15	8,23	8,23	8,15	8,23

QUADRO VI

Série de fermentações nº 6
Inóculo:- IZ 1032 (Piracicaba)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis (g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	15,79	15,79	15,79	15,79	15,79	15,79
12	12,98	12,81	12,98	12,73	12,92	12,89
24	9,43	8,75	8,94	8,50	8,94	8,55
36	6,96	5,85	6,62	5,40	6,42	5,37
48	4,44	3,00	4,01	2,69	3,75	2,69
60	2,62	1,38	2,08	1,13	2,06	1,11
72	1,17	0,48	0,92	0,38	0,88	0,36

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53	0,53
12	1,28	1,89	1,48	1,89	1,68	1,89
24	3,49	4,07	3,78	4,21	3,70	4,21
36	5,56	5,94	5,63	6,38	5,70	6,23
48	7,24	7,47	7,24	8,08	7,24	7,99
60	8,23	8,99	8,48	8,90	8,48	8,73
72	8,73	9,49	9,23	9,83	9,15	9,63

João de Melo e Silva

=30=

QUADRO VII

Série de fermentações nº 7
Inóculo:- IZ 1035 (Campinas)

Teóres de açúcares totais fermentescíveis (g/%)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	16,10	16,10	16,10	16,10	16,10	16,10
12	13,33	13,25	13,34	13,33	13,30	13,54
24	9,53	8,96	9,07	8,53	8,97	8,34
36	6,08	5,16	5,65	5,05	5,72	4,68
48	3,21	2,21	2,69	1,73	2,70	1,74
60	1,54	0,66	1,01	0,47	0,92	0,48
72	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Teóres alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
12	1,41	1,48	1,62	1,54	1,62	1,41
24	3,34	3,93	3,70	4,72	4,14	4,80
36	5,78	6,31	6,01	6,70	6,09	6,93
48	7,91	8,40	8,08	8,73	7,99	8,73
60	8,99	9,15	9,06	9,32	9,15	9,32
72	9,63	9,63	9,74	9,74	9,63	9,74

F. de M. P. de S.

QUADRO VII

Série de fermentações nº 8
Inóculo:- IZ 3 (Peônia)

Teóres de açúcares totais fermentescíveis em g/%

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	15,88	15,88	15,88	15,88	15,88	15,88
12	13,33	13,33	13,17	13,29	13,29	13,41
24	8,88	8,01	8,40	7,44	8,31	7,39
36	5,34	4,05	4,88	3,71	5,15	3,66
48	2,72	1,46	2,29	1,16	2,29	1,14
60	1,02	0,49	0,72	0,36	0,74	0,35
72	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Teóres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
12	1,41	1,28	1,28	1,14	1,20	1,14
24	4,14	4,50	4,21	4,50	4,07	4,50
36	5,70	6,46	6,09	6,54	6,01	6,54
48	7,91	8,15	7,99	8,15	8,08	8,15
60	8,64	8,90	8,90	8,99	8,82	8,99
72	8,90	8,99	9,06	9,06	8,99	9,06

G. de S. S. S. S. S.

38

4.1.2. Quadros de nºs IX a XVI

Rendimentos - expressos em % do ideal - das fermentações, em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas (final), para cada inóculo utilização e respectivos tratamentos.

QUADRO IX

Série de fermentações nº 1
Inóculo:- Fermento Fleischmann

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 0,5 mg/l		Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 1 mg/l	
		Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 1 mg/l		
0	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75	7,75
12	20,25	20,93	20,25	20,93	20,25	20,93	20,25	21,60	20,25
24	40,79	45,05	42,15	47,18	42,82	47,18	42,82	47,18	42,82
36	56,78	61,14	59,59	64,92	60,36	64,92	60,36	64,92	60,36
48	74,32	78,29	76,64	79,74	77,42	79,74	77,42	80,52	77,42
60	82,17	85,46	83,72	85,46	84,59	85,46	84,59	86,24	84,59
72	87,06	87,06	87,06	87,06	87,06	87,06	87,06	87,73	87,06

QUADRO X - Série de fermentações nº 2

Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 0,5 mg/l		Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 1 mg/l	
		Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 1 mg/l		
0	3,44	3,44	3,44	3,44	3,44	3,44	3,44	3,44	3,44
12	13,08	13,08	12,46	12,46	14,85	13,08	12,46	14,85	14,85
24	31,56	31,56	34,04	34,04	34,04	37,93	34,04	37,93	34,04
36	49,77	52,52	51,10	55,79	53,13	53,84	53,13	53,84	53,13
48	64,01	74,27	71,44	75,77	72,05	74,27	72,05	74,27	72,05
60	80,90	86,91	83,20	86,11	81,60	86,11	81,60	86,11	81,60
72	85,14	87,62	87,62	89,12	86,91	88,50	86,91	88,50	86,91

A. S. S. S. S.

QUADRO XI

Série de fermentações nº 3
Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	6,29	6,29	6,29	6,29	6,29	6,29
12	11,54	11,54	12,13	12,13	11,54	12,74
24	25,75	23,42	26,44	29,45	29,45	29,45
36	42,63	43,92	43,92	47,88	44,53	45,81
48	54,34	57,01	63,06	66,06	62,36	63,73
60	69,59	70,88	75,19	78,03	75,97	77,43
72	82,82	83,85	86,78	88,16	84,63	89,02

QUADRO XII - Série de fermentações nº 4

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20
12	11,63	12,23	12,84	12,23	13,37	11,63
24	30,28	31,51	35,32	35,32	35,32	
36	50,17	54,76	57,46	61,54	61,54	58,16
48	68,66	70,74	75,00	78,03	75,78	76,58
60	77,25	82,38	84,54	83,59	85,33	85,33
72	88,28	88,28	90,53	88,28	88,28	86,02

J. S. de Sá

=34=

QUADRO XIII

Série de fermentações nº 5
Inóculo:- Fermento Fleischmann

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 0,5 mg/l		Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l	
		Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	6,23	6,23	6,23	6,23	6,23	6,23	6,23
12	14,65	18,08	18,08	18,08	18,08	18,08	18,08
24	38,46	39,29	40,02	42,30	40,02	43,03	43,03
36	51,45	58,52	56,02	65,59	57,97	62,47	62,47
48	70,47	78,06	73,70	79,72	72,97	76,92	76,92
60	78,06	81,39	78,79	83,05	77,65	83,98	83,98
72	85,56	84,72	85,56	85,56	84,72	85,56	85,56

QUADRO XIV

Série de fermentações nº 6
Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 0,2 g/l		Tiamina 0,5 mg/l		Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l	
		Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96
12	11,98	17,69	13,95	17,69	13,95	17,69	17,69
24	32,67	38,10	35,39	39,41	34,64	39,41	39,41
36	52,15	55,61	52,71	59,73	53,37	58,33	58,33
48	67,79	69,94	67,79	75,65	67,79	74,81	74,81
60	70,50	84,17	79,40	83,33	79,40	81,61	81,61
72	81,71	88,24	86,39	92,00	85,72	90,13	90,13

QUADRO XV

Série de fermentações nº 7

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio		Tiamina	
		0,2 g/l	0,5 mg/l	0,2 g/l	1 mg/l
0	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63
12	13,12	13,71	15,08	14,33	15,08
24	31,00	36,59	34,45	43,94	38,54
36	53,81	58,75	55,96	62,38	56,70
48	73,64	78,21	75,23	81,28	74,39
60	83,70	85,19	84,35	86,77	85,19
72	89,59	89,59	90,62	90,62	89,59

QUADRO XVI

Série de fermentações nº 8

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação
(% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio		Tiamina	
		0,2 g/l	0,5 mg/l	0,2 g/l	1 mg/l
0	1,16	1,16	1,16	1,16	1,16
12	13,64	12,39	12,39	11,03	11,61
24	40,07	43,56	40,75	43,56	39,39
36	55,17	62,53	58,95	63,32	58,17
48	76,57	78,89	77,34	78,89	78,21
60	83,63	86,09	86,09	87,00	85,37
72	86,13	87,00	87,67	87,67	87,00

4.1.3. Quadros de nºs XVII a XX

Médias dos 2 rendimentos obtidos para cada inóculo utilizado, em seus diferentes tratamentos, em 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas (final) das fermentações.

QUADRO XVII

Inóculo:- Fermento Fleischmann

Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações, para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio	Tiamina	Sulfato amônio	Tiamina	Sulfato amônio
		0,2 g/l	0,5 mg/l	0,2 g/l	1 mg/l	0,2 g/l
0	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99	6,99
12	17,45	19,50	19,16	19,50	19,16	19,84
24	39,62	42,17	41,08	44,74	41,42	45,10
36	54,11	59,83	52,80	65,25	59,16	63,69
48	72,39	78,17	75,17	79,73	75,19	78,42
60	80,11	83,42	81,25	84,25	81,12	85,11
72	86,31	85,59	86,31	86,31	85,89	86,64

QUADRO XVIII

Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações, para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio	Tiamina	Sulfato amônio	Tiamina	Sulfato amônio
		0,2 g/l	0,5 mg/l	0,2 g/l	1 mg/l	0,2 g/l
0	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20	4,20
12	12,53	15,38	13,20	15,07	14,40	17,69
24	32,21	34,83	34,71	36,72	34,34	38,67
36	50,96	54,06	51,90	57,76	53,25	56,08
48	65,90	72,10	69,91	75,71	69,92	74,54
60	75,70	85,49	81,30	84,72	80,50	83,83
72	83,42	87,93	87,00	90,56	86,31	89,31

QUADRO XIX

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações, para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
●	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96	4,96
12	12,33	12,62	13,60	13,23	13,31	12,93
24	28,37	30,00	30,44	36,69	33,99	37,07
36	48,22	51,33	49,44	55,13	50,61	55,21
48	63,99	67,61	69,14	73,62	68,37	72,50
60	76,64	78,03	79,77	82,40	80,58	82,10
72	86,20	86,72	88,70	89,39	87,11	89,82

QUADRO XX

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações, para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 1 mg/l	Sulfato amônio 0,2 g/l Tiamina 1 mg/l
0	3,18	3,18	3,18	3,18	3,18	3,18
12	12,63	12,31	12,61	11,63	12,49	11,33
24	35,17	37,53	38,03	39,44	37,35	
36	52,67	58,64	58,20	62,43	59,85	60,74
48	72,61	74,81	76,17	78,46	76,99	77,73
60	80,44	84,23	85,31	85,29	85,35	86,16
72	87,20	87,64	89,10	87,97	87,64	86,68

Le Sello Reyes

=38=

4.2. Fase III

4.2.1. Quadros de nºs XXI a XXVIII

Quantidades de açúcares totais fermentescíveis e de teôres alcoólicos, encontrados nas fermentações relacionadas aos diversos inóculos e tratamentos, às zero, 12, 24, 36 e 48 horas (final).

QUADRO XXI

Série de fermentações nº 9

Inóculo:- Fermento Fleischmann

Teôres de açúcares totais fermentescíveis
g/%

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	13,77	13,77	13,77	13,77
12	9,23	8,12	8,64	7,17
24	4,61	1,80	3,80	0,82
36	1,34	0,00	0,87	0,00
48	0,00	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	1,34	1,34	1,34	1,34
12	3,78	4,35	4,29	4,87
24	6,46	7,83	6,78	8,73
36	7,99	8,82	8,40	9,15
48	9,32	9,41	9,32	9,32

Agostinho Aguiar

=39=

2 QUADRO XXII

Série de fermentações nº 10
Inóculo: IZ - 1035 (Campinas)

Teóres de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	15,16	15,16	15,16	15,16
12	11,13	10,34	10,96	9,90
24	6,75	3,95	6,31	2,78
36	0,34	0,33	3,06	0,00
48	0,58	0,00	0,43	0,00

Teóres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,60	0,60	0,60	0,60
12	2,72	3,21	2,86	3,34
24	5,17	6,54	5,56	7,32
36	7,16	8,90	7,24	8,99
48	9,32	9,41	9,41	9,41

QUADRO XXIII

Série de fermentações nº 11

Inóculo: - IZ - 1032 (Piracicaba)

Teóres de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,91	14,91	14,91	14,91
12	12,92	10,09	10,53	9,47
24	5,16	3,60	4,65	2,85
36	1,96	0,38	1,42	0,00
48	0,33	0,00	0,30	0,00

Teóres alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,80	0,80	0,80	0,80
12	1,20	3,57	3,42	4,07
24	6,23	7,16	6,54	7,67
36	8,57	8,90	8,73	9,49
48	9,49	9,57	9,57	9,63

QUADRO XXIV

Série de fermentações nº 12

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,91	14,91	14,91	14,91
12	11,13	10,69	10,48	10,28
24	5,62	2,67	4,30	1,04
36	2,16	0,00	1,04	0,00
48	0,30	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,87	0,87	0,87	0,87
12	2,99	3,34	3,34	3,57
24	6,31	7,58	7,02	8,73
36	7,91	9,41	8,90	9,57
48	9,57	9,74	9,74	9,74

QUADRO XXV

Série de fermentações nº 13

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Teores de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,93	14,93	14,93	14,93
12	13,09	12,55	12,70	12,13
24	6,96	4,88	5,53	3,98
36	3,12	1,25	1,56	0,42
48	0,27	0,00	0,00	0,00

Teores alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,53	0,53	0,53	0,53
12	1,62	1,89	2,02	2,16
24	5,02	6,09	6,16	6,85
36	7,16	8,15	8,31	8,90
48	8,82	8,90	8,99	8,99

QUADRO XXVI

Série de fermentações nº 14

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,95	14,95	14,95	14,95
12	12,62	12,85	12,41	12,62
24	5,14	3,72	4,33	0,60
36	1,00	0,00	0,61	0,00
48	0,00	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,46	0,46	0,46	0,46
12	1,82	1,68	1,96	1,82
24	5,63	6,93	6,78	8,48
36	8,08	8,82	8,82	8,90
48	8,90	8,90	8,90	8,99

QUADRO XXVII

Série de fermentações nº 15

Inóculo:- Fermento Fleischmann

Teôres de açúcares totais fermentescíveis

(g/%)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,83	14,83	14,83	14,83
12	9,07	8,85	9,09	8,22
24	5,69	2,45	4,09	1,53
36	2,19	0,00	1,50	0,00
48	0,56	0,00	0,28	0,00

Teôres alcoólicos em % (v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	1,28	1,28	1,28	1,28
12	4,21	4,35	4,29	4,95
24	6,78	8,40	7,24	9,23
36	8,64	9,49	8,90	9,49
48	9,32	9,49	9,57	9,57

J. de Mello Agnes

=45=

QUADRO XXVIII

Série de fermentações nº 16

Inóculo: - IZ - 1032 (Piracicaba)

Teores de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,67	14,67	14,67	14,67
12	9,81	10,00	9,43	8,70
24	4,46	2,34	3,60	1,42
36	1,46	0,00	0,57	0,00
48	0,00	0,00	0,00	0,00

Teores alcoólicos em % (v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,73	0,73	0,73	0,73
12	3,42	3,42	3,34	3,49
24	6,01	7,32	6,70	8,08
36	8,73	8,82	8,82	8,99
48	8,90	8,99	8,99	8,99

4.2.2. Quadros de nºs XXIX a XXVI

Rendimentos - expressos em por cento do ideal - apresentados em zero, 12, 24, 36 e 48 horas (final) para cada inóculo utilizado e respectivos tratamentos.

QUADRO XXIX

Série de fermentações nº 9

Inóculo:- Fermento Fleischmann

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (%v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	13,13	13,13	13,13	13,13
12	37,04	42,65	42,06	47,06
24	63,34	76,77	66,48	85,60
36	78,34	86,48	82,36	89,72
48	91,39	92,27	91,39	91,39

QUADRO XXX

Série de fermentações nº 10

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (%v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	5,79	5,79	5,79	5,79
12	26,27	31,00	27,62	32,25
24	49,93	63,26	53,69	70,69
36	69,15	85,95	69,93	86,83
48	90,01	90,88	90,88	90,88

QUADRO XXXI

Série de fermentações nº 11
Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	7,69	7,69	7,69	7,69
12	11,54	34,44	32,90	39,16
24	59,94	68,89	62,92	73,79
36	82,45	85,63	83,99	91,31
48	91,31	92,08	92,08	92,65

QUADRO XXXII

Série de fermentações nº 12
Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	8,31	8,31	8,31	8,31
12	28,57	31,92	31,92	34,12
24	60,30	72,44	67,09	83,43
36	75,59	89,93	85,06	91,46
48	91,46	93,08	93,08	93,08

QUADRO XXXIII

Série de fermentações nº 13

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	5,23	5,23	5,23	5,23
12	15,98	18,65	19,93	21,31
24	49,54	60,10	60,79	67,60
36	70,66	80,43	82,00	87,83
48	87,04	87,87	88,72	88,72

QUADRO XXXIV

Série de fermentações nº 14

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	4,56	4,56	4,56	4,56
12	18,05	16,66	19,44	18,05
24	55,85	68,75	67,26	84,12
36	80,13	87,50	87,50	88,30
48	88,30	88,30	88,30	89,19

G. de Mello Aguiar

=49=

QUADRO XXXV

Série de fermentações nº 15
Inóculo: - Fermento Fleischmann

Rendimentos alcoólicos em % do ideal du-
rante a fermentação (% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	11,83	11,83	11,83	11,83
12	38,90	40,11	39,76	45,74
24	62,66	77,81	66,91	85,30
36	79,85	87,70	82,07	87,70
48	86,13	87,70	88,44	88,44

QUADRO XXXVI

Série de fermentações nº 16
Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal du-
rante a fermentação (% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	7,15	7,15	7,15	7,15
12	33,54	33,54	32,75	34,22
24	58,94	71,79	65,71	79,24
36	85,62	86,53	86,53	88,17
48	87,28	88,17	88,17	88,17

4.2.3. Quadros de nºs XXXVII a XL

Médias dos rendimentos encontrados nas duas séries de fermentações para cada inóculo, às zero, 12, 24, 36 e 48 horas (final).

QUADRO XXXVII - Inóculo:- Fermento Fleischmann
Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações para as 2 séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	12,48	12,48	12,48	12,48
12	37,93	41,38	40,91	46,40
24	63,00	77,29	66,69	85,45
36	79,09	87,09	82,21	88,71
48	88,76	89,98	89,91	89,91

QUADRO XXXVIII

Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	7,41	7,41	7,41	7,41
12	22,54	33,99	32,82	36,69
24	59,44	70,34	64,31	76,51
36	84,03	86,08	85,26	89,74
48	89,29	90,12	90,12	90,41.

QUADRO XXXIX

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)
 Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	5,51	5,51	5,51	5,51
12	21,12	24,82	23,77	26,76
24	49,73	61,68	57,24	69,14
36	69,90	84,19	75,96	87,33
48	88,52	89,37	89,90	89,80

QUADRO XL

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)
 Médias dos rendimentos alcoólicos em % do ideal durante as fermentações, para as duas séries realizadas

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	6,43	6,43	6,43	6,43
12	23,31	24,29	25,68	26,08
24	58,07	70,59	67,17	83,77
36	77,86	88,71	86,23	89,86
48	89,88	90,69	90,69	91,13

Godofredo Ayres

4.3. Fase IV

4.3.1. Quadros de nºs XLI a XLIV

Resultados para açúcares totais fermentescíveis e teôres alcoólicos encontrados em zero, 24, 36 e 48 horas (final) nas fermentações com os diferentes inóculos e tratamentos.

QUADRO XLI

Série de fermentações nº 17

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis (g/%)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	15,79	15,79	15,79	15,79
24	5,40	3,64	4,86	2,18
36	2,51	0,52	1,54	0,00
48	0,28	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,73	0,73	0,73	0,73
24	6,38	7,16	6,78	7,91
36	8,64	9,32	8,82	9,63
48	9,63	9,74	9,74	9,74

Adelino Ayres

=53=

QUADRO XLII

Série de fermentações nº 18

Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis

(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	15,07	15,07	15,07	15,07
24	8,43	6,79	8,18	6,42
36	5,62	3,85	5,14	3,05
48	1,86	0,46	1,40	0,00

Teôres alcoólicos (% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,80	0,80	0,80	0,80
24	4,65	5,02	4,72	5,48
36	6,46	7,16	6,54	7,24
48	8,23	8,73	8,57	8,90

Edelleto

QUADRO XLIII

Série de fermentações nº 19

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Teôres de açúcares totais fermentescíveis
(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	15,00	15,00	15,00	15,00
24	5,19	3,85	3,91	1,80
36	1,25	0,33	0,45	0,00
48	0,00	0,00	0,00	0,00

Teôres alcoólicos (% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	0,73	0,73	0,73	0,73
24	6,78	7,40	7,24	8,82
36	9,15	9,57	9,57	9,63
48	9,57	9,63	9,74	9,74

H. de Mello Aguiar

=55=

QUADRO XLIV

Série de fermentações nº 20

Inóculo:- Fermento Fleischmann.

Teóres de açúcares totais fermentescíveis

(g/%)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	14,51	14,51	14,51	14,51
24	4,90	3,60	2,64	0,79
36	0,90	0,36	0,00	0,00
48	0,00	0,00	0,00	0,00

Teóres alcoólicos (% v/v)

Trata- mentos Horas	Teste- munha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	1,28	1,28	1,28	1,28
24	7,02	7,40	7,77	8,99
36	9,49	9,57	9,57	9,63
48	9,57	9,63	9,63	9,63

4.3.2. Quadros de nºs XLV a XLVIII

Rendimentos - expressos em por cento do ideal - apresentados em zero, 24, 36 e 48 horas (final) das fermentações realizadas com os diferentes inóculos e respectivos tratamentos.

QUADRO XLV

Série de fermentações nº 17

Inóculo:- IZ - 3 (Peoria)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	6,70	6,70	6,70	6,70
24	58,63	65,80	62,31	71,08
36	79,41	84,74	81,06	88,51
48	88,51	89,52	89,52	89,52

QUADRO XLVI

Série de fermentações nº 18

Inóculo:- IZ - 1032 (Piracicaba)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	7,62	7,62	7,62	7,62
24	44,32	47,85	44,99	52,24
36	61,58	68,25	62,34	69,01
48	78,45	83,22	81,69	84,84

J. B. de Lello Ayres

=57=

QUADRO XLVII

Série de fermentações nº 19

Inóculo:- IZ - 1035 (Campinas)

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	7,03	7,03	7,03	7,03
24	65,38	71,34	69,81	85,05
36	88,23	92,28	92,28	92,86
48	92,28	92,86	93,91	93,91

QUADRO XLVIII

Série de fermentações nº 20

Inóculo:- Fermento Fleischmann

Rendimentos alcoólicos em % do ideal durante a fermentação (% v/v)

Tratamentos Horas	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Sulfato amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l
0	12,06	12,06	12,06	12,06
24	66,16	69,74	73,23	84,73
36	89,44	90,19	90,19	90,76
48	90,19	90,76	90,76	90,76

Gl. de Mello Agnes

=58=

4.3.3. Quadro nº IL

Resultados obtidos na análise quantitativa das leveduras.

QUADRO IL

Número de leveduras encontradas em cada balão, nas fermentações para os quatro inóculos e respectivos tratamentos

Inóculos Tratamentos	IZ 1035	Fleisch.	IZ 3	IZ 1032
	Testemunha	109,2	121,1	124,3
Sulfato de amônio 1 g/l	88,2	106,7	155,4	123,8
Tiamina 0,5 mg/l	112,1	127,9	156,3	123,8
Sulfato de amônio 1 g/l Tiamina 0,5 mg/l	105,4	95,0	126,1	60,3

* Os valores acima representam milhões de leveduras por mililitro de vinho.

J. S. Mello Aguiar

4.4. Quadro de nº L

Valores pH registrados nos finais das fermentações para as fases II e III do trabalho, e que são médias de dois experimentos.

QUADRO L

Fase II

Tratamentos Inóculos	Testemunha	Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 0,5 g/l Sulfato amônio 0,2 g/l	Tiamina 1 mg/l	Tiamina 1 mg/l Sulfato amônio 0,2 g/l
Fleischmann	3,65	3,54	3,68	3,53	3,64	3,51
IZ 1032	3,60	3,55	3,50	3,58	3,64	3,50
IZ 1035	3,67	3,67	3,85	3,67	3,77	3,71
IZ 3	3,70	3,62	3,82	3,70	3,66	3,63

Fase III

Tratamentos Inóculos	Testemunha	Sulfato amônio 1 g/l	Tiamina 0,5 mg/l	Tiamina 0,5 mg/l Sulfato amônio 1 g/l
Fleischmann	4,22	3,66	4,21	3,76
IZ 1032	3,72	3,35	3,85	3,39
IZ 1035	3,35	2,85	3,36	2,88
IZ 3	3,38	2,96	3,60	3,04

5. INTERPRETAÇÃO ESTATÍSTICA

Realizamos a análise estatística com base nos rendimentos - expressos em % do ideal - em todos os momentos das análises dos experimentos. Embora os rendimentos finais devam ser os únicos encarados como tal, os rendimentos apresentados nas horas intermediárias definiram perfeitamente o aspecto das fermentações, no concernente à velocidade das mesmas.

5.1. Análise de variância

Apresentamos a análise da variância dos resultados obtidos, nas fermentações, em relação aos blocos, inóculos utilizados, tratamentos realizados e momentos das análises, em quadros adiante especificados.

5.1.1. Fase II

Quadros de nºs LI a LV

QUADRO LI

Frequência de variação	Grau de liberdade (G.L.)	Soma dos quadrados (S.Q.)	Quadrado médio (Q.M.)	Erro	σ
Blocos	1	0,1900	0,1900	0,43	0,10 insig.
Inóculos	3	344,4734	114,8244	10,71	2,50 insig.
Resíduo a	3	54,8337	18,2779	4,27	--
(Parcelas)	(7)	(399,4971)	57,0710	7,42	6,03***
Tratamentos	5	10,4498	2,0899	1,44	1,17 insig.
Interação TxI	15	25,5414	1,7027	1,30	1,05 insig.
Resíduo b	19	29,1487	1,5341	1,23	--
Total	46	464,6370	---	---	---

Obs.: - O grau de liberdade para o resíduo b, foi considerado 19 porque houve uma parcela perdida.

—x—

Explicação necessária: - Indicamos a significação para os limites de probabilidade de 5%, 1% e 0,1%, respectivamente, como é de praxe, por um, dois e três asteriscos para todo este trabalho.

F. de Mello Aguiar

=61=

QUADRO LII

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 24 horas de fermentação.

(II fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	239,1900	239,1900	15,46	1,40 insig.
Inóculos	3	605,8066	201,9355	14,21	1,28 insig.
Resíduo a	3	366,6948	122,2316	11,05	--
(Parcelas)	(7)	(1.211,6914)	173,0987	13,15	6,32 ***
Tratamentos	5	217,0921	43,4184	6,58	3,23 ***
Interação TxI	15	40,9031	2,7268	1,65	0,80 insig.
Resíduo b	19	82,6010	4,3474	2,08	--
Total	46	1.552,2876	---	---	---

Obs.: - O grau de liberdade para o resíduo b foi considerado 19 porque houve uma parcela perdida

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	107,2513	107,2513	10,35	4,97 ***
Vitamina	(2)	107,0901	53,5450	7,31	3,51 ***
Com Vit. X Sem Vit.	1	103,1068	103,1068	10,15	4,87 ***
Com Vit. 1 X Com Vit. 2	1	3,9833	3,9833	1,99	0,96 insig.
Interação Vit. x Sulfato	2	2,7507	1,3753	1,17	0,56 insig.
Tratamentos	5	217,0921	---	---	---
Resíduo b	19	---	---	2,08	---

Obs.: - O grau de liberdade para o resíduo b foi considerado 19 porque houve uma parcela perdida.

J. de Mello Aguiar

=62=

QUADRO LIII

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 36 horas de fermentação.
(II fase)
Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	213,8696	213,8696	14,62	1,21 insig.
Inóculos	3	546,5878	182,1959	13,49	1,12 insig.
Resíduo a	3	433,8565	144,6188	12,02	
(Parcelas)	(7)	(1.194,3139)	170,6162	13,04	6,82 ^{***}
Tratamentos	5	387,1033	77,4206	8,79	4,60 ^{***}
Interação TxI	15	32,7061	2,1804	1,47	0,76 insig.
Resíduo b	20	73,6626	3,6831	1,91	--
Total	47	1.687,7859	---	---	---

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	237,8971	237,8971	15,42	8,07 ^{***}
Vitamina	(2)	136,9017	68,4508	8,27	4,32 ^{***}
Com Vit. X Sem Vit.	1	136,8993	136,8993	11,70	6,12 ^{***}
Com Vit. ₁ X Com Vit. ₂	1	0,0024	0,0024	0,049	0,026*
Interação Vit. x Sulfato	2	12,3045	6,1522	2,48	1,29 insig.
Tratamentos	5	387,1033	---	---	---
Resíduo b	20	---	---	1,91	---

João Mello Aguiar

QUADRO LIV

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 48 horas de fermentação

(II fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	201,4740	201,4740	14,19	0,95 insig.
Inóculos	3	472,3221	157,4407	12,54	0,84 insig.
Resíduo a	3	662,5886	220,8628	14,86	---
(Parcelas)	(7)	(1.336,3847)	190,9121	13,81	6,27 ^{***}
Tratamentos	5	332,3512	66,4702	8,15	3,70 ^{***}
Interação TxI	15	41,7688	2,7845	1,66	0,75 insig.
Resíduo b	20	96,9138	4,8456	2,20	---
Total	47	1.807,4185	---	---	---

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	194,3270	194,3270	13,94	6,34 ^{***}
Vitamina	(2)	134,4489	67,2244	8,19	3,72 ^{***}
Com Vit. X Sem Vit.	1	132,7515	132,7515	11,52	5,23 ^{***}
Com Vit ₁ X Com Vit ₂	1	1,6974	1,6974	1,30	0,59 insig.
Interação Vit. x Sulfato	2	3,5753	1,7876	1,33	0,60 insig.
Tratamentos	5	332,3512	---	---	---
Resíduo b	20			2,20	

H. de Lello Aguiar

=64=

QUADRO LV

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 60 horas de fermentação

(II fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	19,1268	19,1268	4,37	0,35 insig.
Inóculos	3	127,1038	42,3679	6,50	0,50 insig.
Resíduo a	3	463,6018	154,5339	12,42	--
(Parcelas)	(7)	(609,8324)	87,1189	9,33	5,36 ***
Tratamentos	5	197,2323	39,4464	6,28	3,60 ***
Interação TxI	15	68,4252	4,5616	2,13	1,22 insig.
Resíduo b	20	60,7125	3,0356	1,74	--
Total	47	936,2024	---	---	---

Análise de variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	113,7752	113,7752	10,66	6,12 ***
Vitamina	(2)	69,8032	34,9016	5,90	3,39 ***
Com Vit. X Sem Vit.	1	66,4626	66,4626	8,15	4,68 ***
Com Vit ₁ X Com Vit ₂	1	3,3405	3,3405	1,82	1,04 insig.
Interação Vit. x Sulfato	2	13,6539	6,8269	2,61	1,50 insig.
Tratamentos	5	197,2323	---	---	---
Resíduo b	20	---	---	1,74	---

J. de Mello Aguiar

=65=

5.1.2. Fase III

Quadros de nºs LVI a LVIII

QUADRO LVI

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 12 horas de fermentação

(III fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	\bar{J}
Blocos	1	219,9229	219,9229	14,82	1,28 insig.
Inóculos	3	1.586,5666	528,8555	22,99	2,00 insig.
Resíduo a	3	396,2986	132,0995	11,49	--
(Parcelas	(7)	(2.202,7881)	314,6840	17,73	3,85 ***
Tratamentos	3	246,5618	82,1872	9,06	1,96 *
Interação TxI	9	89,6621	9,9624	3,15	0,68 insig.
Resíduo b	12	254,9402	21,2450	4,60	--
Total	31	2.793,9522	---	---	---

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	\bar{J}
Sulf. amônio	1	130,4516	130,4516	11,44	2,48 *
Vitamina	1	110,3726	110,3726	10,50	2,28 *
Interação Vit. x Sulfato	1	5,7376	5,7376	2,39	0,51 insig.
Tratamentos	3	246,5618	---	---	---
Resíduo b	12	---	---	4,60	---

H. de Lello Ayres

QUADRO LVII

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 24 horas de fermentação

(III fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	0,4536	0,4536	0,67	0,26 insig.
Inóculos	3	816,5158	272,1719	16,49	6,54 **
Resíduo a	3	19,0801	6,3600	2,52	--
(Parcelas	(7)	(836,0495)	119,4356	10,92	5,03 ***
Tratamentos	3	1.952,6056	650,8685	25,51	11,75 ***
Interação TxI	9	79,2924	8,8102	2,96	1,36 insig.
Resíduo b	12	56,8338	4,7361	2,17	--
Total	31	2.924,7813	---	---	---

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	1.488,2604	1.488,2604	38,57	17,77 ***
Vitamina	1	452,3280	452,3280	21,26	9,79 ***
Interação Vit. x Sulfato	1	12,0172	12,0172	3,46	1,59 insig.
Tratamentos	3	1.952,6056	---	---	---
Resíduo b	12	---	---	2,17	---

J. de Mello Aguiar

=67=

QUADRO LVIII

Rendimentos alcoólicos em % do ideal em 36 horas de fermentação

(III fase)

Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Blocos	1	6,4261	6,4261	2,53	1,86 insig.
Inóculos	3	256,2360	85,4120	9,24	6,75 **
Resíduo a	3	5,6030	1,8676	1,36	---
(Parcelas)	(7)	(268,2651)	38,3235	6,19	1,99 *
Tratamentos	3	568,4075	189,4691	13,76	4,42 ***
Interação TxI	9	119,5170	13,2796	3,64	1,17 insig.
Resíduo b	12	116,4680	9,7056	3,11	---
Total	31	1.072,6576	---	---	---

Análise da variância para tratamentos

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Sulf. amônio	1	451,8018	451,8018	21,25	6,83 ***
Vitamina	1	108,1185	108,1185	10,39	3,34 **
Interação Vit. x Sulfato	1	8,4872	8,4872	2,92	0,93 insig.
Tratamentos	3	568,4075	---	---	---
Resíduo b	12	---	---	3,11	---

J. de Lello Ayres

=68=

5.1.3. Fase IV

Quadro de nº LIX

QUADRO LIX

Contagens de leveduras após 48 horas de incubação em placas
Análise da variância

Frequência de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Erro	σ
Inóculos	3	3.149,57	1.049,85	32,4	1,68 insig.
Tratamentos	3	2.453,88	817,96	28,6	1,48 insig.
Interação Inóc. x Trat.	8	2.961,13	370,14	19,2	--
Total	14	8.564,58	---	---	---

Obs.: - O grau de liberdade para a interação inóculo x tratamento foi considerado 8 porque houve uma parcela perdida.

5.2. Comparação dos tratamentos

A aplicação do test t aos resultados obtidos com os diversos tratamentos, dentro de cada inóculo e em diferentes momentos das fermentações, revelou os valores constantes dos quadros adiante apresentados.

5.2.1. Fase II

5.2.1.1. Comparação entre os tratamentos sulfato de amônio x tiamina (Quadro de nº LX)

Horas \ Inóculos	24	36	48	60
Fleischmann	0,52 insig.	3,68 ***	1,36 insig.	1,24 insig. *
IZ 1032	0,06 insig.	1,13 insig.	0,99 insig.	2,40 *
IZ 1035	0,21 insig.	0,98 insig.	0,69 insig.	1,00 insig.
IZ 3	0,24 insig.	0,22 insig.	0,61 insig.	0,62 insig.

5.2.1.2. Comparação entre os tratamentos sulfato de amônio x sulfato de amônio + tiamina (Quadro LXI)

Horas \ Inóculos	24	36	48	60
Fleischmann	1,23 insig.	2,83 **	0,70 insig.	0,48 insig.
IZ 1032	0,90 insig.	1,90 *	1,63 insig.	0,44 insig.
IZ 1035	3,21 **	1,98 *	2,73 **	2,51 *
IZ 3	0,91 insig.	1,98 *	1,65 insig.	0,60 insig.

5.2.1.3. Comparação entre os tratamentos tiamina x sulfato de amônio + tiamina (Quadro LXII)

Horas \ Inóculos	24	36	48	60
Fleischmann	1,75 *	1,23 insig.	2,08 *	1,72 *
IZ 1032	0,95 insig.	2,95 **	2,63 **	1,94 *
IZ 1035	3,00 **	2,87 **	2,03 *	1,51 insig.
IZ 3	0,67 insig.	2,13 *	1,04 insig.	0,01 insig.

J. de Mello Ayres

=70=

5.2.2. Fase III

5.2.2.1 Comparação entre os tratamentos tiamina x sulfato de amônio (Quadro LXIII)

Inóculos \ Horas	Horas		
	12	24	36
Fleischmann	0,10 insig.	4,93 ***	1,56 insig.
IZ 1032	0,25 insig.	2,77 **	0,26 insig.
IZ 1035	0,22 insig.	2,04 *	2,64 *
IZ 3	0,30 insig.	1,57 insig.	0,80 insig.

5.2.2.2. Comparação sulfato x (sulfato + tiamina) (Quadro LXIV)

Inóculos \ Horas	Horas		
	12	24	36
Fleischmann	1,09 insig.	3,76 **	0,52 insig.
IZ 1032	0,587 insig.	2,84 **	1,17 insig.
IZ 1035	0,421 insig.	2,97 **	1,00 insig.
IZ 3	0,389 insig.	6,07 ***	0,36 insig.

5.2.2.3. Comparação tiamina x (tiamina + sulfato) (Quadro LXV)

Inóculos \ Horas	Horas		
	12	24	36
Fleischmann	1,19 insig.	8,64 ***	2,09 *
IZ 1032	0,84 insig.	5,62 ***	1,44 insig.
IZ 1035	0,65 insig.	5,48 ***	3,65 **
IZ 3	0,08 insig.	7,64 ***	1,16 insig.

J. de Mello Aguiar

=71=

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. Generalidades

6.1.1. Material

6.1.1.1. Substrato para as fermentações

Escolhemos o caldo de cana variedade C. P. 27/139 para substrato em nossas fermentações por apresentar ótimas qualidades fermentativas, e por ser a cana tardia em maturação.

Em permitindo fermentações fáceis, deu-nos êsse mosto oportunidade de mais claramente observar as consequências dos tratamentos com tiamina e sulfato de amônio. Um mosto com fatores negativos em relação à fermentabilidade, poderia criar obstáculos imprevistos nos experimentos, dificilmente elimináveis, e que iriam provocar interpretações inexatas, dadas às falhas experimentais. Por outro lado, sendo o presente, nosso primeiro trabalho nêste assunto, pretendemos seguir a sequência razoável em pesquisa, de partir-se, sempre, do mais simples para o mais complexo.

Em sendo tardia, esta cana apresentou seu período de maior riqueza em açúcares, coincidente com a época mais propícia aos nossos trabalhos em laboratório.

Corrigimos o grau Brix para 16, valor normalmente superado por esta variedade de cana, que se caracteriza por sua riqueza em açúcares, por dois motivos:

- a) uniformizar, o quanto possível, as condições do trabalho;
- b) não permitir no mosto, excesso de açúcares, que, antes de totalmente transformados, criassem, pelo acúmulo de álcool etílico no meio, condições adversas ao metabolismo das leveduras, em detrimento do rendimento das fermentações e do bom andamento das experiências. ALMEIDA (1).

Preferimos, quando da esterilização do mosto, aumentar o tempo de autoclavagem, e diminuir a temperatura, eliminando assim, o perigo de caramelização dos açúcares. ALMEIDA (3).

6.1.1.2. Substrato para o revigoramento

Escolhemos o malte para substrato nos revigoramentos das culturas puras, porque, sendo meio completo para leveduras, certamente permitiu desenvolvimento normal para os três inóculos utilizados, e que, ainda na época eram desconhecidos em relação às suas necessidades em vitamina B1 e nitrogênio.

6.1.1.3. Inóculos

Na escôlha dos inóculos de culturas puras, procuramos diferenciar as leveduras, o mais possível. Os microorganismos sendo, em parte, função do ambiente, leveduras ecológicamente distintas, provàvelmente se comportariam de maneiras diversas, também em nossas experiências (6, 8, 28, 52 e 59).

Servimo-nos também do fermento Fleischmann, por duas razões:

- a) na categoria de fermento para panificação, deveria mostrar grande susceptibilidade à vitamina B1 (32, 57) e ao nutriente nitrogenado (16);
- b) como visamos, se possível, contribuir para melhorar as condições das indústrias, o Fleischmann sendo fermento em larga escala difundido e utilizado nas fermentações industriais, justificou sua inclusão em nossos trabalhos.

6.1.2. Métodos

Nas dosagens do teor de açúcares totais fermentescíveis, demos preferência ao método de Eynon-Lane (5, 24), porque, além de ser método oficial, apresentou a grande vantagem de ser rápido, prático e preciso, condições essenciais para aplicação em trabalhos da natureza do nosso, que exigiu precisão nas análises, realizadas em grande número e em curtos períodos de tempo.

As análises do teor alcoólico foram realizadas pelo método Salleron (1), que, sendo oficial é também de simples execução.

A grande difusão do método de diluições em série, para a contagem de leveduras (53), por si só justificou a adoção desse método analítico na parte dedicada ao estudo quantitativo das leveduras, em nossas fermentações.

6.2. Fase II

Estabelecemos o pH do mosto, no início, para 4,50 para as fermentações desta fase, considerando que, embora o pH ideal para a atividade da carboxilase fôsse ao redor de 6,00 (13, 28, 34, 43), a inversão da sacarose pela invertase realiza-se em melhores condições, sob limites de pH de 4,00 e 5,00 (56). Na sequência das reações bioquímicas que constituem a fermentação alcoólica, a inversão da sacarose realiza-se muito antes que a descarboxilação do ácido pirúvico. Favorecemos então, os primeiros fenômenos da fermentação, sem impedir o desenrolar do fenômeno bioquímico, post-situado em relação à inversão da sacarose. Por outro lado, o Saccharomyces cerevisiae H. geralmente exige como uma das condições ideais ao seu desenvolvimento, meio que apresente valor pH 4,50 (1).

Estudamos nesta II fase, a influência do sulfato de amônio aplicado na razão de 0,02%, que é a dose normalmente empregada nas usinas do Estado de São Paulo, e que classificamos como dose média. A influência da vitamina B1 foi estudada aplicando-se 0,5 mg por litro (40) e 1 mg por litro. Observamos os resultados obtidos em relação à aplicação isolada da tiamina, do sulfato de amônio e do uso concomitante desses dois elementos, de modo a estabelecer comparações que permitissem a indicação de condições mais adequadas à atividade das leveduras..

Os resultados obtidos nos experimentos (quadros I a XX), de acordo com o julgamento estatístico (quadros LI a LV), permitiram-nos fazer diversas considerações.

Não houve diferenças significantes entre os resultados obtidos nos blocos experimentais, isto é, entre as quatro primeiras séries de fermentações e as quatro respectivas repetições, em todo o transcorrer das mesmas. Este fato era esperado, porquanto realizamos tôdas as oito séries

G. S. L. D. Agnes

=74=

de fermentações, que constituem esta fase do trabalho, nas mesmas condições experimentais.

Não houve diferenças significantes no comportamento dos diversos inóculos, em face dos tratamentos realizados, isto é, a ação de um dado tratamento se traduziu em reações semelhantes, para os quatro tipos de inóculos utilizados.

Nas oito séries de fermentações, nas 12 primeiras horas, não apareceram diferenças significantes, em relação aos tratamentos. Até êsse momento, a vitamina B1 e o sulfato de amônio não provocaram qualquer efeito visível sôbre as fermentações (quadro LI).

A análise da variância dos resultados obtidos nos rendimentos em 24, 36, 48 e 60 horas, evidenciou diferenças significantes entre os diversos tratamentos realizados (quadros LII, LIII, LIV e LV).

Em 72 horas não foi aconselhavel a interpretação estatística dos dados porque nêsse momento, para tôdas as fermentações, os rendimentos não apresentaram diferenças que permitissem a análise.

Este fato comprovou que tôdas as fermentações, decorridas 72 horas já estavam paralizadas, como consequência da já total transformação dos açúcares do mosto. Então, no final, tôdas as fermentações de uma série apresentaram praticamente o mesmo rendimento, em relação aos diferentes tratamentos.

A análise da variância para tratamentos, nos mostrou ainda que: (quadros LII, LIII, LIV e LV),

- a) houve influência significativa da aplicação de vitamina, ao mosto, no transcorrer de tôdas as fermentações, de 24 a 60 horas;
- b) houve influência significativa da aplicação do sulfato de amônio, de 24 a 60 horas;
- c) não houve interação entre vitamina B1 e sulfato de amônio. A aplicação simultânea de ambos não provocou melhoria em suas influências (sinergismo) e nem prejuizos (antagonismo). Ambos exerceram suas atividades acelerativas das fermentações, independentemente;
- d) não houve diferenças significantes entre os resultados obtidos pela aplicação da tiamina em dose correspondente a 500

Edmundo Ayres

=75=

gamas por litro e a dose de 1 mg por litro. Isto provou que, com 0,5 mg por litro já se atingiu a quantidade limite necessária para a produção do maior efeito da vitamina B1, sôbre as fermentações. Concluimos então, que a aplicação de dose superior a 0,5 mg por litro é antieconômica. A não superioridade da dose dupla de tiamina sôbre a dose simples, revelou-se, também, quando das aplicações simultâneas com sulfato de amônio.

A comparação entre os efeitos produzidos pelos diversos tratamentos, em 24, 48 e 60 horas, para os quatro inóculos, (quadros XVII a XX e LX a LXII), nos permitiu concluir que:

- a) as adições isoladas de sulfato de amônio e tiamina, igualaram-se no efeito produzido, para os quatro inóculos, no transcorrer das fermentações;
- b) a comparação entre os efeitos da aplicação simplesmente de sulfato de amônio, e sulfato de amônio mais tiamina, revelou que, de um modo geral, nas 24 primeiras horas, e nas últimas 24 horas das fermentações não houve significância nos resultados. Mas, no terço médio das fermentações, foi visível a predominância do tratamento conjugado sôbre o tratamento simples (quadros XVII, XVIII, XIX e XX);
- c) a comparação entre a aplicação simples de tiamina e, de sulfato de amônio mais tiamina, desde 24 até ao redor de 60 horas, provou ser significativamente superior a ação exercida pela aplicação simultânea dos tratamentos sôbre a ação da vitamina B1 aplicada isoladamente.

Considerando o fato de que, em 72 horas, tôdas as fermentações praticamente se igualaram quanto aos rendimentos obtidos, e considerando, também, que as fermentações tratadas com tiamina, ou sulfato de amônio, ou com ambos simultaneamente, apresentaram superioridade de rendimentos, em relação às testemunhas, nos momentos intermediários, concluímos que:- as adições de nutriente nitrogenado e vitamina, levadas a efeito, produziram no terço médio das fermentações, aceleração no processo fermentativo. Tôdas as fermentações, para um determinado inóculo, partiram de condições iguais, em relação à levedura e mosto, e atingiram também um único nível, no final, em rendimento, porém, umas atingiram êsse

máximo de rendimento, antes das outras. Em suma, as fermentações suplementadas com nutrientes adicionais, foram mais velozes do que as testemunhas.

Pelos dados apresentados nos quadros de I a XX, LI a LV e LX a LXII, chegamos à conclusão de que, a ordem decrescente, em velocidade, para as fermentações com os diferentes tratamentos e para todos os inóculos foi:

- 1 - fermentações mais velozes: tratamentos com sulfato de amônio e tiamina;
- 2 - fermentações de velocidades médias: tratamento com sulfato de amônio ou com vitamina B1;
- 3 - fermentações mais lentas: sem tratamento adicional (testemunhas).

6.3. Fase III

Realizamos ensaios nesta fase do trabalho, com alterações, em relação à fase II, e como consequência de seus resultados, em:

- a) pH;
 - b) relação inóculo/mosto;
 - c) doses de vitamina B1 e
 - d) doses de sulfato de amônio.
- a) Estabelecemos em 5,60 o pH inicial do mosto, que é valor mais adequado à atividade da carboxilase (13, 27, 34, 41, 43, 46), sem criarmos condições incompatíveis com o bom desenvolvimento das leveduras. O pH 5,60 foi usado com sucesso por MAESEN (32).
- b) Alteramos a relação inóculo / mosto para 1:4, o que nos permitiu obter fermentações mais rápidas.
- c) Eliminamos as doses duplas de vitamina B1, por desnecessárias, conforme evidenciaram os resultados das fermentações na fase II.
- d) Aumentamos para 0,1% a dose de sulfato de amônio, à qual chamaremos de dose forte (32).

Dos resultados experimentais, e após interpretação estatística, pudemos fazer as considerações adiante relatadas.

Não houve, como era de se esperar, diferença sig-

Luiz de Aguiar

nificante entre os blocos experimentais, pela mesma razão já discutida em 6.2: (quadros LVI, LVII e LVIII).

A análise da variância nos permitiu concluir que não houve interação entre inóculo e tratamento, à semelhança do verificado na fase II.

Para tôdas as fases das oito séries de fermentações, não houve interação entre vitamina e sulfato de amônio quando aplicados simultâneamente. Não reagiram nem sinèrgicamente e nem de modo antagônico.

A influência dos tratamentos foi considerada significativa dêside às 12 horas, até às 36 horas. Em 48 horas, a identidade dos rendimentos não permitiu a análise estatística. Então, também aqui, chegamos à conclusão de que o efeito no rendimento final das fermentações de uma mesma série é igual para tôdas. Mas, houve significância para as diferenças obtidas entre tratamentos, em 12, 24 e 36 horas. Explicamos isto, da seguinte maneira: as fermentações, de uma única série, partiram de condições iguais, à exceção dos tratamentos adicionais; no transcorrer das mesmas, surgiram diferenças significantes (quadros XXVI a XL), até às 36 horas. Ora, se houve significância em relação aos rendimentos intermediários é porque umas fermentações foram mais rápidas que outras.

O test t (quadros LXIII a LXV) nos deu a significância das diferenças entre tratamentos, constantes nos quadros XXVII a XL.

Observamos que, em 12 horas, as fermentações com tratamentos adicionais mostraram superioridade significativa sôbre as respectivas testemunhas (quadro LVI), mas foram iguais entre si, na magnitude dessa superioridade. (Quadros LXIII, LXIV e LXV).

Em 36 horas, as diferenças, de um modo geral, entre os três tipos de tratamentos, se equivaleram em sua superioridade sôbre as testemunhas.

Nas 24 horas, (metade teórica das fermentações), êstes três tratamentos, entre si, apresentaram a seguinte escala de superioridade: o sulfato de amônio + tiamina predominou sôbre sulfato de amônio isolado, e êste sôbre a vitamina B1 isoladamente, exceção feita ao inóculo IZ 3 que se

comportou igualmente para os dois tratamentos isolados (vitamina B1 e sulfato de amônio).

Em resumo, os efeitos acelerativos nas fermentações decorreram na seguinte ordem:

- 1 - mais velozes: aplicação simultânea de sulfato de amônio e vitamina B1;
- 2 - velocidade média: aplicação de sulfato de amônio;
- 3 - menor velocidade: aplicação de tiamina (excessão para o IZ 3) e
- 4 - mais lentas: testemunhas.

A análise da variância (quadros LVII e LVIII) nos mostrou ainda que nesta fase dos trabalhos, houve diferenças significantes entre o comportamento dos inóculos. Os quadros XXI a XLIV nos dão as amplitudes dessas diferenças.

As fermentações com IZ 3 e fermento Fleischmann foram as mais sensíveis à ação do nutriente e da vitamina. Para êstes dois inóculos, as fermentações tratadas com sulfato de amônio e tiamina, em 24 horas já atingiram, praticamente o seu término, pois, apresentaram, em média, 0,82 e 1,17 g de açúcares totais fermentescíveis por litro, enquanto, nessa mesma hora, as testemunhas respectivas ainda continham infermentados, 5,38 e 5,15 gramas de açúcares por litro de mosto. Somente às 48 horas de fermentação, é que essas testemunhas apresentaram 0,15 e 0,28 gramas de açúcares residuais por litro, isto é, levaram 48 horas para apresentarem condições semelhantes às observadas em 24 horas, nos balões com nutrientes adicionais. Houve então, redução em, praticamente de 50% no tempo gasto para as leveduras estimuladas pelo sulfato de amônio e tiamina, fermentarem todo o açúcar do mosto, em relação às leveduras isentas dêsse estímulo.

Para os inóculos IZ 1035 e IZ 1032, a ação dos tratamentos foi menos enérgica. Houve economia de 25 a 30% do tempo, em relação às durações das fermentações.

Ficou provado que inóculos diferentes, nas mesmas condições de nutrição, reagiram de maneiras diversas, e que, a vitamina acelera de maneira marcante a velocidade das fermentações.

Edelmo D. G. S.

=79=

6.4. Fase IV

Fizemos as fermentações correspondentes à fase IV, para estudo quantitativo das leveduras, nos diferentes balões fermentadores.

As condições das fermentações em tudo decorreram iguais às da fase III, isto porque os resultados desta última foram mais incisivos.

Não realizamos análise estatística para os resultados obtidos, em relação aos rendimentos, porque julgamos desnecessário, em vista dessa análise já ter sido feita na fase III que foi o modelo para a realização das fermentações desta quarta fase.

A análise da variância realizada sobre os resultados obtidos das contagens de leveduras, para os quatro inóculos, revelou ser insignificante à influência tanto dos inóculos como a dos tratamentos. Este resultado demonstrou que a vitamina B1 e o sulfato de amônio não interferiram no processo reprodutivo das leveduras.

6.5. Discussão geral

Das observações dos fenômenos analisados nas diferentes fases do trabalho, podemos chegar a outras deduções interessantes, que não as já assinaladas.

Tôdas as fermentações, em seus momentos iniciais não apresentaram diferenças visíveis, em relação aos tratamentos, dentro das respectivas séries. Ora, essa fase inicial é jultamente o momento da reprodução mais intensa das leveduras.

Por outro lado, a análise quantitativa das leveduras (fase IV) não mostrou diferenças significantes entre os valores encontrados para a flora das diferentes fermentações. Um fato reforça o outro, robustecendo a conclusão de que a ação da vitamina B1 e do sulfato de amônio se limitou ao metabolismo fermentativo, não sendo o processo reprodutivo diretamente influenciado por êsses fatores. Sòmente após a fase de indução é que os nutrientes adicionados ao mosto se mostraram ativos.

J. de Almeida

=80=

O pH 5,60 revelou-se mais adequado à ação da vitamina B1, tanto assim, que, as leveduras mais sensíveis à sua ação, puderam, de maneira mais intensa, usufruir da presença de tiamina no mosto, nessas condições.

Em fermentações mais rápidas, de fato, (32) a influência da vitamina B1 foi mais acentuada.

Outra observação a ser feita, é a de que, às doses aplicadas de vitamina, devemos considerar como complementares, os teôres de tiamina já existentes no caldo, e que, variam com múltiplos fatores (2, 19, 20).

Os valores pH finais, das fermentações (quadro L) mostraram que, o aumento da acidês iônica foi normal no transcorrer das fermentações, porquanto as mudanças de pH mostraram-se absolutamente normais, e dentro do esperado, para trabalhos desta ordem.

7. CONCLUSÕES

Como consequência dos resultados obtidos nos experimentos, e analisados estatisticamente, pudemos tirar as seguintes conclusões, a respeito da influência da vitamina B1 e do sulfato de amônio, sobre a fermentação alcoólica do caldo de cana variedade C. P. 27 / 139.

1 - A influência da tiamina na metabolização de açúcares por leveduras (Saccharomyces cerevisiae H.) traduziu-se por marcante aceleração no processo fermentativo.

2 - A vitamina B1 não aumentou o rendimento final obtido nas fermentações. A maior velocidade verificada, provavelmente foi devida a um maior estímulo das atividades enzimáticas da levedura, em relação à produção de álcool etílico, uma vez que sua ação foi nula, praticamente, no processo reprodutivo.

3 - A dose de 500 gamas de tiamina por litro de mosto foi a mais aconselhável, porque a de 1 mg por litro foi tão eficaz quanto a dose menor.

4 - Os inóculos IZ 3 e fermento Fleischmann comercial foram os mais sensíveis à ação da tiamina e do sulfato de amônio, seguidos dos IZ 1035 e IZ 1032, quando o pH inicial do mosto foi de 5,60.

L. de Almeida

5 - O pH 5,60 foi o que permitiu a maior atividade dos sistemas enzimáticos das leveduras em face dos elementos ensaiados.

6 - O sulfato de amônio como fonte de nitrogênio provocou aceleração nas fermentações, sem interferir de modo decisivo no processo reprodutivo.

7 - Em fermentações lentas (72 horas) e sob o pH inicial 4,50, o efeito do sulfato de amônio na dose de 0,02% equivaleu ao da tiamina na dose de 500 gamas por litro de mosto.

8 - A dose de 1 grama por litro de sulfato de amônio apresentou superioridade de ação sobre a dose menor de 0,2 g por litro e sobre a de vitamina B1, na dose de 500 gamas por litro.

9 - Não houve interação entre sulfato de amônio e tiamina quando adicionados concomitantemente, mas, a sua aplicação simultânea, na prática é vantajosa. A aplicação que melhores resultados apresentou, foi a de 0,5 mg de tiamina mais 1 grama de sulfato de amônio por litro de mosto e sob pH inicial de 5,60.

8. SUMÁRIO

Pesquisamos, no presente trabalho, a influência da vitamina B1, do sulfato de amônio e da raça de levedura, na fermentação de mostos de cana de açúcar, C. P. 27 / 139, uma das melhores senão a melhor variedade para a fabricação de álcool diréto e aguardente, ainda muito pouco estudada em relação às pesquisas a que nos propusémos.

Através de análises de 96 fermentações, e baseados no julgamento estatístico dos resultados obtidos, concluímos que o efeito dos tratamentos acima especificados, traduziu-se pela acentuada aceleração das fermentações, sem contudo, alterar o rendimento final das mesmas. Por outro lado, o comportamento das diferentes estirpes de levedura empregadas foi diverso diante da influência dos tratamentos, porém, para todos os casos, a aplicação simultânea de sal de amônio e tiamina foi o tratamento que melhores resultados apresentou. Completando as pesquisas, verificamos que o efeito do

sulfato de amônio e da vitamina B1 não se exerceu sobre o processo reprodutivo das leveduras, estimulando apenas as atividades enzimáticas, relacionadas com a produção de álcool etílico e gás carbônico.

9. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The author studied the influence of thiamine, ammonium sulphate and strain of yeast upon the fermentation of sugar cane juice (variety C. P. 27 / 139) which is considered one the best varieties used in preparation of alcohol and brandy.

From the results of 96 fermentations, the author concluded:-

1 - The influence of thiamine upon sugar metabolism by yeast resulted in a noticeable acceleration of the alcoholic fermentation;

2 - Vitamin B1 did not increase the ultimate yield of the fermentation;

3 - At an initial pH 5,60, inoculum IZ 3 and pressed Baker's yeast, followed by IZ 1035 and IZ 1032 gave a better response to the addition of thiamine;

4 - The enzymatic activity was favored at pH 5,60;

5 - Ammonium sulphate used as a source of nitrogen accelerated the fermentation, but did not show any effect on the reproduction of the cells yeasts;

6 - In slow rate fermentation process (72 hs) with an initial pH of 4,50 the effect of ammonium sulphate (0,02%) was the same as produced by 0,5 mg of thiamine per liter;

7 - There was no interaction between ammonium sulphate and thiamine when used together, but its simultaneous application is an advantage in fermentation technology, when supplied to the fermentable juice in amount of 0,5 mg of thiamine and 1 g of ammonium sulphate per liter, at an initial pH of 5,60..

Adelino Ayrès

=83=

10. BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - ALMEIDA, J. R. de
1940 - Alcool e destilaria, primeira edição, E. Nathanael dos Santos, Piracicaba, 32-34, 36, 39-40, 45, 71-75, 85, 246, 304-318.
- 2 - ALMEIDA, J. R. de
1944 - Composição da cana e do caldo de cana em relação ao complexo vitamínico B., Rev.Agric., Piracicaba, 19(9-10)(11-12): 413-420.
- 3 - ALMEIDA, J. R. de
1952 - Apostilas de aulas de Tecnologia Agrícola, C.A."Luiz de Queiroz", Piracicaba, 32-37, 41.
- 4 - ALMEIDA, J. R. de
1954 - Catálogo geral das culturas do Instituto Zimotécnico, Boletim do Instituto Zimotécnico, 7: 1-43.
- 5 - A. O. A. C.
1945 - Official and tentative methods of analysis, 6ª ed., A.O.A.C. Washington, 570-571.
- 6 - ATKIN, L. et al
1949 - Growth and fermentation factors for different brewery yeasts, Biochim. biophys. Acta, 3: 692-708, Chem.Abstr. 1949, 42:2312h.
- 7 - AUHAGEN, E.
1931 - A further coenzyme of alcoholic fermentation, Naturwissenschaften, 19:916-917, Chem.Abstr. 1932, 26:1307.
- 8 - BURKHOLDER, R. P.
1943 - Vitamin deficiencies in yeast, Amer. J. Bot., 30:206-211.
- 9 - CASAS, J. F.
1954 - Vitamin B1 as an accelerator of wine fermentation, Ion, Madr., 14:130-133, Chem.Abstr., 1954, 48:12.367d.
- 10 - DUPUY, P. and M. Flauzy
1954 - The effect of thiamine upon the fermentation of grape fruit, C. R. Acad. Sci., Paris, 40:273-277.

Adelino Ayres

=84=

- 11 - FRUTON, J. S. e S. Simmonds
1953 - General Biochemistry, First ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., Chapman & Hall, Ltd., London, 435-436, 470, 873-877.
- 12 - GOMES, F. P.
1955 - Princípios básicos de experimentação, Referatas e Seminários do Instituto Zimotécnico.
- 13 - GREEN, D. E., D. Herburt e V. Subrahmanyam
1941 - Carboxilase, J. biol. Chem., 138:327-339.
- 14 - GREWE, R.
1936 - Antineuritic vitamin, Z. Physiol. Chem., 242:89-96, Chem. Abstr., 30:8225.
- 15 - HELLER, V. G.
1923 - Studies on yeast. V - The vitamin B content of yeast, J. biol. Chem., 55:385.
- 16 - HOFFMAN, C. H.
1917 - The utilization of ammonium chloride by yeast, J. industr. Engng. Chem., 9:148-151.
- 17 - I.B.G.E.
1949 - Anuário Estatístico do Brasil, Serviço gráfico do I.B.G.E., Rio de Janeiro; 197-201.
- 18 - JACKSON, S. et al
1951 - Growth of an aneurine-requiring yeast strain in various substrates related to the tricarboxylic acid cycle, J. Chem. Soc., 1561 - 4, Chem. Abstr. 1951, 45: 9609c.
- 19 - JACKSON, W.R.
1943 - Vitamins in whole sugar cane and in sugar cane juice, Int.Sug.J. 46(545):133.
- 20 - JACKSON, W.R. and T. J. Macek
1944 - B complex vitamin in sugar cane and in sugar juice, Int. Sug. J., 46 (550):264-266.
- 21 - JANSEN, B. C. P. e W. F. Donat
1926 - Antineuritic vitamin, Chem. Weekblad, 23: 201-203, Chem. Abstr., 20: 2005.
- 22 - KNUCHEL, F., L. Deshusses e J. Corbaz
1953 - Influence de la vit. B1 et de quelques sels minéraux sur la fermentation alcoolique du jus de

raisin et la retriogradation malolatique, Communica-
ção da Cia. F. Hoffmann - La Roche & Cia. S.A.
Bâle.

- 23 - KNUCHÉL, F., L. Deshusses e L. Corbaz
1954 - Influence of vitamin B1 and mineral salts
on the alcoholic fermentation of grape fruit and
the malolatic retrogradation, Rev.Ferment. et
Aliment., 9:39-43, Chem. Abstr., 1954, 48:8475h.
- 24 - LANE, J. H. e L. Eynon
1923 - Volumetric determination of reducing sugars
by means of Fehling's solution, with methulene blue
as internal indicator, Int.Sug.J., 25:143-149.
- 25 - LASER, H.
1941 - The effect of thiamine on fermentation of
yeast, Biochem.J., 35(4):488-494.
- 26 - LEME Jr, J.
1948 - Práticas de Tecnologia Agrícola; 4, 8, 12,
33, 42.
- 27 - LENTHARDT, F. e H. Nielsen
1952 - Biological phosphorylation of thiamine, Helv.
chim. acta, 35: 1196-1209.
- 28 - LEONIAN, C. H. e V. G. Lilly
1942 - The effect of vitamins on ten strains of
Saccharomyces cerevisiae H. Amer. J. Bot., 29:
459-464.
- 29 - LIEBKNECHT, W. L.
1939 - Studies on the decarboxilation of pyruvic
acid, Biochem, Z., 303:101-111, Chem.Abstr. 1939,
34:3288.
- 30 - LIPTON, M. A. e C. A. Elvehjem.
1940 - The activation of cocarboxylase by thiamine,
J. Biol. Chem., 136:637.
- 31 - LOHMANN, K. e Ph. Schuster
1937 - Co-carboxylase, Naturwissenschaften, 25:
26-27, Chem. Abstr., 1937, 31: 3946.
- 32 - MÆSEN, J. M.
1953 - Influence of the thiamine and ammonium ions
on alchbolic fermentation, Biochim, et Biophys.
Acta, 12:445-461.

G. S. J. J. J.

- 33 - MASSART, L. e J. Horens
1953 - L'assimilation d'azote aminé par les levures, *Enzymologia*, 15: 359-361.
- 34 - MELNICK, J.P. e K. G. Stern
1940 - Studies on carboxylase, *Enzymologia*, 8:129
- 35 - MUNTZ, J.A.
1947 - The rôle of potassium and ammonium in alcoholic fermentation, *J. biol. Chem.*, 171:653-665.
- 36 - NELSON, V. E., e E. I. Fulner e R. Cessna
1921 - The nutritional requirements of yeast, III - The synthesis of water soluble B by yeast, *J. biol. Chem.*, 46:77-81.
- 37 - NEUBAUER, O. e K. Fromherz
1910 - The decomposition of amino-acids in yeast fermentation, II - fermentation of p-hydroxyphenyl pyruvic acid, *Z. Physiol. Chem.*, 70:326-350, *Chem. Abstr.*, 1911, 5:1789.
- 38 - NEUBERG, C. e L. Karczag
1911 - Uber Zuckerfreie Hefegarungen. IV. Carboxylase, ein neues Enzym der Hefe, *Z. Biochem.*, 36: 68-75.
- 39 - OCHOA, S.
1938 - Vitamin B1 and cocarboxylase, *Nature, Lond.*, 141:831-832.
- 40 - RIBEREAU-GAYON, J. e E. Peynaud
1952 - Sur l'emploi en vinification de quelques activateurs vitaminiques de la fermentation, extrait du procès-verbal de la Séance de l'Académie d'agriculture de France.
- 41 - ROSENBERG, H.R.
1945 - Chemistry and physiology of the vitamins, *Rev. Repr.*, Interscience Publishers, Inc., New York, N.Y., 100-125; 126-128.
- 42 - SCHULTZ, A.S., L. Atkin e C.N. Frey
1937 - A fermentation test for vitamin B1, *J. Amer. chem. Soc.*, 59 (11): 2457-2460.
- 43 - SINGER, T.P. e J. Pinsky
1952 - Isolation and properties of the alfa carboxylase of wheat germ, *J. Biol. Chem.*, 196:375-388.

- 44 - SMYTHE, C.V.
1939 - The effect of certain tissue extracts of ammonium salts and of certain amides on the rate of fermentation, by baker's yeast, *Enzymologia*, 6:9-14.
- 45 - STERN, K.G. e J.W.Hofer
1937 - Synthesis of co-carboxylase from vitamin B1, *Enzymologia*, 3:82-95.
- 46 - SUMNER, J.B. e K. Myrback
1951 - The Enzymes - Chemistry and Mechanism of action, Vol. II, Academic Press Inc., Publishers, New York, N.Y., 189
- 47 - TAUBER, H.
1937 - Enzymic synthesis of cocarboxylase from vitamin B1, *Enzymologia*, 2: 171-174.
- 48 - TAUBER, H.
1938 - The interaction of vitamin B1 in enzymic reactions, *J. biol. Chem.* 123:499-506.
- 49 - TAUBER, H.
1938 - The carboxylase enzyme system, *J. biol.Chem.*, 125:191-199.
- 50 - TAUBER, H.
1938 - Synthesis of co-carboxylase from vitamin B1, *J.Amer. chem. Soc.*, 60 (3): 730-731.
- 51 - TEIXEIRA, C.G. e A. Salati
1954 - Fermentação do caldo de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) variedade Co 290. Influência da adição de sais de amônio e farelo de arroz sobre o rendimento alcoólico, *Bragantia*, 13 (13):157-163.
- 52 - TEIXEIRA, C.G. e A. Salati
1954 - Fermentação alcoólica do caldo de cana de açúcar, variedade Co 290.II - Influência da estirpe de fermento utilizado sobre o rendimento alcoólico, *Bragantia*, 13 (15): 181-186.
- 53 - TOFLEY e Wilson's
1948 - Principles of Bacteriology and Immunity, third ed., revised by G. S. Wilson and A.A. Miles, Edward Arnold & Co, London, 82.
- 54 - TREVELYAN, W.E. e J. S. Harrison
1954 - Studies on yeast metabolism. 3. The intracel-

- lular level of pyruvate during yeast fermentation, Biochem. J., 57 (4): 556-561.
- 55 - TREVELYAN, W.E. and J.S. Harrison
1954 - Studies on Yeast metabolism. 4. The effect of thiamine on yeast fermentation: The Biochem. J., 57 (4): 561-566.
- 56 - VERONA,).
1950 - Microbiologia delle Fermentazioni e Microbiologia Industriale, Casa Editore Dr. Luigi Macri-Firenze; 139-147.
- 57 - WEIJLARD, J. e H. Tauber
1938 - Synthesis, Isolation and Identification of Cocarboxilase, J. Am. Chem. Soc., 60 (9): 2263-64.
- 58 - WEIL-MALHERBE, H.
1939 - The Enzymic Phosphorylation of Vit. B1. Biochem. J., 33 (12): 1997-2007.
- 59 - WERKMAN, C.H. e P.W. Wilson
1953 - Bacterial Physiology, Sec. Print, Academic Press Inc. Publishers, New York, N.Y., 239-241.
- 60 - WESTENBRINK, H.G.K. e D.A. Van Dorp
1940 - Cause of the "Activation" of the Carboxylase system by Free Aneurin. Nature, 145: 465-466.
- 61 - WESTENBRINK, H.G.K., D.A. Van Dorp, M. Gruber e H. Veldman
1940 - Aneurin phosphates and yeast phosphatase, Enzymologia, 9: 73-89.
- 62 - WILLIAMS, R.R. e J.K. Clines
1936 - Syntheses of Vit. B1, J. Am. Chem. Soc. 58 (8): 1504-1505.
- 63 - WINDAUS, A., R. Tschesche, H. Rihkoff, F. Laquer e F. Schultz.
1931 - The preparation of crystalline antineuritic vitamins from yeast. Preliminary paper, Z. Physiol. Chem. 204: 123-8, Chem. Abstr, 1932, 20 (3): 3006.

J. de Mello Aguiar

=89=

II. AGRADECIMENTO

Ao Professor Jaime Rocha de Almeida, que pelo apoio moral, material e orientação, nos permitiu a concretização dos trabalhos; à Cia. Hoffmann - La Roche S.A., à Societé de Sucreries Brésiliennes, à Direção da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", aos doutores Frederico Pimentel Gomes e Aristeu Mendes Peixoto, aos Colegas e funcionários do Instituto Zimotécnico e a tódas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram no presente trabalho, nossos agradecimentos.