

## EFEITO DA ADIÇÃO DE SULFATO DE AMÔNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO SUCCÍNICO DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

L.E. Gutierrez\*

---

RESUMO: A produção de ácido succínico por leveduras durante a fermentação alcoólica de mosto de melão suplementado com 25, 50 e 100 ppm de nitrogênio na forma de sulfato de amônio foi determinada por cromatografia em fase gasosa. A adição de nitrogênio amoniacal não afetou significativamente a produção de álcool etílico. Houve redução significativa no teor de ácido succínico com o aumento da quantidade de nitrogênio adicionada.

Termos para indexação: ácido succínico, sulfato de amônio, fermentação alcoólica, leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*.

## THE EFFECT OF AMMONIUM SULFATE UPON SUCCINIC ACID PRODUCTION DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: Succinic acid production by yeasts during alcoholic fermentation of cane molasse supplemented with 25, 50 and 100 ppm of nitrogen in the form of ammonium sulfate was determined by gas-liquid chromatography. Ethanol production was not effected by the different levels of nitrogen, but there was a significant reduction in the content of succinic acid which was inversely related with the ammonium sulfate concentration in the medium.

---

\* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - 13.400 - Piracicaba, S.P. e CEBTEC/FEALQ.

Index terms: succinic acid, ammonium sulfate, alcoholic fermentation, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*.

---

## INTRODUÇÃO

O ácido succínico há muito tempo é conhecido como produto secundário da fermentação alcoólica ao lado do glicerol e dos alcoóis superiores. Segundo WHITING (1976) a concentração do ácido succínico variou de uma fermentação para outra, em cerveja (166 mg/l), cidra (1600 mg/l) e vinho (1800 mg/l). O mesmo autor salientou que o ácido succínico é o principal ácido formado pelas leveduras.

O ácido succínico é formado durante os primeiros estádios da fermentação alcoólica fato observado tanto na produção da cerveja (COOTE & KIRSOP, 1974) como para vinho (THOUKIS *et alii*, 1955).

A formação de ácido succínico durante a fermentação alcoólica depende de diversos fatores. HEERDE & RADLER (1978) verificaram o efeito de diversos aminoácidos sobre a produção de ácido succínico e concluíram que o ácido glutâmico produziu a mais alta concentração de ácido succínico. Os mesmos autores verificaram que a formação do ácido succínico foi proporcional à concentração de glucose do meio. KLEINZELLER (1941) verificou que a redução da pressão de gás carbônico resultou na redução da formação de ácido succínico durante a fermentação alcoólica. JAMES (1984) verificou que a adição de ácido L-málico ao meio da fermentação resultou em produção de ácido succínico duas vezes maior do que o controle. DURO & SERRANO (1981) verificaram que a formação de ácido succínico foi inibida por substâncias que despolarizam a membrana celular, como dietilbêntrol e dinitrofenol.

Segundo OURA (1977) a formação do ácido succíni-

co ocorre pela via oxidativa do ciclo de Krebs a partir do ácido alfa-cetoglutárico enquanto LUPIANEZ *et alii* (1974) relataram que a formação ocorre pela via reductiva.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mosto: foi preparado por diluição de melão (composição: 85% Brix, 66,0% de ART, nitrogênio total:0,20%; fósforo: 0,04%; potássio: 1,50%; cálcio: 0,20% e magnésio: 0,30%). O pH do mosto foi acertado a 4,0 com solução de ácido sulfúrico. Foram feitas adições de sulfato de amônio para se obter mostos com 25, 50 e 100 ppm de nitrogênio. O mosto foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 15 minutos. O teor de açúcares redutores totais do mosto variou de 14,5 a 14,8 g/100 ml.

Ensaio de fermentação: 90 ml de mosto foram inoculadas com 10 gramas de fermento de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) com 99,5% de viabilidade celular em frascos de 200 ml e colocados para fermentar a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Após o final da fermentação, o vinho foi centrifugado, o sobrenadante utilizado para as análises químicas e o fermento reutilizado para nova fermentação, repetindo-se a operação durante 4 ciclos. Cada tratamento foi repetido em triplicata.

Açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR): as determinações foram realizadas pelo método de Somogyi-Nelson conforme descrito por AMORIM *et alii* (1982).

Grau alcoólico: o vinho foi destilado em microdestilador Kjeldahl e a densidade do destilado determinada em densímetro digital Anton-Paar DMA-46 segundo AMORIM *et alii* (1982).

Ácido succínico: volume conhecido de vinho foi transferido para coluna de vidro contendo 5 cm<sup>3</sup> de resina aniônica Ag-lx8 (200 mesh) na forma formiato. Após a lavagem com água desmineralizada, o ácido succínico foi

eluído com 10 ml de solução de ácido fórmico a 20%. A solução contendo o ácido succínico foi evaporada até secagem e o resíduo esterificado com solução de cloroformio-metanol-ácido sulfúrico de ROUGHAN & SLACK (1973) a temperatura de 55°C durante 60 minutos (RUMSEY *et alii*, 1964). A solução do ester metílico do ácido succínico foi analisada por cromatografia em fase gasosa (Cromatógrafo CG-17), com ionização de chama), utilizando-se coluna metálica de 2 metros de comprimento por 0,5 cm de diâmetro interno, empacotada com dietileno-glicol-succinato a 18% sobre cromosorb P. Durante a análise a temperatura da coluna foi mantida a 140°C e o fluxo do gás de arraste a 50 ml N<sub>2</sub>/minuto. Para a análise quantitativa foi empregado ácido succínico puro nas mesmas condições de amostra.

Análise estatística: foi utilizado o delineamento blocos casualizados segundo PIMENTEL GOMES (1985) sendo cada bloco considerado com um ciclo fermentativo. Para a análise de variância foi empregado o teste F e para contrastes entre médias o teste Tukey.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os valores de grau alcoólico dos vinhos obtidos com as suplementações de sulfato de amônio. Não foram detectadas diferenças significativas nos diversos tratamentos, a produção de etanol não foi afetada significativamente pela adição de nitrogênio amoniacal nas doses de até 100 ppm N.

Na Tabela 2 são apresentados os teores de ácido succínico no vinho obtido da fermentação de mosto de melão suplementado com nitrogênio amoniacal na forma de sulfato de amônio. Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos controle e as doses de 50 e 100 ppm de N. Não foram observadas diferenças significativas entre o controle e a dose de 25 ppm de N e entre as doses de 25 e 50 ppm de N.

Pelos dados da Tabela 2 podemos verificar que a

Tabela 1. Grau alcoólico do vinho obtido de fermentação de mosto de melaço suplementado com sulfato de amônio. Expresso em % volume.

Nitrogênio adicionado ppm	Ciclos de fermentação				Médias
	1	2	3	4	
0	6,14	6,14	6,14	6,14	6,14
25	6,14	6,14	6,14	6,14	6,14
50	6,14	6,07	6,14	6,14	6,12
100	6,14	6,14	6,14	6,14	6,14

Teste F não foi significativo a  $p < 0,05$ .

Tabela 2. Ácido succínico do vinho obtido por fermentação de mosto de melaço suplementado com sulfato de amônio. Expresso em g/litro.

Nitrogênio adicionado ppm	Ciclos de fermentação				Médias
	1	2	3	4	
0	0,94	0,76	0,79	0,74	0,81a
25	0,92	0,76	0,59	0,66	0,73ab
50	0,89	0,67	0,54	0,60	0,67b
100	0,77	0,46	0,44	0,47	0,53c

Médias seguidas de letras diferentes diferem ao nível de  $p < 0,05$ .

C.V. = 23,43%.

adição de nitrogênio amoniacal provocou redução significativa na concentração do ácido succínico do vinho.

Os valores obtidos no presente trabalho foram inferiores aos citados por WHITING (1976) para cidra e vinho e superiores aos teores encontrados na cerveja.

Segundo OURA (1977) a produção de ácido succínico contribui para a redução da quantidade de etanol, via maior formação de glicerol. No presente trabalho, a redução do teor de ácido succínico de 0,81 para 0,53 g/litro não foi acompanhada pelo aumento do grau alcoólico (Tabela 1) provavelmente devido a menor sensibilidade do método empregado no presente trabalho para determinação do grau alcoólico.

A diminuição do teor de ácido succínico com o aumento da quantidade de nitrogênio amoniacal poderia ser explicada pelo desvio do ácido alfa-cetoglutárico, que é considerado segundo OURA (1977) o precursor do ácido succínico. O ácido alfa-cetoglutárico seria utilizado para a síntese do ácido glutâmico pela enzima desidrogenase glutâmica (LEHNINGER, 1988).

### CONCLUSÕES

Pelos resultados apresentados no presente trabalho podemos concluir que a suplementação de mosto de melação de cana com sulfato de amônio não afetou significativamente o grau alcoólico e reduziu o teor de ácido succínico durante a fermentação alcoólica.

### AGRADECIMENTOS

À FERMENTEC - Assessoria em Fermentação Alcoólica pelos recursos fornecidos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. *Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica*. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- COOTE, N. & KIRSOP, H. Content of some organic acids in beer and other fermented media. *Journal of the*

- Institute of Brewing*, London, 80: 474-82, 1974.
- DURO, F. & SERRANO, R. Inhibition of succinate production during yeast fermentation by desenergization of the plasma membrana. *Current Microbiology*, New York, 6: 111-3, 1981.
- HEERDE, E. & RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, Berlin, 117: 269-76, 1978.
- JAMES, J.B. Succini acid production by *Saccharomyces cerevisiae* under simulated vinification conditions. *Dissertation Abstracts B*, Ann Arbor, 44(7): 2071, 1984.
- KLAINZELLER, A. The formation of succinic acid in yeast. *Biochemical Journal*, London, 35: 495-501, 1941.
- LEHNINGER, A. *Princípios de bioquímica*. São Paulo, Sarvier, 1988. 723p.
- LUPIANEZ, J.A.; MACHADO, A.; CASTRO, I.; MAYOR, F. Succinic acid production by yeast grown under different hypoxic conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry*, The Hague, 3: 113-6, 1974.
- OURA, R. Reaction products of yeast fermentation. *Process Biochemistry*, London, 12: 19-21, 1977.
- PIMENTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. São Paulo, Nobel, 1985. 466p.
- ROUGHAN, P.G. & SLACK, C.P. Simple method for routine screening and quantitative estimation of oxalate content of tropical grasses. *Journal of Science of Food and Agriculture*, London, 24: 803-11, 1973.
- RUMSEY, T.S.; NOLLER, C.H.; BURNS, J.C.; KALB, K.; RHYKERD, C.L.; HILL, D.L. Gas chromatographic resolution of pyruvic, lactic, glyoxylic, oxalic, malonic, fumaric, malic, alpha-ketoglutaric and citric acids in forage and rumen fluid. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, 47: 1418-20, 1964.

THOUKIS, G.; UEDA, M.; WRIGHT, D. The formation of succinic acid during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, 16: 1-8, 1965.

WHITING, G.C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 82: 84-92, 1976.

---

Recebido para publicação em: 15.07.88

Aprovado para publicação em: 10.11.88