

Eng. Agr. Urgel de Almeida Lima

Assistente da Secção Técnica de Destilaria
do Instituto Zimotécnico

INFLUÊNCIA DO MANGANÊS SÔBRE
CRESCIMENTO E ATIVIDADES DO
Saccharomyces cerevisiae



Tese apresentada para o concurso de doutoramen
à Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiro
da Universidade de São Paulo

— Outubro de 1953 —

125

ÍNDICE GERAL

Pgs.

1 - FINALIDADES	1
2 - INTRODUÇÃO	1
3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA	2
Metais	5
Metaloides	5
Métodos analíticos	6
Preparo da amostra	6
Umidade	6
Sólidos totais	6
Matérias protéicas	6
Matérias graxas	6
Matérias celulósicas	6
Matérias extrativas não nitrogenadas	6
Matérias minerais	7
Fósforo	7
Potássio	7
Magnésio	7
Sódio	7
Cálcio	7
Sílica	7
Sulfatos	7
Ferro	7
Alumínio	7
Cloretos	7
Manganês	7
4 - DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA EM PRESENÇA DE MANGANÊS	7
a - Material e método	7
b - Resultados obtidos	9
c - Exame microscópico	11
d - Exame macroscópico e influencia do manganês na pigmentação das colônias	12
5 - INFLUÊNCIA DO MANGANÊS NA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DA LEVEDURA	12
Redução do azul de metileno e do carmim índigo	14
6 - METABOLISMO DOS AÇÚCARES	18
Produção de gás em presença de doses crescentes de manganês	24
7 - AÇÃO DO MANGANÊS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	26
8 - CONCLUSÕES	28
9 - BIBLIOGRAFIA	30



I - FINALIDADES

A principal finalidade do presente trabalho é satisfazer a primeira exigência da carreira universitária no Brasil, que é a defesa de tese para obtenção do honroso título de doutor.

Ao apresentá-lo para julgamento público, queremos explicar que não foi ao azar que escolhemos a levedura alcoólica para objeto de nossas observações.

A indústria do álcool etílico no Brasil está deixando os domínios da rotina, do mero aproveitamento da matéria prima em excesso e da ignorância técnica. Floresce e tende a crescer continuamente em importância. O Saccharomyces cerevisiae será sempre o órgão impulsor dessa indústria. Todo conhecimento acumulado em relação à sua vida, em geral, terá como consequência um aumento no rendimento da máquina industrial.

Outra finalidade é trazer à melhor apreciação da egrégia banca examinadora os resultados originais por nós obtidos, como uma modesta contribuição ao palpitante assunto da Influência do manganês sobre o crescimento e atividades da levedura alcoólica.

2 - INTRODUÇÃO

A intensa pesquisa bibliográfica que efetuamos na literatura nacional e internacional nos revelou que inúmeros são os trabalhos publicados sobre a influência dos elementos metálicos sobre fungos, leveduras e bactérias. Entretanto, pouco ou quasi nada se encontra sobre a influência do manganês na levedura alcoólica.

Por isso, atraídos por esse problema que nos pareceu de capital importância, decidimos estudar a reação do Saccharomyces cerevisiae em meios nutritivos contendo manganês e desprovidos dele.

O nosso objetivo principal foi determinar:

- a) - a importância do manganês nos fenômenos de crescimento e respiratórios do Saccharomyces cerevisiae;
- b) - a influência do manganês no metabolismo dos compostos ternários e na fermentação alcoólica.

Preliminarmente, estudamos, em caixa de Petri, o desenvolvimento e o aspecto macroscópico das colônias da levedura em relação à diferentes concentrações de manganês, administrado na forma de $MnSO_4$. Posteriormente, estudamos os fenômenos de óxido-redução com azul de metileno e carmim índigo, os de metabolismo da levedura em exame. Por fim, em fermentações de caldo de cana e de mel final da Usina Monte Alegre, completamos nossas observações.

Para maior facilidade de exposição e de realização dêste trabalho, achamos conveniente dividi-lo nas seguintes partes:

- 1 - Finalidades
- 2 - Introdução
- 3 - Composição química da levedura
- 4 - Desenvolvimento da levedura em presença de manganês
- 5 - Influência do manganês na atividade respiratória da levedura
- 6 - Metabolismo dos açúcares
- 7 - Ação do manganês na fermentação alcoólica
- 8 - Conclusões
- 9 - Bibliografia.

Em tôdas as nossas observações usamos uma raça de levedura perfeitamente identificada, suficientemente revigorada. É procedente da Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, catalogada sob nº NRRL-Y 1.347 e existente na Micoteca do Instituto Zimotécnico sob registro IZ-2.

3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA

A composição química da levedura é extremamente variável. Depende da raça, da idade, e das condições em que é mantida a cultura. A chave de seu conhecimento é a análise química que nos dará, também, indicação segura dos alimentos que deverão estar presentes nos meios nutritivos, bem como servirá de base para a correção dos mostos nas indústrias de fermentação em geral.

O organismo vivo é construído e mantido à custa das substâncias alimentares absorvidas; daí, a importância da análise química para o conhecimento das necessidades nutricionais. Não se deve no entanto, afirmar que tôdas as substâncias encontradas analiticamente tenham presença essencial nos meios nutritivos.

A determinação da composição química da levedura efetua-se por meio de corantes seletivos ou por meio de separação. A determinação da quantidade dos componentes exige, porém, métodos padronizados e complexos.

A análise química quantitativa é tarefa das mais difíceis, tendo-se em vista:

- a - a imperfeição dos métodos analíticos usados quando da verificação de concentrações muito diminutas de certos compostos inorgânicos presentes;
- b - as alterações que podem sofrer os compostos orgânicos no decurso dos processos analíticos;

c - os fatores que interferem na vida do organismo, influenciando normal e diretamente na sua composição química.

Ao pensarmos em estudar a influência do manganês no desenvolvimento do Saccharomyces cerevisiae, julgamos de bom alvitre iniciarmos nossos estudos, determinando previamente a composição do organismo em observação, pois a possível presença deste elemento em quantidades ponderáveis afetaria naturalmente a marcha das pesquisas.

A falta de dados na literatura nacional, o número relativamente escasso de análises químicas completas de levedura alcoólica na literatura internacional e a não existência da composição química da levedura IZ-2, concorreram também para essa deliberação.

Relembrando a influência dos fatores que fazem variar a composição química do organismo vivo e as dificuldades analíticas inerentes, chamamos a atenção para o fato de que os números por nós encontrados e especificados a seguir, são naturalmente apenas indicativos.

Composição química do Saccharomyces cerevisiae

Água	78,13 %
Sólidos totais	26,87 %

A matéria seca encerra:

Matérias protéicas	14,51 %
Matérias graxas	3,36 %
Matérias celulósicas	0,10 %
Matérias extrativas não nitrogenadas (p.d.)	5,20 %
Matérias minerais	3,70 %

Característica fundamental de todos os microorganismos é a grande riqueza em água. A levedura não foge a esta regra. Contém alta percentagem de água, sendo conseqüentemente pobre em matéria seca. A água celular em parte é combinada com as substâncias químicas existentes e, por outro lado, é livre, tomando parte ativa no mecanismo osmótico. Não conhecemos critério analítico para separá-las.

Os sólidos totais, obtidos por eliminação da água são constituídos por substâncias orgânicas e minerais.

As substâncias orgânicas são constituídas principalmente de proteínas, carboidratos e lipídeos. A literatura cita ainda ácidos orgânicos, enzimas, toxinas e vitaminas.

As proteínas, parte essencial da matéria vivente, ocupam o primeiro lugar na constituição química da matéria seca da levedura. A literatura refere-se a vários tipos de proteínas, livres ou em com

binação com carboidratos e lipídeos. Não é da alçada deste trabalho discutí-las. Não nos preocupamos também em determiná-las.

Os extrativos não nitrogenados, em sua maior parte carboidratos, ocupam o segundo lugar na ordem percentual da composição química dos sólidos totais.

Em seguida vêm as matérias graxas.

Os hidrocarbonados e os corpos graxos constituem os elementos de reserva da célula. Variam percentualmente de acordo com os vários estágios da vida da levedura, desenvolvimento, reprodução, fermentação, etc.

Pela incineração da levedura úmida, a água evapora-se e a matéria orgânica desaparece por combustão, restando apenas as matérias inorgânicas, minerais ou cinzas.

Analisadas, as cinzas revelaram a seguinte composição percentual, expressa ponderalmente em ordem decrescente:

Fósforo (P2O5)	50,41 %
Potássio (K2O)	31,07 %
Magnésio (MgO)	3,46
Sódio (Na2O)	1,28
Cálcio (CaO)	0,94
Sílica (SiO2)	0,52
Sulfatos (SO3)	0,37
Ferro (Fe2O3)	0,23
Alumínio (Al2O3)	0,07
Cloretos (Cl)	0,03
Manganês (Mn2O3)	traços

Dos elementos minerais, destacam-se: fósforo, potássio, magnésio, sódio, cálcio, silício e enxôfre que podem ser considerados como elementos primordiais ao desenvolvimento normal da levedura.

Do ponto de vista quantitativo o elemento mais importante é o fósforo. Sua alta percentagem é a principal responsável pela reação ácida da levedura.

Outros elementos existem ainda em mínimas frações, podendo desempenhar relevante importância nas atividades morfológicas, biológicas e fisiológicas da levedura.

Certas substâncias minerais exercem sobre o desenvolvimento da levedura e sua potência fermentativa uma verdadeira ação de excitante, como é o caso dos sais de manganês e os fluoretos em geral (Almeida).

Em síntese, conclue-se dos dados analíticos apresentados, que a levedura tem necessidade de água, de compostos hidrocarbonados, nitrogenados e minerais para garantir suas atividades biológicas e fisiológicas. Entretanto, é preciso dizer mais uma vez, que nem todas as substâncias que ocorrem em um organismo cultivado são absolutamente essenciais ao seu desenvolvimento. É o caso do cálcio, por exemplo, que para muitas bactérias e fungos não constitui elemento imprescindível. É por meio de experiências com meios de culturas puros e adequados que se pode verificar, de fato, quais as substâncias que devem estar presentes num mosto para assegurar o desenvolvimento normal da levedura.

BERTRAND estudou cuidadosamente a composição química da matéria viva e acabou por concluir que os microorganismos encerram 29 elementos, sendo 16 metais e 13 metalóides, como se pode ver a seguir:

Metais:

Cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro, zinco, cobre, níquel, cobalto, manganês, alumínio, chumbo, estanho, molibdênio, vanádio e titânio.

Metalóides:

Carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxôfre, fósforo, cloro, fluor, bromo, iodo, boro, arsênio e silício.

Encontram-se, também, embora nem sempre de maneira constante, rubídio, cézio, lítio, bário, estrôncio, prata e cromo. Porém, apenas 11 elementos dentre os metais e metalóides constituem, do ponto de vista quantitativo, a quasi totalidade (99,95 %) do corpo dos microorganismos. São eles: carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxôfre, fósforo, cloro, cálcio, magnésio, potássio e sódio.

O restante dos elementos aparecem em partes infinitesimais. Mesmo assim, como já tivemos oportunidade de afirmar, podem revelar grande importância na vida do microorganismo.

Para se ter uma idéia da composição elementar da levedura de cerveja, basta examinar os dados seguintes, obtidos por diferentes pesquisadores, relativos à matéria seca:

Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio	Oxigênio+enxofre+fósforo	Analistas
30,5 %	4,5 %	7,6 %	45,4 %	Marcet
50,6	7,3	15,0	27,1	Dumas
49,8	6,7	12,4	31,1	Schlessberger
47,0	6,6	10,0		Mitscherlich

Métodos analíticos

Os métodos analíticos por nós empregados na determinação da composição química da levedura foram os oficiais A.O.A.C., conforme se especifica em continuação

Preparo da amostra

Inoculamos um mosto de caldo de cana esterilizado, filtrado e diluído a 5º Brix. Multiplicamos a levedura por aerobiose repetidas vezes até obter uma quantidade de células suficiente para os trabalhos analíticos. Separamos o vinho por decantação. Lavamos o resíduo várias vezes com água bi-destilada. Decantamos e filtramos em placa porosa, sob vácuo. O resíduo de células, de cor levemente creme, seco ao ar, foi submetido à análise depois de bem uniformizado por meio de uma espátula de porcelana.

UMIDADE

Determinada por secagem direta de 2 g do material em estufa a vácuo, até peso constante.

Sólidos totais

Calculados por diferença, pela expressão: 100 - umidade.

Matérias protéicas

Calculadas do nitrogênio total determinado segundo o método clássico de Kjeldahl modificado, multiplicando os resultados pelo fator 6,25.

Matérias graxas

Determinadas com éter de petróleo em extrator de Soxhlet durante 4 horas, usando-se o resíduo seco da determinação da umidade.

Matérias celulósicas

Determinada por digestão sucessiva do resíduo da matéria graxa com ácido sulfúrico a 1,25 % e hidróxido de sódio a 1,25 %, representando-se a perda de peso como celulose.

Matérias extrativas não nitrogenadas

Calculadas por diferença.

Matérias minerais

Determinadas pelo método de Piper.

Fósforo

Determinado por precipitação com molibdato de amônio e titulação final com HNO_3 n/10 usando fenolftaleína como indicador.

Potássio

Determinado por precipitação com ácido perclórico.

Magnésio

Determinado gravimetricamente na forma de $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

Sódio

Calculado por diferença.

Cálcio

Determinado por precipitação com oxalato de amônio em presença de vermelho de metila e titulação posterior com KMnO_4 n/10 a 70°C em meio sulfúrico.

Sílica

Determinada por insolubilização segundo o método oficial britânico.

Sulfatos

Dosados por precipitação com BaCl_2 a 10 % e pesagem na forma de BaSO_4 .

Ferro

Dosado por titulação com bi-cromato de potássio, usando difenilamina como indicador.

Alumínio

Determinado por titulação com NaOH n/10 em presença de bromotimol azul.

Cloretos

Dosados por titulação com tiocianato de potássio n/10 em meio nítrico, com indicador férrico.

Manganês

Determinado segundo o processo do bismutato de sódio.

4 - DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA EM PRESENÇA DE MANGANÊS

a - Material e método

Em sequência ao estudo da determinação da composição química do Saccharomyces cerevisiae, procuramos verificar, macroscópica e microscópicamente, a eventual diferença de desenvolvimento desta

levedura em solução nutritiva desprovida de manganês e em soluções com doses crescentes do cationio em aprêço.

O primeiro cuidado foi escolher um meio líquido propício à vida da levedura. Optamos pelo seguinte:

Água bi-destilada	1.000,00 ml
KHSO ₄ p.p. a	1,00 g
MgSO ₄ p.p. a	0,50 g
(NH ₄) ₂ SO ₄ p.p. a	0,50 g
FeCl ₃ p.p. a	0,01 g
Glucose p.p. a	20,00 g

À esta solução nutritiva básica, adicionamos 1 gota de ácido fosfórico, 1,5 ml de vinhaça e MnSO₄ desde 0,001 g até 50 g por litro, de acôrdo com as especificações abaixo discriminadas.

As culturas foram feitas em balões de vidro Pyrex de 250 ml, numerados de 1 a 69 e divididos em 4 séries.

Os balões da primeira série, de 1 a 22, receberam concentrações de 0,001 g de MnSO₄ por litro (balão 1) até 0,1 g de MnSO₄ por litro (balão 21). As quantidades intermediárias cresciam de .. 0,005 g por balão, tomando-se o de número 22 para testemunha isento, portanto, de manganês.

Os balões da segunda série, de 23 a 41, receberam doses de 0,15 g de MnSO₄ por litro (balão 23) até 1 g de MnSO₄ por litro (balão 40). As doses intermediárias cresciam de 0,05 g por balão, sendo o de número 41 reservado como testemunha.

Os balões da terceira série, de 42 a 60, receberam doses de 1,5 g de MnSO₄ por litro (balão 42) até 10 g de MnSO₄ por litro (balão 59). As doses intermediárias cresciam de 0,5 g de MnSO₄ por balão. Reservamos o de número 60 para testemunha.

Os balões da quarta série, de 61 a 69, receberam doses de 15 g de MnSO₄ por litro (balão 61) até 50 g de MnSO₄ por litro (balão 68). As doses intermediárias cresciam de 5 g de MnSO₄ por balão, separando-se o de número 69 para testemunha.

Os balões receberam princiramente 100 ml da solução nutritiva básica e, posteriormente, as doses correspondentes de MnSO₄. Após a uniformização do volume com água bi-destilada, foram tamponados com algodão e esterilizados em autoclave a 1 atmosfera durante 20 minutos. Retirados do autoclave, depois de frios, foram inoculados com 2 ml de uma suspensão do lêvedo alcoólico. Agitados, foram a seguir, deixados em repouso durante 15 dias, anotando-se as obser

vações macroscópicas cada 3 dias. Todos os balões foram conservados em estufa Precision, à temperatura de 28°C, o mais constante possível.

b - Resultados obtidos

Chegamos aos seguintes resultados, depois do 3º dia da inoculação:

- 1 - Os balões numerados de 1 a 21, correspondentes às concentrações extremas de 0,001 a 0,1 g de $MnSO_4$ por litro, apresentavam sinais evidentes de boa fermentação, com visível desprendimento de bolhas de CO_2 , regular depósito de células e solução nitidamente turva. Praticamente não houve diferença entre as culturas dessa série, com exceção da do número 1 que apresentou maior intensidade fermentativa;
- 2 - Os balões 22, 41, 60 e 69 que não receberam adição de $MnSO_4$ e, portanto, funcionaram como testemunhas, se apresentavam absolutamente iguais entre si. Em relação aos de números 1 a 21 revelaram-se com muito menor desenvolvimento;
- 3 - Os balões de números 23 a 40 apresentavam-se com turbidez e depósito em quantidade decrescente entre si, com desenvolvimento inferior às testemunhas e a todos os balões da primeira série;
- 4 - Do número 42 ao 59, cujas doses variaram de 1,5 g até 10 g de $MnSO_4$ por litro o desenvolvimento das culturas foi praticamente nulo;
- 5 - A última série, de números 61 a 68, referentes às doses de 15 g a 50 g de $MnSO_4$ por litro o desenvolvimento foi absolutamente nulo, mantendo-se o líquido completamente límpido como antes da inoculação.

Foram registradas as seguintes observações depois do 6º dia da inoculação:

- 1 - Até o balão 21 todas as culturas haviam se desenvolvido muito bem e se apresentavam sem bolhas de CO_2 , revelando aparente término da fermentação alcoólica. Esta foi rápida, porém, não tumultuosa. O depósito branco de fermento observado no fundo dos balões era mais ou menos idêntico para toda a série, com exceção do balão de número 1 que, distinguindo-se desde o início, acusou depósito mais denso. Embora turvos, não se notou nenhum véu superficial, característico da forma aeróbica do fermento;
- 2 - As testemunhas continuavam com evidentes sinais de fermentação que se revelou mais lenta que nas culturas correspondentes aos

balões da 1ª série, tratadas com pequenas doses de manganês. Entre elas não se notou nenhuma diferença;

- 3 - Do balão 23 ao 48, o desenvolvimento continuou muito lento, enquanto que para o restante das culturas nada houve a anotar além das observações feitas após o 3º dia da inoculação.

Do exame das culturas inoculadas há 9 dias verificamos o seguinte:

- 1 - Nada de novo nos balões da primeira série, de 1 a 21, em culturas tratadas com pequenas e crescentes doses de manganês;
- 2 - As testemunhas, correspondentes aos balões 22, 41, 60 e 69, com mínima quantidade de bolhas, mostravam-se no fim da fermentação;
- 3 - Os balões de 23 a 29 revelaram progresso na fermentação, acusando mais bolhas que nas observações dos dias anteriores e maior turbidez da solução nutritiva;
- 4 - As culturas dos balões 30 a 48 continuaram em desenvolvimento muito lento não se notando nenhum progresso na fermentação;
- 5 - Praticamente nulo o desenvolvimento da levedura nos demais balões de números 49 a 68.

Depois do 12º dia da inoculação fizemos observações macroscópicas, anotando os seguintes fatos:

- 1 - Em todos os balões da primeira série, de 1 a 21, desapareceram completamente os sinais de fermentação, apresentando o meio nutritivo sobrenadante ao depósito de células de fermento, completamente límpido. Nenhum véu superficial foi observado;
- 2 - Nos testemunhas desapareceram as bolhas de gás e começou a decantação do fermento em suspensão na solução nutritiva, evidenciando assim a paralização da fermentação alcoólica;
- 3 - Os balões de números 23 e 24 se apresentaram com denso depósito de células e com a fermentação praticamente concluída;
- 4 - Nos balões de números 25 ao 49 notou-se maior turbidez e maior depósito de fermento que nas observações anteriores, nitidamente decrescentes em ordem numérica;
- 5 - As culturas correspondentes aos números superiores até o 68 apresentavam-se a olho nú, sem desenvolvimento apreciável.

A última observação feita depois de 15 dias da inoculação da solução nutritiva, revelou-nos os seguintes resultados:

- 1 - Todas as testemunhas e os balões de 1 a 24 com fermentação completamente paralizada, não acusando a presença nítida de véu superficial;

- 2 - Dos números 25 a 49 grande aumento na turbidez da solução, maior depósito de células e progresso evidente no processo fermentativo, evidenciado pelo maior desprendimento de bolhas de CO₂;
- 3 - Dos balões 50 a 59 notou-se nítido início de fermentação devido ao aparecimento de turbidez no líquido até então completamente límpido;
- 4 - Os balões de números 61 a 68 com desenvolvimento ainda praticamente nulo.

Do exame destas observações conjuntas, chega-se à conclusão de que o manganês quando presente num mosto, em pequenas doses, favorece e estimula o desenvolvimento da levedura, acelerando a fermentação alcoólica.

As doses mais aconselháveis, são justamente as ponderavelmente menores e compreendidas entre os limites de 1 a 10 miligramas de MnSO₄ por litro. O limite máximo, não prejudicial ao rápido desenvolvimento e à velocidade de fermentação, está compreendido entre 90 e 100 miligramas de MnSO₄ por litro. Com concentrações superiores a 100 e limitadas a 200 miligramas de MnSO₄ por litro, a levedura se multiplica com dificuldade. O desdobramento do açúcar é muito lento, porém completo, deixando no fundo dos frascos, um depósito denso, sadio, de cor creme, de células de levedura.

A levedura apresenta extraordinária resistência a elevadas concentrações de MnSO₄, pois se multiplica em culturas contendo até 10 g de MnSO₄ por litro de solução nutritiva, embora a fermentação não se complete mesmo depois de 15 dias post-inoculação.

Acima de 10 gramas de MnSO₄ por litro, ficamos com a impressão de que a levedura não se multiplicava, mas provavelmente tomava a forma de resistência esporulando-se. Pelo exame microscópico realizado posteriormente verificamos não ser verdadeira esta impressão.

Nos ensaios realizados, a levedura não assumiu a forma aeróbica, uma vez que não notamos a formação nítida de véu superficial em nenhuma das 69 culturas preparadas e examinadas durante os 15 dias que se seguiram à inoculação dos meios de cultura. Concluiu-se que o manganês não favorece o desenvolvimento aeróbico do Saccharomyces cerevisiae.

c - Exame microscópico

Procedendo ao exame microscópico de todas as culturas ensaiadas, resumimos em continuação os resultados a que chegamos no

15º dia após a inoculação dos meios de cultura:

- 1 - De 1 a 24:- grande abundância de células de forma esférica ou a longada, poucas em gemação e presença de reduzido número de células mortas;
- 2 - De 25 a 50:- abundância de células, grande atividade multiplicativa e número muito reduzido de células mortas;
- 3 - De 51 a 59:- menor número de células, franca atividade multiplicativa e número reduzido de células mortas;
- 4 - De 61 a 68:- número reduzido de células, muito poucas células em gemação, ausência absoluta de esporos (método de Wirtz) e número apreciável de células mortas;
- 5 - Testemunhas, 24, 41, 60 e 69:- abundância de células, muitas em gemação e grande número de células mortas;

Estas observações vieram confirmar quase integralmente as feitas precedentemente, sem auxílio do microscópio.

d - Exame macroscópico e influência do manganês na pigmentação das colônias

Terminado o exame microscópico de todos os balões, para controlar as observações macroscópicas então efetuadas sobre o desenvolvimento da levedura, procuramos também estudar a influência do manganês na pigmentação do Saccharomyces cerevisiae

Em 69 caixas de Petri, esterilizadas, correspondentes ao número de culturas em exame, foi colocada uma alça de platina de cada cultura depois de agitado o conteúdo dos balões. A seguir adicionou-se o meio sólido de batata, dextrose e agar. Usamos o meio PDA (potato, dextrose, agar) preconizado pela American Type Culture Collection, catalogado no Instituto Zimotécnico sob número IZ-26.

Depois do desenvolvimento das colônias pudemos constatar que o manganês não influe na pigmentação da levedura mesmo em doses elevadas. Em tôdas as caixas de Petri desenvolveram-se colônias em número variável, mas tôdas arredondadas, brilhantes e de cor creme característica.

5 - INFLUÊNCIA DO MANGANÊS NA ATIVIDADE RESPIRATÓRIA DA LEVEDURA

Geralmente nos referimos à respiração como sendo o fenômeno de absorção de oxigênio e desprendimento de gás carbônico e vapor d'água em reação exotérmica.

VERONA assim se refere à respiração:

20/1

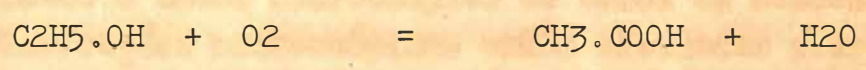
"A oxidação mais ou menos veloz e completa dos materiais termodinâmicos, constitui o ato da respiração. Nela se determina uma reação exotérmica devida ao desdobramento, até completa demolição, de substâncias especiais. Intervindo o oxigênio, há uma verdadeira combustão da qual derivam, em último termo, gás carbônico e vapor d'água e, ao mesmo tempo, liberta certa soma de energia.

O processo respiratório exige a presença de oxigênio, mas não é obrigatório que seja o de reserva da atmosfera. Muitos esquizomicetos não toleram, mesmo em traços, a presença de oxigênio livre e, neste caso, a produção de energia não pode se dar a não ser à custa do oxigênio derivado de sua combinação. Neste caso a respiração é dita anaeróbica.

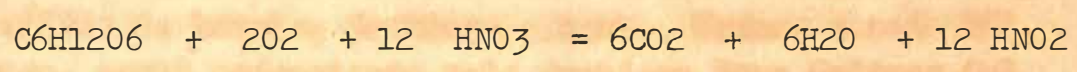
No caso da respiração aeróbica há uma verdadeira e própria oxidação enquanto que na respiração anaeróbica encontramos um processo óxido-redutivo.

Mais exatamente, a reação respiratória pode se referir a três tipos distintos:

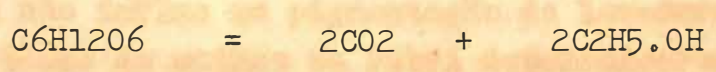
- 1 - Intervenção direta do oxigênio atmosférico como na oxidação do álcool sob a ação do acetobacter:



- 2 - Não intervenção do oxigênio livre, mas de compostos oxigenados que são reduzidos com conseqüente oxidação do material termodinamogênico, como se verifica no caso de bactérias que reduzem os nitratos e oxidam os carboidratos:



- 3 - Reação intramolecular pela qual um determinado composto é em parte oxidado e, em parte reduzido como na fermentação alcoólica da glucose:



A respiração nas leveduras é aeróbica como nos outros organismos, com absorção de oxigênio e desprendimento de CO₂. O volume de oxigênio absorvido em relação à unidade de tempo e massa nos dá a noção da intensidade do ato respiratório.

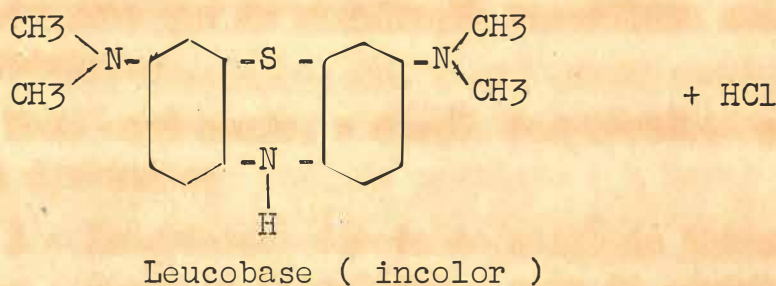
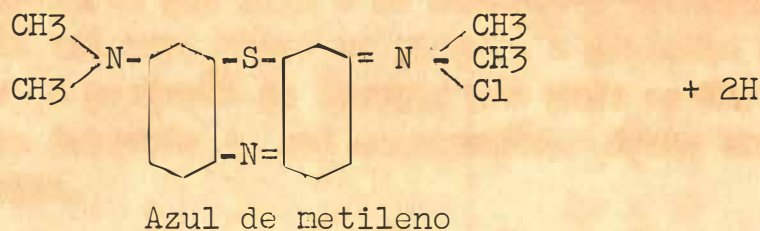
Ele varia de espécie para espécie e, entre os da mesma raça, varia em relação à uma série de fatores externos físicos e químicos".

A inclusão do catiônio manganês num meio de cultura desti-

nado à levedura, cria condições especiais que agem benêficamente sôbre a intensidade respiratória dêsse microorganismo.

Segundo SALLE, "um composto pode ser oxidado pela transferência de hidrogênio ou electrons de um doador para um receptor. A redução de um composto resulta na oxidação de outros.

O azul de metileno age como receptor de hidrogênio e na sua forma reduzida êle perde a sua cor":



Além do azul de metileno outros corantes têm a propriedade de se transformar em uma leucoforma, sendo a velocidade de seu descoloramento proporcional à intensidade respiratória.

Para verificarmos a influência do manganês sôbre a atividade respiratória do Saccharomyces cerevisiae, lançamos mão do processo clássico de óxido-redução, também usado por SERENI nos seus estudos sôbre a influência do magnésio no Saccharomyces cerevisiae, Hansen e alguns fungos.

Em nossos trabalhos usamos o azul de metileno e o carmin índigo e nossas observações se conduziram da maneira exposta em continuação:

Redução do azul de metileno e do carmin índigo

Cultivamos o fermento em balões Pyrex de 250 ml., contendo 100 ml. da solução nutritiva básica, com doses crescentes de MnSO₄. Estas doses variaram de 0,001 até 50 gramas por litro.

Depois de esterilizados e frios, inoculamos todos os balões com igual volume de uma suspensão padrão de levedura, previamente preparada. A seguir, adicionamos em uma série de balões 0,2 ml de uma solução de azul de metileno a 0,01% e, em outra, igual quantidade de uma solução de carmin índigo a 0,1%. Anotamos o tem-

Adis

po de redução total, após agitação para uniformização da coloração. Todos os balões foram mantidos em estufa Precision, provida com termostato regulador, conservada o quanto possível a uma temperatura constante de 28° C.

Chegamos aos seguintes resultados, média de várias observações, quando da adição do corante no mesmo dia da inoculação:

Balões	Concentração de MnSO ₄	Tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmin índigo
1 a 21	0,001 a 0,100 g/litro	3 a 4	4 a 5
23 a 40	0,150 a 1,000 g/litro	5 a 15	6 a 18
42 a 50	1,500 a 10,000 g/litro	18 a 35	20 a 49
61 a 68	15,000 a 50,000 g/litro	40 a 60	52 a 72
22-41-60-69	Testemunhas sem MnSO ₄	3 a 6	3 a 6

A dose correspondente à uma concentração de 0,01 g de MnSO₄ por litro foi a que acusou redução mais rápida, com 3 horas para um descoramento total com azul de metileno e 4 horas com carmin índigo.

Adicionando-se o corante depois de 3 dias da inoculação, verificamos em nova série de vasos, perfeita concordância das observações anteriores. Em outras palavras, ficou confirmado que pequenas doses de MnSO₄ ativam os fenômenos respiratórios da levedura acelerando a redução do azul de metileno e do carmin índigo. Excedendo-se certo limite, os resultados mostram sensível diminuição da atividade respiratória. A dose de 0,01 g de MnSO₄ por litro foi a mais favorável à esta série de ensaios. Ficou demonstrado, novamente, que a levedura cultivada na solução nutritiva em ausência completa de manganês respira mais lentamente, retardando os fenômenos de redução dos corantes empregados. Os balões testemunhas compararam-se, em resultados, aos dos balões contendo doses correspondentes de 0,001 a 0,6 g de MnSO₄ por litro.

As médias das observações feitas permitiram a construção do quadro seguinte:

Balões	Concentrações de MnSO ₄	Tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmin índigo
1a 21	0,001 a 0,100 g/litro	2 a 4	4 a 5
23 a 40	0,150 a 1,000 g/litro	4 a 12	5 a 16
42 a 59	1,500 a 10,000 g/litro	15 a 31	18 a 43
61 a 68	15,000 a 50,000 g/litro	40 a 57	47 a 70
22-41-60-69	Testemunhas sem MnSO ₄	3 a 5	3 a 5

124

Depois de 9 dias de inoculação adicionamos o corante, nas mesmas condições anteriores, à nova série de vasos. As observações feitas à posterior, nos levaram, praticamente aos mesmos resultados até então obtidos nas outras séries, de ensaios. Confrontando os dados dos ensaios realizados, chegamos aos números do quadro seguinte os quais representam valores médios:

Balões	Concentrações de MnSO ₄	Tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmin índigo
1 a 21	0,001 a 0,100 g/litro	2 a 3	3 a 4
23 a 40	0,150 a 1,000 g/litro	4 a 10	5 a 12
42 a 59	1,500 a 10,000 g/litro	12 a 29	13 a 36
61 a 68	15,000 a 50,000 g/litro	38 a 56	44 a 68
22-41-60-69	Testerunhas sem MnSO ₄	2 a 4	3 a 5

Repetindo os mesmos ensaios com os meios inoculados há 12 dias e mantidos sempre em estufa a 28°C, obtivemos indicações idênticas.

O tempo de inoculação afeta naturalmente um pouco a intensidade respiratória da levedura. Assim sendo, o estudo dos fenômenos de óxido-redução para determinar esta intensidade de respiração, parece-nos, deverá ser feito sempre depois do 9º dia de inoculação, quando o descoramento é mais nítido e mais rápido.

A dilatação do prazo para a redução total se verifica, com maior nitidez, quando as doses de sulfato de manganês ultrapassam o limite de 1 g por litro de solução nutritiva. Para as doses pequenas, de 0,001 até 0,15 g de MnSO₄ por litro não é muito sensível a alteração no tempo da redução. Mais uma vez achamos que entre 0,01 e 0,015 g de MnSO₄ por litro, a atividade respiratória da levedura é mais intensa.

Resumimos no quadro abaixo as médias das nossas observações:

Balões	Concentrações de MnSO ₄	Tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmin índigo
1 a 21	0,001 a 0,100 g/litro	2 a 3	3 a 4
22 a 40	0,150 a 1,000 g/litro	4 a 8	5 a 10
42 a 59	1,500 a 10,000 g/litro	11 a 27	12 a 33
61 a 68	15,000 a 50,000 g/litro	36 a 53	43 a 65
22-41-60-69	Testerunhas sem MnSO ₄	2 a 5	3 a 5

Depois de 15 dias de inoculação ensaiamos, também, o efeito das doses crescentes de MnSO₄ sobre a atividade respiratória do

Saccharomyces cerevisiae medida com auxílio das soluções de azul de metileno a 0,01% e carmin índigo a 0,1% pelo processo de óxido-redução. Conforme se vê abaixo discriminada, há notável concordância com os demais resultados obtidos nas várias épocas de inoculação estudadas.

Balões	Concentrações de MnSO ₄	tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmin índigo
1 a 21	0,001 a 0,100 g/litro	1 a 2	2 a 3
22 a 40	0,150 a 1,000 g/litro	3 a 6	5 a 8
42 a 59	1,500 a 10,000 g/litro	10 a 22	10 a 29
61 a 68	15,000 a 50,000 g/litro	34 a 52	42 a 60
22-41-60-69	Testemunhas sem MnSO ₄	2 a 3	2 a 4

Deante dos resultados obtidos nestes ensaios, para maior certeza resolvemos realizar novas observações. Reduzimos o número de unidades a examinar e fizemos a cultura de levedura em tubos de ensaio contendo 20 ml da solução nutritiva básica. Mantivemos os tubos em exames a uma temperatura de 28°C o mais constante possível.

Cada série era constituída por 24 tubos de ensaio Pyrex contendo a solução nutritiva com doses crescentes de MnSO₄, desde 0,001 até 50 g por litro distribuída de acôrdo com o especificado no quadro seguinte. Os tubos de nº 1 não receberam manganês. Esterilizados, foram inoculados depois de frios com 1 ml de uma suspensão de levedura. Esta era preparada sempre nas mesmas condições em todos os ensaios para guardar, o quanto possível, uma uniformidade no número de células por volume de lêvedo tomado.

Depois de inoculados foram mantidos durante 10 dias na estufa, a 28°C, após o que, os tubos de cada série receberam, respectivamente, a adição de duas gotas das soluções de azul de metileno a 0,01% e carmin a 0,1%

Os resultados obtidos estão consignados no quadro abaixo:

Nº dos tubos	MnSO ₄ em g/litro	Tempo de redução em horas	
		Azul de metileno	Carmim índigo
1	Testemunha	2 e 30 min	3
2	0,001	1 e 30 min	2
3	0,005	1 e 20 min	2
4	0,010	1	1 e 30 min
5	0,020	1	1 e 20 min
6	0,030	1 e 20 min	1 e 30 min
7	0,040	1 e 10 min	2
8	0,050	1 e 20 min	2 e 20 min
9	0,060	1 e 20 min	2 e 40 min
10	0,070	1 e 40 min	2 e 30 min
11	0,080	1 e 30 min	2 e 50 min
12	0,090	1 e 50 min	2 e 40 min
13	0,100	2 e 30 min	2 e 30 min
14	1,000	8	10
15	5,000	12	14 e 30 min
16	10,000	25	35
17	15,000	32	40
18	20,000	36	42
19	25,000	38	42 e 30 min
20	30,000	42	50
21	35,000	40	53
22	40,000	54	60
23	45,000	50	63
24	50,000	56	64

Chegamos à conclusão, pelo exame dos dados obtidos, que a atividade respiratória da levedura medida pelos fenômenos de óxido-redução com azul de metileno e carmim índigo, em ausência completa de manganês é bastante fraca; acelera com doses reduzidas de manganês com preendidas entre 0,001 até 0,1 g por litro; é máxima entre os limites de 0,01 a 0,05 g de MnSO₄ por litro, retardando em presença de concentrações de MnSO₄ superiores a 1 grama por litro. Êste retardamento é diretamente proporcional à concentração.

Com o carmim índigo o tempo de redução revelou-se sempre mais elevado em relação ao apresentado pelo azul de metileno.

Por se tratar de um meio nutritivo artificial, cujo pH não era completamente favorável à reação de óxido-redução, não conseguimos uma redução absolutamente completa do azul de metileno nos ensaios onde a concentração em MnSO₄ era elevada, porém, obtivemos sempre um descoramento mais que suficiente para os fins desejados.

6 - METABOLISMO DOS AÇÚCARES

Com o fim de determinar até que ponto o manganês influencia sobre a facilidade da levedura consumir maior ou menor quantidade de açúcar, cultivamos o fermento em soluções nutritivas privadas e contendo quantidades variadas de MnSO₄.

Empregamos a mesma solução nutritiva básica, variando apenas a quantidade de açúcar e usando vários açúcares em ensaios conse

2/11

cutivos, Repetimos tratamento idêntico com caldo de cana e com mel final da Usina Monte Alegre, dos quais determinamos os açúcares totais fermentiscíveis pelo processo de inversão e posterior redução segundo o clássico método de Eynon-Lane.

No estudo do metabolismo dos compostos ternários, pesquisamos os 3 fatores principais:

- a - demolição dos açúcares;
- b - mudança de acidez do meio;
- c - produção de gás em presença de doses crescentes de manganês.

Para a realização destes ensaios procedemos, para os dois primeiros itens, da seguinte maneira: em tubos de ensaio adicionamos 20 ml da solução nutritiva básica e as doses de $MnSO_4$. Determinamos a concentração sacarina com o refratômetro Zeiss e a acidez total do meio. Esterilizamos. Após resfriamento fizemos a inoculação com 1 ml de uma suspensão de levedura e mantivemos os tubos em estufa a $28^{\circ}C$ durante 10 dias. Filtramos e determinamos novamente a concentração sacarina e a acidez total final dos mostos fermentados ou vinhos. Deduzimos, pelas diferenças encontradas nas determinações inicial e final, a quantidade de hidratos de carbono consumida pela levedura durante a fermentação alcoólica, bem como aquilatamos do índice de atividade da levedura diante das várias doses de manganês do meio.

Os resultados das nossas observações foram resumidos nos quadros seguintes:

Empregando-se 5% de SACAROSE

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Consumo de açúcar %	Aumento da acidez
1	Testemunha	2,8	2,0
2	0,001	3,3	6,2
3	0,005	3,4	6,3
4	0,010	4,0	8,6
5	0,020	4,2	8,9
6	0,030	3,7	8,0
7	0,040	3,6	7,9
8	0,050	3,8	8,2
9	0,060	3,8	8,0
10	0,070	3,7	7,7
11	0,080	3,4	6,9
12	0,090	3,4	6,6
13	0,100	3,3	6,6
14	1,000	2,6	5,8
15	5,000	2,2	4,2
16	10,000	2,0	4,9
17	15,000	1,9	3,6
18	20,000	1,6	2,9
19	25,000	1,2	2,6
20	30,000	0,9	2,9
21	35,000	0,8	2,0
22	40,000	0,8	1,6
23	45,000	0,7	1,1
24	50,000	0,5	0,7

A concentração da sacarose inicial e final foi lida diretamente no refratômetro Zeiss, com contrôlo de temperatura a 20°C, enquanto que a acidez foi determinada por titulação de 10 cc de vinho com NaOH n/10 em presença de fenolftaleína a 1% como indicador.

Empregando-se 5% de GLUCOSE

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Diferença do índice de refração	Aumento da acidez
1	Testemunha	0,0045	2,5
2	0,001	0,0048	5,8
3	0,005	0,0045	6,4
4	0,010	0,0056	7,8
5	0,020	0,0065	8,6
6	0,030	0,0050	6,6
7	0,040	0,0052	7,4
8	0,050	0,0049	7,2
9	0,060	0,0050	6,8
10	0,070	0,0040	6,5
11	0,080	0,0050	6,6
12	0,090	0,0040	6,4
13	0,100	0,0040	6,4
14	1,000	0,0035	5,0
15	5,000	0,0025	4,8

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Diferença do índice de refração	Aumento da acidez
16	10,000	0,0025	4,4
17	15,000	0,0020	4,1
18	20,000	0,0020	3,0
19	25,000	0,0018	3,1
20	30,000	0,0012	2,8
21	35,000	0,0010	1,7
22	40,000	0,0015	2,0
23	45,000	0,0012	1,5
24	50,000	0,0010	1,3

Para maior facilidade de trabalho, para o caso da glucose a determinação da concentração sacarina foi feita pelo índice de refração, medido pelo refratômetro Zeiss. Embora a fermentação com glucose tenha corrido menos regularmente que com a sacarose, percebe-se nitidamente a influência benéfica das doses pequenas de MnSO₄. Idênticamente, doses muito fortes de manganês são contraproducentes. Em ausência de manganês a atividade da levedura é menor dando fermentação mais lenta e incompleta.

Empregando-se 5% de LEVULOSE

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Diferença do índice de refração	Aumento da acidez
1	Testemunha	0,0049	2,7
2	0,001	0,0050	7,4
3	0,005	0,0050	7,6
4	0,010	0,0050	8,8
5	0,020	0,0055	10,0
6	0,030	0,0060	11,1
7	0,040	0,0055	10,8
8	0,050	0,0049	8,4
9	0,060	0,0054	9,6
10	0,070	0,0048	8,6
11	0,080	0,0050	7,2
12	0,090	0,0049	7,4
13	0,100	0,0049	6,5
14	1,000	0,0035	5,3
15	5,000	0,0030	4,4
16	10,000	0,0025	4,2
17	15,000	0,0020	3,9
18	20,000	0,0015	3,2
19	25,000	0,0010	2,8
20	30,000	0,0010	2,5
21	35,000	0,0010	2,0
22	40,000	0,0005	1,8
23	45,000	0,0008	1,8
24	50,000	0,0005	1,6

A fermentação da levulose foi rápida e intensa. Verifica-se que em ausência de manganês o consumo de açúcar pela levedura foi escasso. Este fato vem confirmar as observações já feitas sobre o desenvolvimento da levedura em ausência de manganês. Como o aumento

da acidez da solução nutritiva básica é índice de atividade do crescimento da levedura, deduz-se logicamente que a falta de manganês retarda ou diminue as atividades fisiológicas da levedura.

Empregando-se 5% de LACTOSE

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Consumo de açúcar %	Aumento da acidez
1	Testemunha	3,3	3,5
2	0,001	3,4	7,2
3	0,005	3,9	7,5
4	0,010	3,2	7,7
5	0,020	3,7	7,8
6	0,030	3,6	7,5
7	0,040	3,5	7,8
8	0,050	3,6	9,0
9	0,060	4,2	9,6
10	0,070	4,6	9,4
11	0,080	3,6	7,6
12	0,090	2,9	6,7
13	0,100	2,8	5,8
14	1,000	2,2	3,7
15	5,000	1,9	4,9
16	10,000	1,6	3,0
17	15,000	0,9	3,0
18	20,000	1,0	2,5
19	25,000	0,8	2,2
20	30,000	0,7	2,0
21	35,000	0,8	1,2
22	40,000	0,6	1,4
23	45,000	0,5	1,0
24	50,000	0,4	0,6

Os ensaios feitos com a lactose em solução a 5% mostraram que o máximo de atividade da levedura se encontra entre os limites de 0,02 a 0,08 g de MnSO₄ por litro.

Embora a natureza do açúcar que entra na composição da solução nutritiva básica tenha grande influência no processo de metabolismo dêste composto ternário, o que não resta dúvida, é que pequenas doses de MnSO₄ acrescidas a esta solução influem favoravelmente na fermentação alcoólica. Por outro lado, doses elevadas são prejudiciais, qualquer que seja o açúcar considerado.

De uma maneira geral pode-se dizer que os limites de concentração de 0,01 a 0,08 g de MnSO₄ por litro facilitam maior consumo de açúcar pela levedura, independentemente da natureza do açúcar usado.

Com o mel final da Usina Monte Alegre preparamos um mosto convenientemente diluído e repetimos os mesmos ensaios para verificarmos até que ponto o manganês poderia influir neste caso.

Os resultados foram absolutamente concordes com os já obtidos com diversos meios nutritivos artificiais. Naturalmente sendo o meloço um meio natural muito mais propício ao desenvolvimento da levedura alcoólica, a fermentação do meloço se processou de modo mais perfeito. A dose mais favorável à fermentação do meloço e ao desenvolvimento da levedura foi a correspondente a uma concentração de 0,03 gramas de $MnSO_4$ por litro de mosto diluído, contendo 15,55% de açúcares fermentescíveis totais.

No quadro seguinte resumimos os resultados obtidos:

Empregando-se MEL FINAL DA U.M.A.

Nº do tubo	Concentração de $MnSO_4$ em g/litro	Consumo de açúcar %	Aumento da acidez
1	Testemunha	12,10	1,96
2	0,001	13,19	2,42
3	0,005	12,83	2,94
4	0,010	13,30	3,18
5	0,020	14,10	2,75
6	0,030	14,16	3,49
7	0,040	13,55	2,57
8	0,050	13,05	2,62
9	0,060	12,83	2,65
10	0,070	12,89	2,63
11	0,080	13,00	2,64
12	0,090	12,68	2,50
13	0,100	12,55	2,09
14	1,000	12,71	1,92
15	5,000	12,59	2,00
16	10,000	10,26	1,65
17	15,000	10,43	1,40
18	20,000	9,84	1,30
19	25,000	9,52	1,26
20	30,000	8,39	1,05
21	35,000	6,15	1,00
22	40,000	4,29	0,90
23	45,000	3,94	0,65
24	50,000	4,01	0,40

Por fim, usamos também o caldo de cana da variedade CB-36/24, contendo 15,39% de açúcares totais fermentescíveis como mosto natural, para verificarmos se o efeito das diferentes doses de manganês na fermentação deste mosto era comparável ao obtido com o mel final.

Os números do quadro abaixo mostram os resultados por nós obtidos. Do seu exame constata-se perfeita concordância de resultados.

Empregando-se CALDO DE CANA da variedade CB-36/24

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g/litro	Consumo de açúcar %	Aumento da acidez
1	Testemunha	12,42	1,06
2	0,001	13,55	1,82
3	0,005	13,70	1,84
4	0,010	14,46	1,96
5	0,020	14,48	2,10
6	0,030	14,25	2,05
7	0,040	13,66	1,74
8	0,050	13,10	1,64
9	0,060	12,28	1,63
10	0,070	12,02	1,59
11	0,080	12,00	1,50
12	0,090	11,64	1,50
13	0,100	11,28	1,38
14	1,000	10,15	1,36
15	5,000	10,18	0,94
16	10,000	10,48	0,94
17	15,000	9,17	0,98
18	20,000	9,23	1,18
19	25,000	8,10	0,97
20	30,000	6,80	0,80
21	35,000	7,15	0,82
22	40,000	7,00	0,71
23	45,000	4,60	0,68
24	50,000	3,02	0,39

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que:

- a) - a presença de doses mínimas de manganês num mosto estimula as atividades da levedura, enquanto que a falta dêste elemento retarda a fermentação alcoólica;
- b) - doses mínimas de MnSO₄ dão extraordinária regularidade à fermentação alcoólica;
- c) - a deposição do fermento é intensa, de forma compacta, de aspecto sadio e de côr creme;
- d) - doses elevadas, além do depósito de células de fermento de aspecto completamente diverso do observado nas doses mínimas, conduzem à fermentações irregulares e incompletas.

Produção de gás em presença de doses crescentes de manganês

Afim de ensaiar a atividade fermentativa da levedura em estudo por meio da medida do gás carbônico formado, usamos várias séries de tubos de Einhorn, graduados de 0 a 5. Empregamos como meio nutritivo caldo de cana da variedade Co 421, diluído a 5º Brix com água bi-destilada. O tubo 1 foi reservado para testemunha e os outros, de 2 a 24, receberam doses crescentes de MnSO₄ como indicam os quadros seguintes.

Cheios, tamponados e esterilizados, cada tubo foi inoculado depois de frio com 0,3 ml de uma suspensão de fermento previamente preparada para este fim. Todos os tubos foram, a seguir, mantidos em estufa a 28°C para observações posteriores.

O CO₂ produzido pela fermentação alcoólica é acumulado na haste graduada do tubo de Einhorn. Pode-se, desta maneira, ler diretamente o volume de gás carbônico formado.

Os resultados por nós encontrados vêm, mais uma vez, evidenciar e reforçar a nossa asserção de que a presença do catiônio nos meios nutritivos ou mostos, auxilia o desenvolvimento do Saccharomyces cerevisiae, agindo favoravelmente em relação à sua atividade fermentativa. Os resultados médios estampados adiante mostram isso com meridiana clareza.

Primeira experiência

Nº do tubo	Concentração de MnSO ₄ em g por litro	Produção de CO ₂ , em ml, após o tempo de inoculação de						
		40 Horas	45 horas	47 horas	49 horas	51 horas	53 horas	55 horas
1	Testemunha	0	0	0,6	2,0	4,0	4,8	5,0
2	0,001	1,6	2,5	3,8	4,8	5,0	-	-
3	0,005	2,6	3,9	5,0	-	-	-	-
4	0,010	3,0	4,5	5,0	-	-	-	-
5	0,020	3,4	4,2	4,8	5,0	-	-	-
6	0,030	3,2	4,3	4,6	5,0	-	-	-
7	0,040	3,4	4,2	4,8	5,0	-	-	-
8	0,050	4,6	4,9	5,0	-	-	-	-
9	0,060	1,8	2,9	3,7	4,2	4,8	5,0	-
10	0,070	2,0	2,5	3,5	3,8	4,6	4,8	5,0
11	0,080	0,6	1,5	2,6	3,2	4,0	5,0	-
12	0,090	0,1	0,4	0,8	1,0	1,2	2,4	3,5
13	0,100	0,4	0,8	1,2	1,5	2,0	2,5	3,0
14	1,000	0	0	0	0	0	0,5	0,8
15	5,000	0	0	0	0	0	0	0,2
16	10,000	0	0	0	0	0	0	0
17	15,000	0	0	0	0	0	0	0

Todos os demais tubos, de 18 a 24, que receberam doses crescentes de 5 em 5 g de MnSO₄ por litro, até 50 g não produziram gás carbônico.

Demos por terminada a observação quando a produção de gás atingiu o volume máximo do tubo de Einhorn, que é de 5 ml.

Verifica-se, nesta primeira experiência que, doses pequenas de manganês ativam e aceleram a produção de gás, enquanto que doses elevadas, superiores a 1 g de MnSO₄ por litro são prejudiciais à fermentação alcoólica. Esta retardou, pelo menos de 70 horas, em relação aos que receberam pequenas doses de MnSO₄, compreendidas entre 0,001 a 0,100 g por litro.

Em nenhum dos tubos que ainda permaneceram durante 5 dias em estufa a 28°C, mesmo depois de paralizada a fermentação, se no -

tou formação nítida de véu superficial, confirmando mais uma vez, que o manganês não favorece o desenvolvimento da levedura aeróbica.

Em ausência completa de manganês a produção de gás foi sempre mais lenta que em presença de pequenas doses de $MnSO_4$. Para controlar os resultados obtidos no primeiro ensaio, realizamos uma outra experiência usando caldo de cana da mesma variedade e preparado nas mesmas condições. Trabalhando absolutamente com a mesma técnica da primeira vez, chegamos à resultados idênticos neste segundo ensaio, conforme se pode ver no quadro abaixo.

Segunda experiência

Nº do tubo	Concentração de $MnSO_4$ em g por litro	Produção de CO_2 , em ml, após o tempo de inoculação de:						
		20 horas	25 horas	30 horas	35 horas	40 horas	45 horas	50 horas
1	Testemunha	0	0	0	0	0	0	2,0
2	0,001	0	0	0	0,5	1,3	2,2	3,5
3	0,005	0,2	0,9	1,2	2,4	3,0	3,7	4,5
4	0,010	0,2	0,6	1,6	2,7	3,4	4,4	5,0
5	0,020	0,1	0,4	1,6	2,6	3,5	4,8	5,0
6	0,030	0,2	0,6	1,5	2,7	4,5	5,0	-
7	0,040	0,3	1,0	2,0	3,5	4,7	5,0	-
8	0,050	0,2	1,1	1,5	3,6	5,0	-	-
9	0,060	0	0,5	0,8	1,0	1,5	2,9	4,4
10	0,070	0	0	0,3	1,0	2,0	2,7	3,4
11	0,080	0	0	0	0	0	0	0,3
12	0,090	0	0	0	0	0	0	1,0
13	0,100	0	0	0	0	0,2	0,4	0,8
14	1,000	0	0	0	0	0	0	0
15	5,000	0	0	0	0	0	0	0
16	10,000	0	0	0	0	0	0	0
17	15,000	0	0	0	0	0	0	0

Todos os demais tubos, de 18 a 24, que receberam doses crescentes de 5 em 5 g de $MnSO_4$ por litro, até 50 g não produziram gás carbônico.

Do exame dos resultados por nós obtidos chega-se à confirmação final das conclusões já estabelecidas anteriormente.

7 - AÇÃO DO MANGANÊS NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Deante dos resultados obtidos procuramos efetuar alguns ensaios de fermentação com mel final da UMA e com caldo de cana, de diferentes concentrações para verificarmos como o Saccharomyces cerevisiae se comportava na prática. Pretendíamos efetuar todos estes ensaios em dornas abertas de 200 litros, porém, não conseguimos obter no comércio nacional quantidades suficientes de $MnSO_4$ na forma de sal puro ou comercial para esta finalidade. Vimo-nos, por isso, obrigados a fazer nossas observações em vasos de Erlenmeyer Pyrex, de 1 litro de capacidade.

Quer para o melaço, quer para o caldo de cana, os mostos depois de ajustados à concentração desejada com água bi-destilada,

receberam a adição de $MnSO_4$, conforme discriminamos em continuação. Foram tamponados com algodão e esterilizados por ebulição a fogo direto durante 5 minutos. Depois de frios receberam inoculação com igual quantidade de lêvedo alcoólico prèviamente preparado. Agitados, foram deixados em fermentação a $28^{\circ}C$ durante 5 dias, em estufa a temperatura constante. Transcorrido êste tempo determinamos a percentagem de álcool, em volume, a $15^{\circ}C$, de todos os vasos.

A determinação do álcool foi feita por destilação. O destilado, resfriado a $15^{\circ}C$ foi pesado na balança de Westphal. Pela densidade obtida, com auxílio de tabela própria obtivemos, por leitura direta, a percentagem de álcool em volume, a $15^{\circ}C$, desprezando-se os centésimos.

Os resultados médios obtidos nas nossas observações estão expressos no quadro seguinte.

Fermentação do mel final da UMA

Balões Nº	MnSO ₄ em g por lit.	Percentagem de álcool em volume a $15^{\circ}C$ em:					
		Mosto de 14º Brix	Mosto de 15º Brix	Mosto de 16º Brix	Mosto de 17º Brix	Mosto de 18º Brix	Mosto de 19º Brix
1	Testemu nha	4,0	5,8	5,8	5,9	6,3	6,6
2	0,001	5,3	6,2	6,4	6,1	6,3	6,7
3	0,01	5,8	6,4	6,9	6,9	7,0	7,3
4	0,09	5,4	6,6	7,0	7,2	7,2	7,4
5	0,1	5,5	6,6	7,0	7,1	7,4	7,6
6	0,2	5,2	6,6	6,6	6,7	6,9	7,3
7	1,0	4,6	5,6	5,9	5,8	6,1	6,1
8	10,0	3,1	3,0	4,2	4,3	4,2	4,1
9	30,0	2,2	2,1	2,7	3,0	2,9	2,0
10	50,0	1,6	1,5	2,0	1,8	1,6	0,4

Fermentação de caldo de cana

1	Testemu nha	2,2	3,8	4,5	5,8	6,2	6,4
2	0,001	3,5	4,0	5,0	4,9	6,1	6,9
3	0,01	3,6	5,1	5,3	5,8	6,5	6,9
4	0,09	4,4	5,6	6,2	6,4	6,9	6,8
5	0,1	4,0	5,8	5,9	6,3	7,2	7,4
6	0,2	3,5	5,9	6,6	5,9	6,7	7,0
7	1,0	2,5	5,0	5,8	5,8	6,4	6,5
8	10,0	2,0	2,6	3,8	5,6	4,0	5,2
9	30,0	0,8	1,2	1,1	3,5	3,8	2,0
10	50,0	0,2	0,4	0	0,3	0,2	0,1

É indiscutível a confirmação de que, mostos contendo pequenas quantidades de manganês são mais intensamente fermentados do que os mesmos mostos aos quais não se adicionou $MnSO_4$. Igualmente, ficou mais uma vez demonstrado que doses elevadas de manganês são prejudiciais à fermentação alcoólica, embora não paralizem as atividades da levedura que é notavelmente resistente a altas concentrações

de $MnSO_4$.

A fermentação do mel final foi, em todos os casos, muito mais regular que a do caldo de cana. É interessante salientar que o $MnSO_4$ parece regularizar a fermentação diminuindo a intensidade da violência da fase da fermentação tumultuosa. A fermentação se manifestou muito regular, de igual intensidade do começo ao fim, mais rápida e completa, donde o maior rendimento em álcool nos frascos que receberam doses convenientes de $MnSO_4$.

Com a adição de $MnSO_4$ no mel final conseguimos um aumento de rendimento máximo de álcool de 1,8% em relação ao testemunha trabalhando com mosto de 14ºBrix, enquanto que fermentando caldo de cana conseguimos até 2,2% a mais de álcool para mosto com 14ºBrix.

Está, sem dúvida, aberto um campo novo de pesquisas na enologia. Se os resultados das nossas observações sobre a fermentação do melaço e do caldo de cana se aplicarem também a fermentação da uva, eles trarão reais vantagens para a fabricação de vinhos de mesa principalmente nos países quentes. Neste caso o $MnSO_4$ funcionará como um regularizador da fermentação alcoólica dos mostos de uva.

Nos climas tropicais, onde a temperatura alta é, por vezes, um entrave muito sério à boa marcha da fermentação alcoólica, principalmente no que concerne à enologia, a presença do manganês nos mostos em fermentação será de valor prático inestimável. É que, regularizando-a, evita fermentações excessivamente tumultuosas e bruscas, tornando-as mais lentas, porém completas. O vinho obtido, por força, apresentará composição química e características organolépticas mais mais concentradas com um produto de fina qualidade.

8 - CONCLUSÕES

As pesquisas que realizamos sobre a influência do manganês no crescimento e atividades do Saccharomyces cerevisiae nos conduziram às seguintes conclusões finais:

- 1 - O Saccharomyces cerevisiae encerra 78,13% de água e 26,87% de sólidos totais, constituídos pela matéria orgânica (23,17%) e pelas matérias minerais (3,70%).
- 2 - As proteínas (14,51%) ocupam o primeiro lugar na constituição química da levedura, representando em números inteiros, 54% do peso da matéria seca e 63% da matéria orgânica.
- 3 - Dos elementos minerais das cinzas da levedura estudada, o fósforo (50,41%) e o potássio (31,07%) são os mais importantes do ponto de vista quantitativo, sendo elementos primordiais ao seu de-

envolvimento normal.

- 4 - Em ausência completa de manganês a levedura multiplica-se de modo insuficiente determinando fermentações incompletas, mais lentas, com menor formação de ácidos e despreendimento de gás, comparativamente aos meios de cultura e mostos que encerram pequenas doses de $MnSO_4$.
- 5 - O manganês, quando presente num mosto em pequenas doses favorece, regulariza e estimula o desenvolvimento e as atividades da levedura. A sua multiplicação sendo mais abundante, aumenta a produção de ácidos, ativa e acelera a produção de CO_2 . Apressando o desdobramento completo dos açúcares do mosto, permite melhor rendimento na fermentação alcoólica. A deposição do fermento é intensa, de forma compacta, de aspecto sadio e de cor creme.
- 6 - As doses mais aconselháveis estão compreendidas entre 0,001 e 0,2 g de $MnSO_4$ por litro, sendo ao redor de 0,01 g a dose ideal. De um modo geral pode-se dizer que os limites de concentração de 0,01 a 0,08 g de $MnSO_4$ por litro facilitam maior consumo de açúcar e produzem maior formação de ácidos, independentemente da natureza do açúcar presente num mosto em fermentação.
- 7 - O limite máximo, não prejudicial ao desenvolvimento e velocidade de fermentação está compreendido entre 0,09 e 0,10 g de $MnSO_4$ por litro.
- 8 - Concentrações superiores a 0,20 g por litro são contraproducentes na prática porque diminuem a atividade da levedura, aumentam o tempo de fermentação, produzem fermentações incompletas com prejuízo para o rendimento alcoólico e a qualidade do produto obtido por destilação. Acrescente-se a tudo isto ainda mais o custo do tratamento.
- 9 - O Saccharomyces cerevisiae apresenta extraordinária resistência à elevadas concentrações de $MnSO_4$ multiplicando-se, embora muito lentamente, em doses de 50 g de $MnSO_4$ por litro. Os ensaios de esporulação feitos segundo a técnica de Wirtz, à esta concentração foram todos negativos.
- 10 - O manganês deve ser considerado como um elemento de valor à nutrição da levedura, uma vez que ele exerce o seu desenvolvimento e sua potência fermentativa, uma verdadeira ação excitante da produção enzimática.
- 11 - O manganês aumenta o poder fermento da levedura, regulariza a fermentação alcoólica, provoca aumento na produção de gás, da acidez e no rendimento em álcool, desde que aplicado em doses

convenientes, ao redor de 0,01 g de $MnSO_4$ por litro de mosto.

- 12 - O manganês não favorece o desenvolvimento aeróbico do Saccharomyces cerevisiae e, conseqüentemente a formação nítida de véus na superfície dos líquidos fermentados com doses crescentes de $MnSO_4$.
- 13 - O manganês, mesmo em doses elevadas (até 50 g de $MnSO_4$ por litro) não influe na pigmentação da levedura em estudo.
- 14 - O manganês quando presente num mosto em pequenas doses (0,001 a 0,05 g de $MnSO_4$ por litro) age benèficamente sôbre a intensidade respiratória da levedura, ativando-a e acelerando a redução do azul de metileno e do carmim índigo. Excedendo-se a concentração de 1 g de $MnSO_4$ por litro há sensível diminuição da atividade respiratória, diretamente proporcional à concentração do catiônio.
- 15 - A levedura cultivada em solução nutritiva desprovida de manganês respira mais lentamente que em presença de doses pequenas, retardando os fenômenos de redução do azul de metileno e do carmim índigo.
- 16 - A data da inoculação afeta a intensidade da atividade respiratória da levedura, sendo esta dependente, também, da concentração de $MnSO_4$ presente. O estudo dos fenômenos de óxido-redução deve ser feito depois do 9º dia da inoculação, pois o descoramento é mais nítido e mais rápido.
- 17 - O tempo de redução com o carmim índigo é sempre mais elevado que o apresentado pelo azul de metileno.

9 - BIBLIOGRAFIA citada

ALMEIDA, Jayme Rocha de

1940 - Álcool e destilaria, Ed. Nathanael Santos, Piracicaba, pag. 43-45.

ANDERSON, C. G.

1948 - An introduction to Bacteriological Chemistry, 2ª edição revista e reimpressa, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pag. 56.

AGRICULTURAL CHEMISTS, Association of Official

1945 - Official and tentative methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 6ª ed., pag. 5, 22, 119, 122, 408, 487, 646.

Mis

ARNAUDI, Carlo

1948 - Elementi di microbiologia generale ed applicata alle fermentazioni, 3^a ed., Casa Editrice Ambrosiana, Milão, pag. 73, 85.

BACHMANN, Alois, Ruperto Quiroga e Pablo Negroni

1944 - Microbiologia, Tomo I, Libreria y Editorial Vazquez, B. Aires, pag. 42.

BARZIZZA, Carlos M. e Alberto Manso Soto

1947 - Microbiologia, Tomo I, 4^a ed., Livraria Hachette, B. Aires, pag. 84.

BELDING, David B. e Alice T. Marston

1938 - A textbook of Medical Bacteriology, D. Appleton Century Co. Inc., N. York, Londres, pag. 40.

BERTRAND, Gabriel

1938 - Importance de traces d'éléments dans les processus biologiques, Annales des Fermentations, t. IV, pag. 65.

_____ e R. Sazerac

1913 - Favorable action of manganese on acetic fermentation, Chemical Abstracts, 7, 3511.

1914 - The favorable action exercised by manganese on acetic acid fermentation, Chemical Abstracts, 8, 3194.

BIGWOOD, E. J.

1935 - Le mécanisme de la respiration cellulaire en aérobiose et en anaérobiose, Annales des Fermentations, Vol. 1, pag. 1, 65, 127.

BOKORNY, T.

1914 - Bindung von Metallsalzen durch die Hefe; Nachweis der seeben durch chemische Reaktionen, C.Z., 85 (2) 2195, abr./jun..

BOLCATO, Virgilio

1947 - La chimica delle fermentazioni, Ed. Nichola Zanichelli, Bologna, pag. 3, 16, 89.

BORTELS, H.

1939 - The effect of agar as well as iron, molybdenium, manganese and traces of other elements in nitrogen-free culture media on Azotobacter, Zentr. Bakt., Parasitenk. II Abt., 100/373-393.

BUCHANAN, Robert E. e Stelle D. Buchanan

1951 - Bacteriology, 5^a ed., The Macmillan Co., N. York, pag. 237.

BURDON, Kenneth L. B.

1949 - Textbook of microbiology, 3^a ed., The Macmillan Co., N. York, pag. 118.

BURROWS, William, Francis B. Gordon, Richard J. Porter e James W. Moulder

1950 - Jordan-Burrows Textbook of Bacteriology, 15^a ed., W. B. Saunders Co., pag. 51.

CHARNEY, Jesse, W. P. Fischer e C. P. Hegarty

1951 - Manganese as an essential for esporulation in the genus Bacillus, J. Bact., 62, 145/148.

CHEMIST SOCIETY, American Oil

1946 - Official and tentative methods, 2^a ed., Chicago, I, Illinois, Aa-4-38; Aa-5-38.

FAIRBROTHER, R. W.

1948 - A textbook of Bacteriology, 5^a ed., Grune & Stratton, N. York, pag. 23.

FISCHER, J.

1942 - The effect of heavy metals on Aspergillus niger. I -Starch decomposition, Planta, 32/395-413.

FREITAS, Octávio

1929 - Lições de Microbiologia, 2^a ed., Imprensa Industrial I. Fonseca, Recife, pag. 28.

GERSHENFELD, Louis

1945 - Bacteriology and allied subjects, Mack Publishing Co., pag. 22.

GENEVOIS, L. e P. Cayrol

1935 - Sur les rapports entre fermentation et respiration chez les levures, Annales des fermentations, pag. 361.

GRINTZESCO, J. e S. Pēterfi

1936 - Action of manganese, zinc and fluorine on the development of Microthamnion kützingianum (Naeg), Bul. Soc. Chim, Romania, 18A/177-181.

HARPUDEK, Karl

1927 - Beiträge zur allgemeinen Biochemie komplizierter Salzlösun

gen Einfluss von Ferro und Manganionem auf Atmung und Gärung der Hefe, Biochem Zeitschr, 183, 58/62.

HAWKER, Lilian E.

1950 - Physiology of fungi, University of London Press Ltd., Londres, pag. 48.

HOOGERHEIDE, J. C.

1935 - Contribution à l'étude de la réaction de Pasteur, Annales des Fermentations, t. 1, pag. 385.

IERUSALIMSKIĭ, N. D.

1951 - The significance of trace elements to acetone-ethanol bacteria, Chem. Abstracts, 45, 6689.

JELINEK, Bohdan

1938 - Études sérologiques sur les levures. II Culture des levures - Annales des fermentations, t. IV, pag. 12.

KAYSER e Marchand

1907 - Influence of manganese salts on alcoholic fermentation, Compt. Rend., 144/714.

KELLY, Florence C. e Eileen K. Hite

1949 - Microbiology, Appleton Century Crofts Inc., N. York, pag. 14.

KNAYSI, Georges

1951 - Elements of Bacterial Cytology, 2ª edição, Comstock Publishing Co. Inc. Ithaca, N. York, pag. 52.

KOLTHOFF, I. M. e E. B. Sandell

1948 - Textbook of quantitative inorganic analysis, Ed. rev., The MacMillan Co., N. Y., pag. 600-602, 608-609.

KRUEGER, A. P. e N. S. West

1935 - The accelerating effect of manganous ions on phage action, J. Gen. Physiology, 19/75-86.

LACORTE, J. Guilherme

1940 - Compêndio de Bacteriologia e Imunologia, 3ª edição revista e aumentada, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, pag. 76.

LANE, J. Henry e Lewis Eynon

1934 - Determination of reducing sugars by Fehling's solution with methylene blue indicator, Norman Rodger, Londres.

- LILLY, Virgil Greene e Horace L. Barnett
1951 - Physiology of fungi, 1ª edição, McGraw-Hill Book Co., N. York, Toronto, Londres, pag. 65.
- LIMA, José Pedro de Carvalho
1945 - Bacteriologia, 4ª edição, São Paulo, pag. 38.
- LINDEGREN, Carl C.
1949 - The yeast cell. Its genetics and cytology, 1ª edição, Educational publishers, pag. 11-8 a 11-14.
- LOBO, Bruno
1938 - Microbiologia, 2ª edição revista e aumentada, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pag. 166.
- MANIL, P.
1945 - Microbes et actions microbiennes, París, Maloine, pag. 22.
- MASSART, L. e R. Dufait
1944 - Über die KCN und NaF Hemmung der Gärung mit besonderer Berücksichtigung der Metalle als Aktivatoren der Fermente, Biol. Abstr, 18/201.
- NIKLAS, H. e O. Toursel
1942 - The determination of trace elements by means of Aspergillus niger, Chem. Abstracts, 36, 4956.
- NILSSON, R., F. Alm e D. Burström
1945 - Manganese as a substitute for magnesium in the metabolism and anabolism of the cell, Biol. Abstr. 19, 6256.
- PAIVA NETO, J. E., R. A. Catani, W. S. Queiroz e A. Kupper
1946 - Contribuição ao estudo dos métodos analíticos e de extração para a caracterização química dos solos do Estado de São Paulo, Rev. de Agric., nº 11/12, pag. 424.
- PIPER, C. S.
1944 - Soil and plant analysis, The Univ. of Adelaide, Austr., pag. 263-265.
- PEROTTI, Renato
1951 - Biologia Vegetale applicata all'agricultura, IV-B, Microbiologie delle industrie, 2ª edição, Rosenberg & Sellier, Turim, pag. 121-123.

PORTER, John Roger

1948 - Bacterial Chemistry and Physiology, 4ª impressão, John Wiley & Sons Inc., N. York, pag. 352-451.

PRESCOTT, Samuel Cate e Cecil Gordon Dunn

1949 - Industrial Microbiology, 2ª edição e 2ª reimpressão, McGraw-Hill Book Co., pag. 15.

ROSELL, José M. e Inacio Santos

1952 - Metodos analiticos de laboratorio lactologico y microbiologia de las industrias lácteas, 1º volume, Editorial Labor., pag. 299, 300-302, 308.

SALLE, A. J.

1948 - Fundamental principles of Bacteriology, 3ª edição, 3ª impressão, McGraw-Hill Book Co. Inc., N. York, Toronto, Londres, pag. 310 - 312, 501.

SANGIORGI, G.

1945 - Lezioni di microbiologia, 5ª edição, Casa Editrice Dott. Luigi Màcri, Castelo e Bari, pag 67.

SCHOEN, M.

1935 - Problèmes actuels de la chimie des fermentations, Annales des Fermentations, t.1, pag. 257.

SCHULZ, Gerhard

1937 - The influence of heavy metal salts (Zn, Cd, Mn, Fe) on the chemical composition of Aspergillus niger, Chemical Abstracts, 31, 7925.

SERENI, D. Rabinovitz

1933 - Influenza del magnesio sullo sviluppo di alcuni funghi, Bol. della R. Stazioni di Patologia Vegetale, Abril XI, ano XIII, nova série, XI - nº 1, pag. 203.

1933 - Influenza del magnesio sull'acrescimento e sull'attività del Saccharomyces cerevisiae, Hansen, Boll. della R. Stazioni di Patologia Vegetale, Abril, ano XIII, nova série, nº 3, pag. 309.

TAYLOR, F. A.

1933 - Manganous preparations for the treatment of fungous infections, Chemical Abstracts, 27, 5149.

VAN LAER, Marc H.

1935 - Le potentiel d'oxydo-réduction au cours de la fermentation panaiere, pag. 402.

VERONA, Onorato

1950 - Microbiologia delle fermentazioni e microbiologia industriale, Casa Editrice Dott. Luigi Macri, Firenze, pag. 14, 25-33, 76-78.

WILLIAMS, O. B. e F. W. Jessen

1932 - Oxidation of manganese by bacteria, Chem. Abstracts, 26, 2209.

WILSON, G. S. e A. A. Miles

1948 - Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity, 3ª edição reimpressa, 1º volume, Edward Arnold & Co., Londres, pag. 42.

WRIGHT, C. Harold

1938 - Agricultural Analysis, Thomaz Murby and Co., London, pag. 126.

ZINSSER, Hans e Stanhope Bayne Jones

1947 - Tratado de Bacteriologia, Tradução da 8ª edição por A. Monteiro Filho, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, pag. 46-55.