BALANÇO DE NUTRIENTES MINERAIS NO PROCESSO MELLE-BOINOT DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

JORGE JOSÉ CORRÊA LOPES
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. ENIO ROQUE DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros
da Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

L864b Lopes, Jorge José Corrêa
 Balanço de nutrientes minerais no processo
 Melle-Boinot de fermentação alcoólica. Pira-
 cicaba, 1989.
 74p.

 Diss.(Mestre) - ESALQ
 Bibliografia.

 1. Etanol - Produção microbiana 2. Fermen-
 tação alcoólica 3. Levedura - Nutrição I. Es-
 cola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
 Piracicaba.

CDD 663.13

**BALANÇO DE NUTRIENTES MINERAIS NO PROCESSO MELLE-BOINOT DE
FERMENTAÇÃO ALCOOLICA**

JORGE JOSÉ CORRÊA LOPES

Aprovada em : 16.03.1990

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

ESALQ/USP

Prof. Dr. Fernando Valadares Novaes

ESALQ/USP

Prof. Dr. Enio Roque de Oliveira

ESALQ/USP

Prof. Dr. ENIO ROQUE DE OLIVEIRA

Orientador

Aos meus pais

José e Olga

À minha esposa

Célia Maria

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Professor Dr. Enio Roque de Oliveira pela segura e valiosa orientação, apoio e revisão dos originais.
- Ao Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar (PLANALSUCAR), pela oportunidade e facilidades oferecidas.
- À Usina São José Z.L., Macatuba-SP., por possibilitar a realização deste trabalho.
- Aos Colegas do Curso de Pós-graduação, pela convivência.
- Ao Sr. José Zurita Fernandes pela revisão do texto.
- À Sra. Heloísa Zutin Ferreira da Silva, pela dedicação e boa vontade para com os trabalhos de datilografia.
- Ao Engenheiro Agrônomo Francisco José Ribeiro pelo apoio e estímulo.
- Aos Engenheiros Agrônomos Norberto Lavorenti e Sonia Maria De Stefano Piedade, pelas sugestões e colaboração nas análises estatísticas.
- Aos Colegas, integrantes da Área Regional de Indústria do IAA/PLANALSUCAR, pela compreensão e apoio.
- À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Nitrogênio	5
2.2. Fósforo	14
2.3. Potássio	20
2.4. Magnésio	22
2.5. Cálcio	26
2.6. Zinco	26
2.7. Manganês	29
2.8. Cobre e ferro	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Material	33
3.1.1. Mosto	33
3.1.2. Microrganismo	33
3.1.3. Suplementação de sais no mosto ...	34
3.1.4. Dornas de fermentação e pré-fermen- tadores	35
3.2. Condução das fermentações	35
3.3. Amostragens	36
3.3.1. Amostragem do mosto	36
3.3.2. Amostragem do lêvedo	36

3.3.3. Amostragem do vinho	36
3.3.4. Amostragem do vinho centrifugado..	37
3.4. Determinação de A.R.T. no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifugado	37
3.5. Determinação dos elementos minerais no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifuga- do.....	37
3.6. Determinação de teores alcoólicos no vi- nho e lêvedo	38
3.7. Determinação da eficiência de fermenta- ção	39
3.8. Determinação de volumes	39
3.9. Balanço de nutrientes	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1. Nitrogênio	41
4.2. Fósforo	43
4.3. Potássio	44
4.4. Magnésio	45
4.5. Cálcio	46
4.6. Zinco	46
4.7. Manganês	47
4.8. Cobre	48
4.9. Ferro	49
4.10. Sódio	50
4.11. Eficiência de fermentação alcoólica	51
5. CONCLUSÕES	52

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

58

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Médias das concentrações (mg/l) de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio, referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos, no mosto, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída	53
Tabela 2 - Médias de massas (kg) de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio, referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos no mosto, complementação, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída	54
Tabela 3 - Balanços porcentuais de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio, referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos por dorna, no mosto, complementação, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída	55
Tabela 4 - Médias dos resultados de eficiência de	

fermentação alcoólica, para os 12 ci- clos de fermentação referentes à 14 dornas	56
--	----

Tabela 5 - Médias de açúcares redutores totais

(ART - g/100 ml), teores alcoólicos (°INPM), pH e temperaturas (°C) no mosto, lêvedo e vinho, para os 12 ci- clos de fermentação referentes à 14 dornas	57
---	----

BALANÇO DE NUTRIENTES MINERAIS NO PROCESSO MELLE-BOINOT DE FERMENTAÇÃO ALCOOLICA

Autor: Jorge José Corrêa Lopes

Orientador: Prof. Dr. ENIO ROQUE DE OLIVEIRA

RESUMO

Neste trabalho, procurou-se verificar o balanço de dez nutrientes, citados como importantes para as leveduras, dentro do processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica, utilizado na quase totalidade das destilarias produtoras de álcool etílico do Brasil.

Com este objetivo foi instalado um ensaio experimental, em escala industrial, utilizando-se 14 dornas de fermentação com 12 ciclos consecutivos por dorna.

A interpretação e análise dos resultados obtidos permitiram as seguintes principais conclusões:

- o nutriente em maior concentração no mosto foi o potássio (405,96 kg/ciclo), seguido pelo cálcio (127,09 kg/ciclo) e nitrogênio (94,47 kg/ciclo);
- em menores teores no mosto aparecem o cobre (0,16 kg/ciclo), o zinco (0,20 kg/ciclo) e o manganês (0,79 kg/ciclo);

- nos lêvedos, o nitrogênio com 439,49 kg/ciclo, foi o principal elemento, confirmando a sua grande importância para as células de leveduras e, conseqüentemente para todo o processo fermentativo;
- no vinho, os nutrientes em maiores concentrações foram o nitrogênio (547,16 kg/ciclo), o potássio (536,25 kg/ciclo) e o cálcio (147,81 kg/ ciclo);
- o vinho centrifugado, apresentou o potássio (468,28 kg/ciclo) com teor mais elevado que os demais elementos estudados.

MINERAL NUTRIENT BALANCE IN THE MELLE-BOINOT PROCESS OF ALCOHOLIC FERMENTATION

Author: Jorge José Corrêa Lopes

Adviser: Prof. Dr. ENIO ROQUE DE OLIVEIRA

SUMMARY

In this work, a nutrient balance was carried out to verify the amount of ten mineral elements considered as the most important in the Melle-Boinot alcoholic fermentation process which is utilized in most ethanol distilleries in Brazil.

This survey was carried out, in industrial scale, utilizing 14 fermentation vats with 12 consecutive cycles per vat.

The results of this survey allowed the following conclusions:

- the nutrient with highest concentration in the must was the potassium (405.96 kg/cycle an overall average obtained in the vats surveyed), followed by calcium (127.09 kg/cycle) and nitrogen (94.47 kg/cycle), whereas copper, zinc and manganese appeared in minor quantity,

(0.16, 0.20, and 0.79 kg/cycle, respectively);

- in the yeast, the nitrogen appears as the main element (439.49 kg/cycle), confirming its great importance to yeast cells, and consequently to the whole fermentation process;
- in the wine, high amount of nitrogen, potassium and calcium (547.16, 536.25, and 147.81 kg/cycle, respectively) were observed;
- in the centrifuged wine, the potassium, with 468.28 kg/cycle, appeared in higher amount than the other elements studied.

1. INTRODUÇÃO

As necessidades nutricionais das células de leveduras, durante o processo de fermentação alcoólica, influem decisivamente no crescimento celular e na eficiência de transformação do açúcar em álcool.

Os elementos nitrogênio, fósforo e enxofre fazem parte integral de proteínas (N e S), carboidratos (N, S e P), lipídeos (N, P e S) e outros componentes celulares.

Os outros elementos minerais, de um modo geral, atuam como catalisadores de reações enzimáticas, que levam os carboidratos a se transformarem em etanol e massa celular.

Pode-se afirmar que geralmente, os sais minerais são requeridos para a manutenção do equilíbrio da membrana celular, regular a pressão osmótica, fazerem parte como constituintes essenciais de certos sistemas enzimáticos e, finalmente, como matéria-prima na síntese de constituintes protoplasmáticos.

O estudo tem como objetivo verificar, em escala industrial, o balanço de dez nutrientes, citados como

importantes para as leveduras, através da realizações de balanços materiais, dentro do processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica, utilizado na quase totalidade das destilarias produtoras de álcool etílico do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O estudo das necessidades de complementação dos mostos de caldo misto (caldo e méis), em termos de macro e micronutrientes, além de vitaminas, especialmente as do complexo B, no sentido de se obter fermentações puras, rápidas e eficientes, tem sido uma preocupação constante de pesquisadores do setor alcooleiro.

As recomendações variam ligeiramente, porém, de um modo geral, são indicados os sulfatos de amônio, de manganês, de zinco e de cobalto (VALSECHI, 1960; VALSECHI & OLIVEIRA, 1967; NOVAES et alii, 1971 e 1974; MENEZES, 1980 e STUPIELLO & HORII, 1981).

Segundo NOVAES et alii (1974), o caldo de cana-de-açúcar, embora rico em sais minerais, acusa um desequilíbrio entre os mesmos, exigindo uma suplementação adequada de determinados elementos, visando a uma fermentação alcoólica eficiente.

A importância dos nutrientes no processo fermentativo pode ser ressaltado, tanto sob o ponto de vista qualitativo como quantitativo, pois certas reações enzimáticas da fermentação alcoólica podem ser favorecidas por

determinados elementos, tais como: fosfato de cálcio, cloreto de amônia, sulfatos de magnésio, de manganês e de cobalto (NOVAES et alii, 1971).

Segundo WHITE (1954), os principais nutrientes minerais para as leveduras são os sulfatos e os fosfatos, de magnésio e de potássio, destacando-se que outros íons, como por exemplo, ferro e manganês, ainda que em pequenas concentrações, também são necessários.

A levedura para se multiplicar e fermentar exige que no meio exista em concentrações variáveis, dependendo do nutriente, uma série de elementos minerais. Estes elementos são fundamentais para a manutenção da célula da levedura.

O caldo de cana e o melaço possuem todos os elementos minerais e alguns cofatores orgânicos de que a levedura necessita para a manutenção, multiplicação e transformação de carboidratos em etanol. Para cada elemento existe uma faixa de concentração, na qual a levedura tem sua multiplicação acelerada ou sua fermentação otimizada (AMORIM, 1985).

STUPIELLO & HORII (1981) recomendam a adição de fósforo, nitrogênio, magnésio, manganês e zinco.

Segundo HERNANDEZ (1960), as leveduras requerem para o seu desenvolvimento diversos elementos como nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio e outros em proporções inferiores que são denominados micronutrientes.

As leveduras necessitam de sais para o seu crescimento, destacando para os nutrientes as seguintes funções: o magnésio é ativador de enzimas que transferem fosfatos; e em alguns casos se agregam íons Fe^{2+} , Cu^{2+} e Mn^{2+} , que participam em reações de enzimas. O Fe^{2+} atua a nível de citocromo e de catalase, sendo também necessário na síntese de cofatores (0,1% do peso seco). O Cu^{2+} (12-15 mg/l) é essencial para a formação de citocromo e atuação de oxidases. Supõe-se que o Mn^{2+} ativa a arginase em leveduras. (AMORIM, 1977).

ZAGO (1982), estudando os efeitos da concentração de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês e zinco na multiplicação de leveduras industriais, verificou comportamentos diferentes entre elas no que concerne às exigências minerais.

A composição química da levedura é extremamente variável. Depende da linhagem, idade, do meio nutritivo e das condições em que é mantida a cultura. O conhecimento da composição química da levedura fornece a indicação dos elementos que deverão estar presentes nos meios nutritivos, bem como serve de base para a correção dos mostos das indústrias de fermentação em geral (LIMA, 1954).

2.1. Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento importante, por

entrar como constituinte de várias substâncias orgânicas presentes na levedura, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, purinas, pirimidinas, pigmentos respiratórios (citocromos), vitaminas, lecitina, cefalina, etc (WHITE, 1954).

Um suprimento de nitrogênio extra celular é essencial para a contínua produção de novas células e a levedura geralmente obtém esse elemento de substâncias relativamente simples, como os sais de amônia e aminoácidos, amidas embora existam evidências de que dipeptídeos ou mesmo polipeptídeos possam ser assimilados (MORRIS, 1958).

As leveduras utilizam os seguintes sais de amônia com facilidade e bom aproveitamento: sulfato de amônio, mono, di e tri amônio fosfato, bicarbonato e carbonato de amônio, acetato, lactato e tartarato de amônio. O cloreto de amônio tem-se mostrado inferior a outros sais de amônio (SUOMALAINEN & OURA, 1971).

O nitrogênio é utilizado pela levedura para a constituição protoplasmática, fundamentalmente, na forma de sais amoniacaís e de aminoácidos. Entre os aminoácidos mais adequados figuram o ácido aspártico (e a sua amida, a asparagina), ácido glutâmico, a leucina e a fenilalanina. Os nitratos parecem exercer efeito tóxico (AZAMORA, 1978).

O teor de nitrogênio nas leveduras é cerca de 10% do peso da matéria seca e como tal representa um importante constituinte no meio (JONES et alii, 1981).

Além de compostos inorgânicos, inúmeros com-

postos orgânicos podem servir como fonte de nitrogênio. Entre os compostos orgânicos, as leveduras obtêm nitrogênio de aminoácidos (THORNE, 1949; REED & PEPPLER, 1973), peptídeos (MORRIS, 1958), amidas, ácidos nucléicos e seus compostos derivados (DI CARLO et alii, 1951).

O íon amônio parece inibir a permease que transporta os aminoácidos através do plasmalema. A uréia se transforma em alofanato pela ação da enzima amidoliase e, posteriormente, este é decomposto em amônia e dióxido de carbono, sendo a maioria retida na forma de glutamato (DUBOIS, 1976).

WICHERHAM (1946), utilizando 1.700 linhagens de leveduras, observou que todas as linhagens são capazes de utilizar três fontes de nitrogênio: sulfato de amônio, uréia e asparagina.

JONES et alii (1981), postulam que as leveduras são capazes de utilizar íons amônio como única fonte de nitrogênio, embora algumas leveduras requeiram adição de aminoácidos específicos.

Segundo SMYTHE (1939), a asparagina e glutamina exercem um efeito estimulante nas células de leveduras, semelhante ao sais de amônio, sendo evidenciado que o íon NH_4^+ reduz o período de indução em meio glicosado fermentado por extrato de levedura.

O valor de 25 compostos químicos como fonte de nitrogênio para duas linhagens de leveduras foi pesqui-

sado por THORNE (1933), sendo evidenciado que a asparagina, o ácido aspártico e o fosfato de amônio eram igualmente efetivos. A uréia e o ácido úrico não apresentaram resultados satisfatórios.

Segundo SCHULTZ & POMPER (1948), a uréia é uma fonte de nitrogênio tão efetiva quanto o sulfato de amônio.

SURDIN et alii (1965), constataram que os íons amônio inibem a absorção de aminoácidos e, consequentemente, quando a amônia é usada na propagação comercial alguns aminoácidos presentes não são eficientemente removidos do meio.

Na presença de sulfato de amônio, a levedura assimila amino e amido-nitrogênio de ácido aspártico e asparagina, duas vezes mais rápida que o nitrogênio amoniacal obtido de sais de amônio (HARTELIUS, 1939).

De acordo com THORNE (1949), em meio que contenha aminoácidos e sal de amônio, o consumo de nitrogênio amínico é 50% mais rápido que o nitrogênio da amônia.

BURKHOLDER et alii (1944), evidenciaram que a mistura de aminoácidos é uma fonte de nitrogênio mais eficiente que íons amônio, sendo a assimilação de nitrogênio de aminoácido 5 a 10 vezes a de nitrogênio amoniacal.

Fontes nitrogenadas complexas, como mistura de aminoácidos, peptídeos, ácidos nucléicos têm produzido um aumento na concentração celular e fermentação pelas

leveduras (WILLIAMS et alii, 1940; BURKHOLDER et alii, 1944).

NIELSEN (1935) afirma que a levedura assimila cerca de 40 a 50% do nitrogênio total do mosto, sendo este principalmente nitrogênio amínico.

ALVES & DEL BIANCO (1971) verificaram que a nutrição nitrogenada auxilia o desenvolvimento da levedura, assimilação do nitrogênio e consumo de açúcar no meio. Adicionando sulfato de amônio no mosto de melaço para multiplicação, obtiveram melhoria operacional na eficiência do processo, com aumento de 100 a 200% na massa celular de leveduras.

Todas as leveduras são capazes de utilizar sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (WICKERHAM, 1946).

Segundo MASSART & HORNES (1952), as leveduras desenvolvem-se melhor em meio contendo glicose mais sulfato de amônio, quando comparado com leveduras desenvolvidas em meio contendo apenas glicose. *Saccharomyces cerevisiae* acumulou 44% de proteínas quando foi adicionado 1% de sulfato de amônio no meio de cultura.

MAGALHÃES et alii (1980), usando mosto de melaço, encontraram um aumento no teor de proteína celular em *Saccharomyces cerevisiae*, quando o teor de sulfato de amônio no meio era aumentado.

GREGORI et alii (1978) verificaram que a suplementação de sulfato de amônio, nas quantidades de 2,6 a 2,7 g/l, aumentava a massa celular no decorrer do processo

aeróbico de multiplicação.

VAIRO et alii (1975) verificaram que a adição de sulfato de amônio aumentava consideravelmente a concentração celular, evidenciando que o nitrogênio era fator limitante para a multiplicação. Observaram em *Saccharomyces cerevisiae* que a massa celular produzida e o teor de nitrogênio nas leveduras aumentavam nos tratamentos com nitrogênio e, conseqüentemente, a concentração do elemento no meio decrescia.

O nitrogênio proporciona à levedura melhores condições para o seu desenvolvimento, tornando-a mais resistentes às infecções normalmente provocadas por bactérias (BISHOP, 1971).

LITVINENKO et alii (1981) informaram que, com *Candida utilis*, aumentos na concentração de NH_4^+ no meio de multiplicação levam a decréscimos da taxa de absorção da glicose e crescimento da levedura. A taxa de brotamento apresentava flutuação cíclica e o total do número de células por unidade de volume permanecia constante. Já o nitrato tem efeito danoso à multiplicação (NOTKINA et alii, 1975).

Em leveduras de panificação, se o nitrato é reduzido a nitrito, o desenvolvimento da levedura é prejudicado (SUOMALAINEN & OURA, 1971).

NOTKINA et alii (1975) adicionaram 0,004% de NO_2 no mosto e observaram que a produção de massa celular

foi 8-10% abaixo do normal. Com adição de 0,009% de NO_2 , notaram que a produção de massa celular decresceu 17 a 21%.

Segundo FULMER et alii (1921), cloreto de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e tartarato de amônio devem ser adicionados no mosto numa concentração de 0,06%.

FALCONE & ARRUDA (1964) relatam que nas indústrias alcooleiras do Brasil a suplementação de nitrogênio é feita pela adição de 1,0 a 1,5g de fosfato ácido de amônio por litro de mosto.

A multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* em melaço foi realizada por ARAÚJO (1970), verificando que sem adição de nutrientes o peso da massa celular produzida chegava a 0,084 g/100ml, enquanto que, quando o mosto recebia 0,5g/l de sulfato de amônio, a massa celular produzida era 0,230 g/100ml, apresentando um incremento de 63% sobre o mosto isento de nutrientes.

DEVEREUX & TANNER (1927) registraram que o ótimo de concentração de NH_4Cl para o crescimento da levedura era de 1,88 g/l de meio contendo 100 g de sacarose.

A adição de sulfato de amônio em melaços deficientes promoveu um aumento no consumo de açúcar pela levedura, na velocidade de fermentação e na produção de etanol. Já em melaços normais, a velocidade de fermentação com ou sem adição da fonte de nitrogênio, foi praticamente a mesma: a vantagem na eficiência, ao redor de 7%, deve ser

balanceada contra o custo da adição de sulfato de amônio (ARAÚJO, 1970).

Já HARRISON & GRAHAM (1970), estudaram o efeito da fonte de nitrogênio na eficiência da fermentação alcoólica. Observaram que a maior eficiência foi obtida ao se utilizar uma mistura de aminoácidos como fonte de nitrogênio (96%), seguido do tratamento que não recebeu nitrogênio (93,1%) e, finalmente, o tratamento com sais de amônio (90,5%).

MAGALHÃES et alii (1980), estudando a influência da fonte de nitrogênio para a fermentação alcoólica, relataram que a adição de sulfato de amônio acarreta aumento tanto na quantidade de proteína da levedura residual da fermentação como na produtividade de etanol.

STUPIELLO & HORII (1981), afirmaram que, se há uma limitação de nitrogênio, o crescimento celular é afetado, e, como consequência, uma significativa quantidade da glicose pode ser convertida em glicogênio, além do fato de que, em ausência de nitrogênio, a velocidade de fermentação diminui, aumentando, consequentemente, o tempo de fermentação e diminuindo a produtividade. O nitrogênio deve aparecer em níveis da ordem de 300-350 ppm de N total, ocorrendo um residual da ordem de 30 a 50 ppm de N total. Igualmente se pode verificar que teores elevados de nitrogênio não estão unicamente relacionados ao maior crescimento celular, mas também concorrem para o maior rendimento

alcoólico.

O aproveitamento do nitrogênio e os produtos de sua metabolização dependem consideravelmente da forma pela qual ele é oferecido à levedura. Uma fonte não adequada de nitrogênio acarreta um aumento da produção de componentes secundários no vinho, como os álcoois amílico ativo, isoamílico, propílico, etc., que devem ser eliminados durante a retificação. Assim, quando a levedura não encontra nitrogênio na forma amoniacal no meio, ela o retira de outros compostos, como os aminoácidos, resultando os produtos indesejáveis citados anteriormente, em grande quantidade (NOVAES, 1980). Segundo ROTHSTEIN & DEMIS (1953); REED & PEPPLER (1973) a quantidade ideal de NH_4^+ no mosto para se obter uma boa fermentação alcoólica está compreendida entre 10-35 mM.

Jã AMORIM (1985), afirma que teores de nitrogênio no mosto entre 500 a 600 ppm são necessários para uma fermentação alcoólica eficiente.

O nitrogênio foi o elemento cuja deficiência mais evidenciou o decréscimo na produção de matéria seca das leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300A. As exigências quanto ao nitrogênio pelas leveduras, foram maiores em mosto de xarope que em mosto de melaço (ZAGO, 1982).

SUOMALAINEN & KAHANPAA (1963) postularam que a adição de sulfato de amônio a uma solução de 10% de sacarose, diminui a formação de álcoois isobutílico e isoamílico.

O di-isopropil amino e o di-isobutil amino não foram metabolizados, havendo, portanto, inibição na formação do óleo fúsel. A influência do sal de amônia pode ser devido ao seu efeito no desenvolvimento da levedura, o que facilita a efetiva utilização do ceto-ácido formado, limitando assim sua transformação em óleo fúsel.

Segundo BRAU (1957), a produção de óleo fúsel, bem como a natureza de seus constituintes, dependem da composição do meio a ser fermentado. A adição de leucina aumenta o teor de óleo fúsel, enquanto que a adição de 0,8g de sulfato de amônio/l do mosto reduz a um mínimo a quantidade de óleo fúsel na fermentação do malte.

OUGH & BELL (1981) afirmam que a adubação nitrogenada da videira pode afetar os teores de álcoois superiores (n-propanol, isobutanol, isoamílico e álcool amílico) presentes no vinho fermentado. Fertilizações com baixas doses de nitrogênio aumentam os teores de álcoois isobutílico e isoamílico. Os teores de nitrogênio-amínico (100-300 ppm), determinados durante a fermentação, não mostraram correlação positiva entre a concentração de nitrogênio e a quantidade de óleo fúsel formado.

2.2. Fósforo

O fósforo constitui um elemento essencial tanto para o crescimento como para a fermentação, sendo mui-

to importante no metabolismo de carboidratos devido ao mecanismo de acúmulo, transferência e liberação de energia, através de ligações fosfóricas de alto nível energético (STUPIELLO & HORII, 1981).

Entre as funções que o fósforo desempenha no metabolismo celular, estão a participação nas reações gerais da glicólise, ação do gliceraldeído - 3 - fosfato desidrogenase, potencial de redox e oxidações na cadeia respiratória (LEGGETT, 1961).

Existe uma relação entre o polifosfato e a entrada de glicose na célula (STEVENINCK & BOOIS, 1964), segundo a qual o polifosfato pode servir como carregador fosforilado para o transporte ativo da glicose (STEVENINCK & ROTHSTEIN, 1965).

Segundo INDGE (1968), polifosfato é uma forma como o fosfato pode ser acumulado no vacúolo da célula.

NORDHEIN (1969) descreve que num meio livre de fósforo, mas com outros nutrientes em níveis normais, a diminuição de fósforo no conteúdo celular ocorre paralelamente com o decréscimo na respiração.

A importância do fósforo reside na sua função durante a transformação do açúcar em álcool, assim como na produção de ATP, tanto na glicólise como na cadeia respiratória (AMORIM, 1977).

O fósforo é absorvido pela levedura na forma de ânion monovalente, $H_2PO_4^-$. A um pH de 4,5 o íon

fosfato encontra-se totalmente na forma de H_2PO_4^- , sendo, portanto, esse pH ótimo para absorção de fósforo pela levedura (AMORIM, 1977).

De acordo com JONES et alii (1981), o fósforo como H_2PO_4^- que é essencial para o crescimento celular e é requerido em concentrações em torno de 0,6 mM/g de células para uma ótima velocidade de fermentação.

O fósforo depois de absorvido poderá participar diretamente das reações da glicose e cadeia respiratória, ou ser armazenado como metafosfato nos vacúolos. As leveduras sempre acumulam grandes quantidades de metafosfatos solúveis e insolúveis dentro dos vacúolos e os utilizam quando necessários. Íons fosfatos são absorvidos mais rapidamente em presença de íons K^+ do que Na^+ . Fontes comerciais de fósforo incluem os sais de fósforo e amônio, superfosfato simples e triplo e o ácido fosfórico. Compostos orgânicos fosfatados podem ser desfosforilados pela enzima fosfatase, situada na parede celular e este grupo fosfato pode ser posteriormente absorvido pela levedura (AMORIM, 1977).

Um aspecto que chama atenção no metabolismo de polifosfato em leveduras é a variabilidade no conteúdo do mesmo. Em células deficientes este pode não ser detectado. Por outro lado, com suprimento de fósforo a levedura pode acumular acima de 20% de seu peso em polifosfato (HAROLD, 1966).

FALCONE & ARRUDA (1964) relatam que as quantidades de fósforo usadas na suplementação de meios de crescimento, em nível industrial, é de 1,0 a 1,5 g de fosfato monoácido de amônio por litro de mosto de melaço, o que corresponde a 234 a 352 ppm de fósforo.

Segundo FULMER et alii (1921), a concentração ótima no mosto está em torno de 0,02% de fosfato bibásico de potássio, que corresponde a 35,6 ppm de fósforo.

ZAGO (1982), analisando o efeito da suplementação de fósforo, nas doses: 0, 75 e 150 ppm, na forma de fosfato monoácido de potássio, verificou que o fósforo, quando em baixa concentração, afeta a produção de massa celular, embora de uma forma menos acentuada que o nitrogênio.

JUNI et alii (1948), pesquisando sobre a distribuição de compostos fosfatados no metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, observaram que, quando o meio continha fósforo e nitrogênio, ocorria aumento na quantidade de compostos fosfatados em relação ao meio que não continha nitrogênio. Na ausência de nitrogênio, o teor de ácido ortofosfórico era 3,2 mg/100 g de matéria fresca da massa celular e quando continha nitrogênio o teor de ácido ortofosfórico, era 4,0 mg/100 g. O teor de ácido metafosfórico, em meio sem nitrogênio era 6,6 mg/100 g e com nitrogênio 7,3 mg/100 g de matéria fresca de massa celular.

OLIVEIRA & SOUSA (1970) encontraram uma cor-

relação altamente significativa entre fósforo e nitrogênio em leveduras, atribuindo-a a intervenção do fósforo no sistema ADP-ATP influenciando no metabolismo nitrogenado.

A produção de biomassa de levedura em vinhaça está relacionada com fatores de crescimento e depende da espécie utilizada. Leveduras do gênero *Candida*, suplementadas com H_3PO_4 em doses crescentes proporcionaram aumentos também crescentes nos teores de fósforo (1,54 a 1,87%). Relacionando estes valores com os teores de nitrogênio, observaram que o menor teor de P (1,54%) correspondeu ao maior teor de N (7,32%). Inversamente, o maior teor de P (1,87%), correspondeu ao menor teor de N (4,8%). Portanto, aumentando-se o teor de P na levedura, há uma tendência de diminuir a concentração de N (TAUK & GAMBALE, 1978).

Segundo ZAGO (1982), o fósforo, quando em baixa concentração no mosto, afeta a produção de matéria seca das leveduras.

JENNINGS et alii (1958), verificaram que durante a absorção de fósforo pela levedura, as células adquirem capacidade para absorver manganês e magnésio. O fósforo funciona como carregador destes elementos, fato que ocorre no processo de fosforilação, através do qual os cátions foram pares e há absorção do fosfato.

MAGALHÃES et alii (1980), trabalhando com mosto de melaço não encontraram aumento no teor de proteí-

nas, quando adicionaram fosfato de sódio (258 ppm de fósforo) aos mostos utilizados e concluíram que nas condições em que foram realizados os seus ensaios, só o nitrogênio era o fator limitante.

A adição de fosfato em mosto de melaço provoca sensível melhora na assimilação do nitrogênio pela levedura (ALVES & DEL BIANCO, 1971).

OLIVEIRA & SOUSA (1970) afirmam ocorrer um maior acúmulo de fósforo, quando há um aumento na absorção de nitrogênio. Uma elevação maior no teor de fósforo em meio contendo mais nitrogênio, também pode ser observado em plantas superiores (HEWITT, 1963).

JENNINGS et alii (1958) demonstraram que um carregador de fosfato é sintetizado durante a atividade glicolítica. Em contraste, o carregador de manganês não pode ser sintetizado somente pela atividade glicolítica, o que leva a sugerir que o carregador de manganês é um composto fosforilado formado na membrana celular como um produto direto dos sistemas de transferência de fosfato (carregadores de fosfato).

Segundo STUPIELLO & HORII (1981), para que se obtenha uma fermentação alcoólica de bom rendimento, o fósforo deverá encontrar-se dentro dos níveis de 125 - 150 ppm de P_2O_5 .

AMORIM (1985) afirma que teores de fósforo entre 50 a 100 ppm no mosto são requeridos para uma fermentação.

tação alcoólica eficiente.

Uma concentração de PO_4^{3-} de 2 a 18 mM, no mosto, permite obter eficiência de fermentação satisfatória (ROTHSTEIN & DEMIS, 1953; REED & PEPPLER, 1973; ATKIN & GRAY, 1947).

LEVANDOVSKI et alii (1981) adicionaram H_3PO_4 em mosto de melaço e obtiveram, após fermentação, teor alcoólico de 9,24%. A adição de fósforo e nitrogênio resultou em teor alcoólico de 9,17%. Na ausência de ambos os nutrientes, o teor alcoólico conseguido foi de 9,10%.

ARAÚJO (1970), fermentando mosto de melaço de cana, concluiu que a adição de 0,6 g/l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ produziu uma massa celular de 0,203 g/100 ml, quando comparada à produção de 0,084 g/100 ml sem suplementação. O melhor resultado foi obtido com adição de 0,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,6 g/l Na_2HPO_4 , em que a produção de biomassa foi de 0,564 g/100 ml.

2.3. Potássio

O potássio atua como ativador em uma série de reações da glicólise e em outros passos do metabolismo. Por outro lado, facilita a estabilidade, juntamente com Ca e Mg, das membranas celulares. O íon fosfato não é absorvido pela levedura na ausência de potássio no meio.

O sódio e o íon amônio podem, até certo ponto,

substituir o potássio em algumas de suas funções, mas não completamente (AMORIM, 1977).

A função do potássio (K^+) é participar da glicólise, como ativador da enolase (AZAMORA, 1978).

SUOMALAINEN & OURA (1971) afirmam que a quantidade de potássio absorvida pela levedura durante a fermentação é o dobro em relação à quantidade exigida na sua multiplicação e crescimento.

HIDEO et alii (1975), estudando os efeitos do potássio na multiplicação de leveduras, utilizaram doses numa amplitude de variação de 0,2 a 10 mM e verificaram que, quando o meio continha menos de 4 mM, a produção de massa celular diminuía. Observaram também aumento na massa celular, mas diminuição no teor de potássio e nitrogênio.

GAMBALE (1980), multiplicando leveduras do gênero *Candida*, usando como substrato a vinhaça, verificou que quantidades crescentes de sulfato de potássio (0,30 a 0,60 g de K_2SO_4 /ℓ de vinhaça) funcionaram como indutoras na produção de biomassa de algumas espécies. As doses de K_2SO_4 utilizadas na vinhaça, fizeram variar o teor de nitrogênio na levedura, entre 6 e 7%.

FOULKES (1956), pesquisando o transporte de cátions em leveduras, observou que adicionando glicose e fósforo ao substrato, conseguia-se um aumento da absorção de potássio (81 micromoles de K/g de leveduras).

A quantidade de açúcar consumido aumenta 83%

na presença de potássio no meio (ROTHSTEIN & DEMIS , 1953).

O efeito estimulado do potássio na fermentação se afigura estar diretamente relacionado com o pH do meio. Quanto mais baixo é o pH do meio, maior é o efeito positivo do potássio (AMORIM, 1977).

Concentrações ente 700 a 1.200 ppm de K no mosto são necessárias para se obter uma boa fermentação alcoólica (AMORIM, 1985).

2.4. Magnésio

O magnésio atua como ativador enzimico em diversas reações da via fermentativa, sendo elemento indispensável para multiplicação e para a fermentação. Deficiência de magnésio pode causar deformação celular e retardar a liberação da célula-filha pela célula-mãe.

O magnésio é um elemento importante para o crescimento de leveduras (FULMER et alii, 1921, 1936; SUGATA & KOCH, 1926; DEVEREUX & TANNER, 1927; LESH et alii 1938; OKOROKOV et alii, 1976 e LING & HOSENEY, 1977).

Magnésio é um catalisador valioso de uma série de transferases de fosfato e um certo número de descarboxilases tendo, portanto, papel fundamental na fermentação (SUOMALAINEN & OURA, 1971).

CONWAY & BEARY (1958) salientam que o íon magnésio pode ser ativamente transportado em grande quanti-

dade através da membrana celular, funcionando o íon K^+ como carregador. Entretanto, isto ocorre somente quando o íon Mg^{2+} encontra-se presente como cátion inorgânico em meio fluido, e em apreciável concentração. Inibição na absorção de Mg em torno de 50% foi verificada quando a concentração de potássio estava em torno de 0,58 mM.

JENNINGS et alii (1958) sugerem um carregador de magnésio e manganês dependente de fósforo e asseguram que somente uma pequena fração de fosfato que entra na célula está envolvida na formação dos carregamentos de magnésio e manganês, já que a maior parte do fosfato absorvido é considerado na forma de polifosfato, ATP e intermediários glicolíticos.

Dentro de certos limites, elevando-se a concentração de potássio verifica-se redução na absorção de magnésio.

A absorção de Mg e Mn é estimulada pelo potássio quando em baixa concentração, mas inibida por esse elemento quando em alta concentração. Por outro lado, o transporte do Mg e Mn no interior da célula é realizado por um mecanismo que envolve fósforo e proteína celular (ROTHSTEIN et alii, 1957).

Segundo AMORIM (1977), o magnésio pode sofrer a competição de vários íons presentes no meio. Atribui-se ao cálcio um efeito inibidor tanto ao crescimento como à fermentação alcoólica, e este efeito inibidor parece

estar ligado à competição entre cálcio e magnésio pelo mesmo sistema de transporte através do plasmalema.

CONWAY & BEARY (1962) demonstraram a competição entre potássio, rubídio, césio e magnésio. Quando o magnésio ocorre em grandes quantidades no meio externo, e o potássio, em quantidades normais, funciona como transportador de magnésio.

CONWAY & DUGGAN (1956), afirmam que o potássio e o magnésio são absorvidos pela célula por meio do mesmo carregador. Observaram que se aumentando o teor de potássio no mosto reduz-se, dentro de certos limites, a absorção de magnésio.

Leveduras crescidas em meio contendo quantidades mínimas de potássio e alta taxa de magnésio, seu crescimento era completamente inibido por 3 - 4 dias, após o que o processo desenvolvia-se lentamente. As células deficientes em magnésio ficavam alongadas e formavam longas cadeias (CONWAY & BEARY, 1962).

O pH do meio influencia marcadamente a absorção de magnésio e potássio. Segundo CONWAY & BEARY (1962), na região de pH 3,5 a 4,5, o magnésio é ativamente absorvido na presença de fosfato e o potássio não acusa nenhum efeito inibitório.

ROTHSTEIN et alii (1957), evidenciam que a absorção de Mg e Mn é estimulada pelo potássio quando em baixa concentração, mas inibida pelo elemento quando em al-

ta concentração. Por outro lado, o transporte de magnésio e manganês no interior da célula é realizado por um mecanismo que envolve fósforo e proteína celular.

Segundo FALCONE & ARRUDA (1964), a fonte de magnésio a ser utilizada é o sulfato de magnésio pentahidratado, na dosagem de 0,2 a 0,25 gramas por litro de mosto de melão, sendo correspondente de 22 a 27,5 ppm de magnésio.

MAGALHÃES et alii (1980) não encontraram aumento de produção de proteína celular quando adicionaram sulfato de magnésio, na dosagem de 0,25 g/l de mosto na forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em mosto de melão.

ZAGO (1982), não encontrou também alteração na produção de matéria seca, quando complementou mostos de melão e xarope com $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. As quantidades médias de magnésio nos mostos usados, 0,0167% (xarope) e 0,051% (melão), mostravam-se suficientes.

FULMER et alii (1921) verificaram que, em meio sintético, adições de sulfato de magnésio até 0,22% diminuíram o crescimento da levedura Fleischmann. Adições posteriores até 0,04% de sulfato de magnésio aumentaram o crescimento. Em concentrações de 0,04 à 0,1% de sulfato de magnésio não ocorreu diferença no crescimento, mas acima de 0,1% o crescimento foi diminuído.

2.5. Cálcio

Não se considera o cálcio muito importante para a fermentação e altas concentrações podem afetar sensivelmente, tanto o crescimento da levedura com a fermentação alcoólica. Este efeito inibidor do cálcio parece estar ligado à competição entre o Ca^{2+} e o Mg^{2+} e outros cátions pelo mesmo sistema de transporte, através do plasmalema (AMORIM, 1977).

RICHARDS (1925) comprovou que a melhor concentração de cálcio para produção de massa celular e fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* está em torno de 0,0001 M. Altas concentrações de Ca desempenham papel inibidor e baixas concentrações são inadequadas para melhor multiplicação de leveduras e fermentação alcoólica.

As ações catalíticas dos micronutrientes nos processos de metabolismo, de ativador de enzimas e de estimulante no desenvolvimento de microrganismo, têm sido amplamente estudadas por vários pesquisadores.

2.6. Zinco

Zinco, tem sido relatado como essencial para o crescimento de leveduras. Tem funções fisiológicas importantes, como co-fator para numerosas metaloenzimas.

AULD et alii (1976) e WANDZILAK & BENSON,

(1977) relatam que as RNA polimerase são zinco metaloenzimas. Consequentemente, a deficiência de zinco é claramente capaz de afetar o crescimento em nível de transcrição, bem como em nível de metabolismo intermediário (LAWFORD & PIK, 1980 a).

LAWFORD & PIK (1980 b) observaram que o meio deficiente em zinco resulta em pronunciado decréscimo no crescimento da cultura. Concluíram que a deficiência de zinco provoca um efeito deletérico no metabolismo energético.

Segundo PECIULIS et alii (1969), o zinco aumentou a quantidade de nitrogênio total em leveduras. A quantidade de aminoácidos livres na célula pode ser reduzida mais que duas vezes na presença de zinco. A redução da quantidade de aminoácidos livres e o aumento de aminoácidos ligados, provam que este elemento estimula a inclusão dos aminoácidos nas proteínas.

PECIULIS (1973), afirma também, que o zinco pode ativar fosfatases ácidas e também estimular a biossíntese de riboflavina e ácido fólico em leveduras.

LAWFORD et alii (1980) observaram que a composição da levedura *Candida utilis* NRRL-V-900, com respeito ao conteúdo de RNA e proteína, não foi afetado pela limitação de zinco.

LAWFORD & PIK (1980 b) relataram que células de *Candida utilis* podem acumular zinco durante o crescimen-

to.

Doses de zinco entre 0,2 a 200 ppm estimulam o crescimento da levedura, enquanto doses entre 300 a 500 ppm o inibem parcialmente (MC HARGUE & CALFEE, 1931).

FEDOROVA et alii (1978) encontraram altos teores de zinco em fermento de padaria com alta capacidade fermentativa.

OLSON & JOHNSON (1949), observaram que *Saccharomyces cerevisiae* Y-30 requerem 1,2 ppm de zinco para crescimento máximo.

POPENKO & BAYAKHUMOV (1971) afirmam que 30 mg de sulfato de zinco por litro de mosto, aumentam o desenvolvimento de leveduras.

FREY et alii (1967) adicionaram 0,5 ppm de zinco em meios de fermentação de cerveja, contendo e 0,04 a 0,07 ppm de zinco obtendo ganhos, quanto à fermentação e ao crescimento de leveduras.

HORII (1980) cita que o zinco, cobre e também outros elementos, em baixas concentrações, são considerados como ativadores do metabolismo das leveduras. Em concentrações, porém, relativamente elevadas, podem agir como inibidores, impedindo a utilização de glicose.

STEINER & LANZLINGER (1978), realizando fermentações com variações nas doses de zinco entre 200 a 2000 microgramas/litro, concluíram que 200 µg/l era a concentração ideal. A este nível de adição de zinco, a concentra-

ção de ácidos voláteis, aldeídos e diacetil era baixa na fermentação. A deficiência de zinco no meio inibia a desidrogenase na fermentação, enzima que catalisa a redução de acetaldeído a etanol e que requer zinco para ativá-la.

OLIVEIRA & SOUSA (1970) afirmam ocorrer a formação de fosfatos insolúveis de zinco, alumínio, ferro e manganês nas células de leveduras.

Polímeros de polisfosfatos acumulados nas células de leveduras são possíveis agentes armazenadores de zinco (LAWFORD & PIK, 1980 b).

2.7. Manganês

Manganês tem sido citado como importante para o crescimento das leveduras (MC HARGUE & CALFEE, 1931; LIMA, 1954; MORRIS, 1958; PECIULIS et alii, 1969; PECIULIS, 1973 e ORTH & BUSHUK, 1973).

Segundo OLSON & JOHNSON, 1949; POPENKO & BAYAKHUMOV, 1971 e LING & HOSENEY, 1977, manganês não teve nenhum efeito no crescimento das leveduras.

O manganês está associado com a ativação da arginase e a biossíntese de tiamina é por ele fortemente ativada (MORRIS, 1958 e PECIULIS, 1973).

O manganês estimula o aumento de proteína, embora em menor grau que molibdênio e zinco (PECIULIS et alii, 1969).

O manganês, além de poder substituir parcialmente o magnésio, também pode substituir o zinco na desidrogenase alcoólica. Porém, a desidrogenase alcoólica com manganês em vez de zinco é mais facilmente desnaturada pelo calor (COLEMAN & WEINER, 1973).

O manganês, zinco e cobalto têm sua absorção ativa e dependem de gasto de energia. Por outro lado, a absorção desses elementos decresce com a diminuição de pH e também com a presença de cálcio e magnésio. (FUHRMAN & ROTHSTEIN, 1980).

Pequenas quantidades de manganês promovem o crescimento das leveduras, mas quantidades excessivas são tóxicas. A concentração ótima de manganês é de 10 ppm (MC HARGUE & CALFEE, 1931).

A dose de 10 ppm de manganês estimula o crescimento da levedura, enquanto que doses acima de 500 ppm são tóxicas (MORRIS, 1958).

LIMA (1954), em condições de fermentação industrial, concluiu que as doses mais aconselháveis de sulfato de manganês são de 0,01 a 0,08 g/l, sendo de 0,01 g/l a dose ideal para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Segundo ZAGO (1982), as concentrações médias de manganês, magnésio e zinco e mosto de xarope e melaço eram suficientes para a multiplicação das leveduras testadas.

Nas condições brasileiras, em mosto de caldo

e melão, o manganês encontra-se em concentrações maiores que o zinco, talvez devido à acidez dos nossos solos que proporciona uma solubilização maior do manganês (AMORIM, 1985).

2.8. Cobre e Ferro

O cobre e o ferro são requeridos em pequenas quantidades, principalmente na fase de multiplicação e crescimento das leveduras. Devido ao fato desses elementos fazerem parte da cadeia respiratória, na transferência de elétrons e ATP, sua importância na fermentação alcoólica é muito menor, pois sem oxigênio a cadeia respiratória tem o seu funcionamento reprimido.

PRESCOTT & DUNN (1959) demonstraram que fermento de panificação requer certas concentrações de ferro e cobre no meio, para apresentar um desenvolvimento satisfatório, sendo esses elementos essenciais para a elaboração dos citocromos.

Segundo ELVEHJEM (1931), o ferro acelera a taxa de crescimento e metabolismo das leveduras e exerce influência na síntese de citocromo. O cobre tem a propriedade de estimular a formação de certos compostos hemáticos. Dose de 0,01 mg de cobre por 100 ml de mosto é o nível ótimo para estimular a formação do citocromo a.

NAIKI & YAMAGATA (1976), afirmaram que o co-

bre inibe completamente o crescimento da levedura a 1,0 ppm mas poderá tolerar até 1.000 ppm se convenientemente adaptada. Esta tolerância depende da espécie e linhagem da levedura. A resistência ao cobre parece estar relacionada à capacidade da levedura de produzir uma proteína de baixo peso molecular, rica em grupamentos tióis que se ligam ao cobre.

POPENKO & BAYAKHUMOV (1971), estudando os efeitos dos micronutrientes: Cu = 10 ppm de CuSO_4 ; Fe = 50 ppm de FeSO_4 ; Mn = 30 ppm de MnSO_4 e Zn = 30 ppm de ZnSO_4 , verificaram que, nestas concentrações, os nutrientes estimulavam o desenvolvimento dos microrganismos.

KARVANEK & JANICEK (1972) determinaram os seguintes teores de micronutrientes em leveduras de panificação: Cu = 18,6 ppm; Fe = 108,6 ppm; Mn = 38,4 ppm e Zn = 142,6 ppm.

POMERANZ & DIKEMAN (1977), analisando os teores dos nutrientes em levedura, encontram os seguintes valores: K = 1.960 ppm; Mg = 1.870 ppm; Ca = 310 ppm; Cu = 11 ppm; Fe = 79 ppm e Zn = 29 ppm.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido na Usina São José "ZL", em Macatuba-SP, na safra 84/85 no período compreendido entre 14/7 a 26/7, utilizando-se 14 dornas de fermentação com 12 ciclos consecutivos por dorna, no sistema Melle-Boinot de fermentação alcoólica.

3.1. Material

3.1.1. Mosto

Foram utilizados no experimento mostos preparados a partir de uma mistura de 50% de caldo clarificado, 20% de xarope e 30% de melaço. A concentração final do mosto era de aproximadamente 20% (g/100 ml) em açúcares redutores totais.

As médias dos resultados de A.R.T., pH e temperatura durante o experimento podem ser observados na Tabela 5.

3.1.2. Microrganismo

A levedura empregada nas fermentações alcoó-

licas foi *Saccharomyces uvarum* - IZ-1904 adquirida no Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

3.1.3. Suplementação de sais no mosto

Em todas as dornas de fermentação foram adicionados os seguintes sais: sulfato de amônio (50,0 kg/dorna), fosfato diamônio (15,0 kg/dorna), sulfato de magnésio (10,0 kg/dorna) e sulfato de zinco (1,0 kg/dorna).

Assim, os mostos receberam as seguintes complementações:

- 58 ppm de N na forma de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$.
- 15 ppm de N na forma de fosfato diamônio $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$.
- 16 ppm de P na forma de fosfato diamônio $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$.
- 5 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.
- 2 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Todos os sais utilizados durante o experimento, eram na forma comercial, obedecendo a maneira e as dosagens que a destilaria vinha utilizando.

Os nutrientes eram diluídos com água e em seguida adicionados às dornas de fermentação durante o enchimento das mesmas.

3.1.4. Dornas de fermentação e pré-fermentadores

As fermentações alcoólicas foram realizadas em dornas fechadas de 180 m³ de volume útil.

Já o lêvedo era preparado em pré-fermentadores de 64 m³ de volume útil, constituídos de agitadores mecânicos e aeração forçada.

3.2. Condução das fermentações

Inicialmente as leveduras eram adicionadas ao mosto, ocorrendo a fermentação alcoólica. O tempo médio de fermentação era de 8 horas.

Concluída a fermentação, o vinho resultante passava por filtros de malhas, sendo enviado então a centrifugação. Após a centrifugação duas fases eram obtidas: uma suspensão concentrada, com cerca de 60 a 70% de massa celular e a fase sobrenadante, composta de vinho, resíduos leves e bactérias. O sobrenadante era encaminhado à dorna volante, espécie de depósito intermediário de vinho onde ficava aguardando a destilação. A suspensão concentrada de células, denominada normalmente de creme ou "leite-de-leveduras" seguia para os pré-fermentadores ou cubas de tratamento, normalmente providas de um sistema de agitação, onde sofria a adição de água (cerca de 1,5 a 2,0 vezes o volume de "leite-de-leveduras") e ácido sulfúrico concen-

trado ($d = 1,84$) até o meio atingir um pH de 2,5 a 2,8. A suspensão permanecia sob essas condições durante aproximadamente 3 horas, para que parte das bactérias remanescentes do processo fossem mortas ou reduzidas a níveis não prejudiciais à fermentação posterior.

O "leite-de-leveduras" assim tratado retornava às dornas, servindo de inóculo para o próximo ciclo fermentativo.

3.3. Amostragens

3.3.1. Amostragem do mosto (amostragem automática)

O mosto era amostrado intermitentemente, através de um amostrador automático, o qual permanecia aberto por 1 segundo, a cada intervalo de tempo de 3 segundos, constituindo uma amostra composta de aproximadamente 1.000 ml a cada 1 hora.

3.3.2. Amostragem do lêvedo (amostragem manual)

As amostragens do lêvedo foram efetuadas nas cubas de tratamento, antes da inoculação do lêvedo ao mosto.

3.3.3. Amostragem do vinho (amostragem manual)

O vinho foi amostrado, nas dornas, logo após

terminar a fermentação.

Considerava-se como final da fermentação quando duas leituras de $^{\circ}\text{Brix}$, forneciam idêntico valor.

3.3.4. Amostragem do vinho centrifugado (amostragem manual)

O vinho centrifugado, foi amostrado durante a centrifugação sendo as amostras, coletadas na tubulação de entrada da dorna volante.

3.4. Determinação de A.R.T. no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifugado

A determinação dos açúcares redutores totais (A.R.T.) no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifugado obedeceu o método de Somogyi & Nelson, adaptado por AMORIM et alii (1982).

3.5. Determinação dos elementos minerais no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifugado

O nitrogênio foi analisado pelo método de Kjeldahl, modificado por SARRUGE & HAAG (1974), após digestão sulfúrica das amostras.

O fósforo foi analisado pelo método do amarelo de molibdênio após digestão nitroperclórica das amos-

tras, segundo CATANI & JACINTHO (1974).

O cálcio, magnésio, manganês, cobre, ferro e zinco tiveram suas concentrações determinadas por espectrometria de absorção atômica, segundo PERKIN & ELMER (1976), após digestão nitroperclórica das amostras.

O potássio e o sódio foram determinados por fotometria de chama.

3.6. Determinação de teores alcoólicos no vinho e lêvedo

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia gasosa, em cromatógrafo Variam 3700, utilizando-se coluna 20% Carbowax 20 M sobre Cromosorb W-AW-DMCS 60/80 Mesh com 330 mm de comprimento e 3,17 mm de diâmetro, a temperatura de 100°C. O detetor de ionização de chamas operou a temperatura de 150°C e o injetor, a 110°C. Utilizou-se o nitrogênio como gás de arraste, a velocidade de 30 ml/min, e como gases de combustão, foram utilizados hidrogênio e ar sintético.

As amostras foram colocadas em banho de gelo no momento da retirada do experimento e conservadas em "freezer" até o momento da análise.

As amostras foram previamente centrifugadas a 3.500 r.p.m. por 15 minutos, e o sobrenadante, filtrado para remover partículas maiores que 0,45 μ . Volumes correspondentes a 1 μ l foram utilizados para injeção.

Soluções padrões de etanol, nas concentrações 2, 4, 6, 8 e 10%, foram utilizadas para obter uma curva padrão.

3.7. Determinação da eficiência da fermentação

Determinados os parâmetros, teor de ART no mosto, vinho, lêvedo e vinho centrifugado, teor alcoólico do vinho, vinho centrifugado e lêvedo e considerando que 1 g de açúcares redutores totais (A.R.T.) produz 0,64755 ml de álcool etílico a 100% a 20°C, foram calculadas as eficiências da fermentação durante o experimento.

O cálculo das eficiências de fermentação seguiu a seguinte expressão:

$$E (\%) = \frac{\% \text{ álcool obtido (ml/100 ml)}}{(\text{ART inicial} - \text{ART final}) \cdot 0,64755 \text{ (ml/100 ml)}}$$

3.8. Determinação de volumes

No decorrer do experimento, foram determinados os volumes de mosto, vinho e lêvedo envolvidos em cada ciclo de fermentação.

3.9. Balanço de nutrientes

De posse dos dados do item 3.8. e dos resultados de concentrações (ppm) - item 3.5. de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, manganês, ferro, zinco, cobre e sódio, tornou-se possível o cálculo das quantidades (quilograma) e porcentagens desses nutrientes no mosto, lêvedos inicial e final e vinho centrifugado, bem como das complementações efetuadas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas de 1 a 5.

4.1. Nitrogênio

No presente trabalho o teor de nitrogênio encontrado no mosto foi de 840 ppm. Segundo STUPIELLO & HORII (1981), o nitrogênio deve aparecer em níveis da ordem de 300 - 350 de N total, ocorrendo um residual da ordem de 30 a 50 ppm.

AMORIM (1985), afirma que níveis de nitrogênio entre 500 - 600 ppm são necessários para se obter uma fermentação alcoólica com eficiência satisfatória.

A maior concentração de nitrogênio é encontrada nos lêvedos de entrada e saída (Tabelas 1 e 2) inferindo sua importância, não só para uma eficiente conversão de açúcar em etanol, como também para a multiplicação das células de leveduras. Já o teor de nitrogênio no vinho era cerca de 3 (três) vezes maior ao seu teor no mosto.

Em relação às porcentagens desse elemento, o

mosto contribuía com aproximadamente 17% e o levedo de entrada com 80%. Como pode ser observado na Tabela 3, a complementação (2,41%) realizada pela unidade industrial, pouco significava em relação ao teor de nitrogênio no mosto e levedo.

Convém ressaltar, ainda, que a complementação do mosto, utilizando-se como fonte o sulfato de amônio, era bem inferior àquela que se perdia através do vinho centrifugado, isto é, o vinho isento de células de leveduras que era enviado à destilação.

FULMER et alii (1921), afirmam que a dose ótima de nitrogênio para crescimento celular é 0,060% de amônio (446 ppm de N). Já DEVEREUX & TANNER, constataram que o ótimo de concentração de NH_4Cl para o crescimento da levedura foi de 1,88 g/l (492 ppm de N).

Assim, a complementação realizada (73 ppm de N), estava bem abaixo das dosagens recomendadas por esses autores, se pretendesse o crescimento celular das leveduras.

STUPIELLO & HORII (1981), ressaltaram que seria desnecessária a complementação desse nutriente no mosto.

Já VASCONCELOS (1987), recomenda que a retirada total da complementação nitrogenada deve ser bem conduzida para não acarretar sérios problemas à fermentação etanólica, se as condições operacionais do processo forem

diferentes.

4.2. Fósforo

Durante o decorrer do experimento a média do teor de fósforo no mosto foi igual a 50 ppm. Estes dados são concordantes com os resultados obtidos por FULMER et alii (1921), que encontraram concentrações ótimas no mosto em torno de 0,02% de fosfato bibásico de potássio, que correspondem a 35,6 ppm de fósforo. Já AMORIM (1985), afirma que teores de fósforo entre 50 a 100 ppm no mosto são requeridos para uma fermentação alcoólica eficiente.

A adição de fosfato em mosto de melaço provoca sensível melhora na assimilação de nitrogênio pela levedura.

Assim, JUNI et alii (1948), observaram que, quando o meio continha fósforo e nitrogênio, havia aumento na quantidade de compostos fosfatados em relação ao meio que não continha nitrogênio.

Há uma correlação altamente significativa entre fósforo e nitrogênio em leveduras e demonstraram através da intervenção do fósforo no sistema ADP-ATP, influenciando no metabolismo nitrogenado. Assim, como para o nitrogênio, o fósforo apresentou-se em maiores concentrações nos lêvedos de entrada e saída, evidenciando também sua importância para as células de leveduras (Tabelas 1 e 2).

O fósforo em baixas concentrações na levedura, pode afetar a produção da massa celular, embora de uma forma menos acentuada que o nitrogênio (ZAGO, 1982).

Observando os dados da Tabela 3, verificou-se que a complementação realizada no mosto era de 4,54%. O mosto contribuía com 8,72% e o lêvedo de entrada com 86,75%.

Completando o balanço porcentual de fósforo, no vinho centrifugado a porcentagem era 8,33% e finalmente o lêvedo de saída aparecia com 91,67%.

A Tabela 2, revela que a quantidade de fósforo em quilograma no vinho centrifugado era cerca de 2 vezes maior que a complementação. Convém ressaltar que essa quantidade de fósforo presente nesta fase, era totalmente perdida.

4.3. Potássio

O potássio, dentre os elementos estudados, foi o que se destacou em maior concentração em todas as fases como se comprova através das Tabelas 1 e 2.

Dentre as fases estudadas, o mosto é que se destacou com maior concentração (3.627 ppm).

Este resultado encontrado nos 12 ciclos de fermentação, estão acima daquele recomendado por AMORIM (1982), onde concentrações entre 700 a 1.200 ppm de K no mosto, seriam necessárias para se obter uma boa fermentação

alcoólica.

Estes dados poderão sr confirmados analisando-se a Tabela 3, onde o mosto aparece com 75,70% e levêdo de entrada com 24,30 %.

4.4. Magnésio

A maior concentração de magnésio é vista no mosto (387 ppm) com um porcentual de 77,44% em relação às outras fases.

O resultado encontrado para esse elemento é bem superior ao citado por FALCONE & ARRUDA (1964), que registraram valores entre 22 a 27,5 ppm de magnésio para se conseguir eficiências satisfatórias no processo de fermentação alcoólica.

Assim, a complementação utilizada (1,7%) pouco significava em relação à quantidade de magnésio presente no mosto.

Esses resultados podem ser confirmados pela observação da Tabela 3, onde o vinho centrifugado aparece com 80,30%. Convém ressaltar que o magnésio presente no vinho centrifugado é perdido, sendo enviado ao processo de destilação.

Após o mosto, o vinho é a fase que aparece com maior teor (329 ppm), seguido pelo vinho centrifugado e lêvedos de entrada e saída.

O balanço de ppm e porcentagens, que podem ser observados nas Tabelas 1 e 3 poderão ser confirmados com o balanço de massa realizado e apresentados na Tabela 2.

4.5. Cálcio

Dentre as fases estudadas o mosto surge com a maior concentração de cálcio, seguido pelo vinho, vinho centrifugado e lêvedos de entrada e saída, o que pode ser verificado nas Tabelas 1, 2 e 3.

O teor desse elemento na levedura é cerca de 2,8 vezes menor o seu teor no vinho centrifugado, o que pode-se inferir a pequena importância do cálcio ao processo de fermentação alcoólica.

Provavelmente, a quantidade desse elemento no mosto seria suficiente para as necessidades nutricionais das células de leveduras.

Esses resultados podem ser confirmados observando a Tabela 3, onde o mosto aparece com 85,98% e o lêvedo apenas com 14,02%. A maior parte do cálcio é perdida no vinho centrifugado, onde o balanço porcentual mostra que esta fase contribui com 87,92%.

4.6. Zinco

O teor de zinco encontrado no mosto foi

igual a 2 ppm. Este valor é concordante com AMORIM (1985) que encontrou valores entre 1 a 2 ppm de zinco no mosto.

Já POPENKO & BAYAKHUMOV (1971), verificaram que a concentração de zinco de 30 ppm, estimulava o desenvolvimento dos microrganismos.

Os lêvedos de entrada e saída apresentaram a maior concentração desse elemento, inferindo a sua importância para a levedura e, conseqüentemente, para o processo de fermentação alcoólica.

A concentração de zinco nos lêvedos foi de 13 ppm, menor que a encontrada por POMERANZ & DIKEMAN (1977) e KARVANEK & JANICEK (1972) em leveduras de panificação.

Analisando a Tabela 3, constata-se que a complementação efetuada foi de 25,55%, bem superior às adições realizadas para os elementos nitrogênio, fósforo e magnésio. Apesar disso, 36,22% de todo o zinco presente se perdia no vinho centrifugado não sendo portanto aproveitado pela levedura.

4.7. Manganês

O manganês no mosto aparece com um teor de 7 ppm. Segundo MC HARGUE & CALFEE (1931), a dosagem ótima de manganês é de 10 ppm. Já para AMORIM (1985), concentrações entre 1 a 2 ppm são suficientes para se obter uma fer-

mentação alcoólica eficiente.

O teor de manganês no mosto foi superior ao teor de zinco, nesta mesma fase. Esses dados são coincidentes com AMORIM (1985), quando cita que, nas condições brasileiras, em mosto de caldo e melão, o manganês encontra-se em maiores concentrações que o zinco, talvez devido a acidez dos nossos solos que proporcionam uma solubilização mais intensa do manganês. O teor de 2 ppm de manganês na levedura foi inferior ao encontrado por KARVANEK & JANICEK (1972), que foi de 38,4 ppm. Para o vinho e vinho centrifugado o teor desse elemento foi de 6 ppm.

O balanço porcentual apresentado na Tabela 3 comprova que a maior concentração de manganês está presente no mosto (84,04%) e apenas 15,96% no lêvedo de entrada.

Por outro lado, 84,90% do teor de manganês era perdido com o vinho centrifugado.

4.8. Cobre

Observa-se que o cobre foi o nutriente que apresentou a menor concentração, quando comparado aos demais, em todas as fases estudadas. Assim como para os elementos, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio a maior concentração de cobre é encontrada nos lêvedos de entrada e saída.

Convém aqui ressaltar que o lêvedo de saída representa a fração do vinho contendo as leveduras recuperadas do processo de fermentação, nada mais é que o lêvedo de entrada para o próximo ciclo daí essa identidade de valores entre ambas fases.

Assim, os valores encontrados para esse nutriente, correspondente aos lêvedos, são maiores dos encontrados por KARVANEK & JANICEK (1972) e POMERANZ & DIKEMAN (1977).

A Tabela 2 comprova os resultados anteriormente obtidos, onde as fases de maior concentração para o elemento em estudo são os lêvedos.

Pela Tabela 3 o mosto representa 22,86% enquanto o lêvedo de entrada aparece com 77,14%. Já o vinho centrifugado enviado à destilação, representando em sua composição o material não retido pela levedura, mostra um percentual de 58,97%. Completando-se o balanço desse nutriente o lêvedo de saída contribui com 41,03%.

4.9. Ferro

Os resultados obtidos, constantes das Tabelas 1 e 2, revelam uma identidade de valores para todas as fases estudadas, apesar das diferenças estatísticas significativas entre elas.

Assim, apesar das necessidades das células

de leveduras por esse elemento, pode-se considerá-lo como de importância secundária, quando comparados, por exemplo, com o nitrogênio, fósforo, magnésio e manganês.

Esses resultados podem ser comprovados observando-se a Tabela 3 dos balanços percentuais, onde todas as fases estudadas apresentam valores semelhantes entre si.

Os dados encontrados para o teor de ferro na levedura estão abaixo dos valores obtidos por KARVANEK & JANICEK (1972) e POMERANZ & DIKEMAN (1977).

4.10. Sódio

O mosto é a fase onde este elemento surge em maior concentração, seguido pelo vinho, vinho centrifugado e finalmente os lêvedos.

O teor de sódio na levedura é cerca de 2,3 vezes menor que sua concentração no vinho centrifugado, inferindo-se sua pequena importância para o processo de fermentação alcoólica. A concentração desse elemento no mosto, provavelmente seja mais que suficiente para as necessidades requeridas pelas células das leveduras.

Esses resultados são confirmados pela Tabela 3, onde 85,26% de todo o sódio é perdido no vinho centrifugado.

4.11. Eficiência de fermentação alcoólica

As médias dos resultados de eficiência de fermentação alcoólica, para os 12 ciclos de fermentação referentes a 14 dornas, figuram na Tabela 4.

A eficiência média de fermentação alcoólica compreendendo o período dos testes foi de 90,38%.

Uma análise dos resultados obtidos permite caracterizar o desenvolvimento do processo de fermentação alcoólica na unidade industrial dentro de um nível ótimo.

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista, as condições prevalescentes no presente estudo, foram possíveis as seguintes e principais conclusões:

- a) o nutriente em maior concentração no mosto foi o potássio (405,96 kg/ciclo), seguido pelo cálcio (127,09 kg/ciclo) e nitrogênio (94,47 kg/ciclo);
- b) em menores concentrações no mosto, aparecem o cobre (0,16 kg/ciclo), o zinco (0,20 kg/ciclo) e manganês (0,79 kg/ciclo);
- c) nos lêvedos, o nitrogênio com 439,49 kg/ciclo, foi o principal elemento, confirmando a sua grande importância para as células de leveduras e, conseqüentemente para todo o processo fermentativo;
- d) no vinho, os nutrientes em maiores concentrações foram o nitrogênio (547,16 kg/ciclo), o potássio (536,25 kg/ciclo) e o cálcio (147,81 kg/ciclo);
- e) o vinho centrifugado, apresentou o potássio (468,28 kg/ciclo) com teor mais elevado que os demais elementos estudados.

Tabela 1 - Médias das concentrações (mg/l) de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio, referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos, no mosto, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída.

Nutrientes	Mosto mg/l	Lêvedo Entrada mg/l	Vinho mg/l	Vinho Centrif. mg/l	Lêvedo Saída mg/l
Nitrogênio	840	6.833	2.706	467	6.678
Fósforo	50	881	354	32	863
Zinco	2	13	6	3	13
Magnésio	387	182	329	310	181
Manganês	7	2	6	6	2
Ferro	27	38	31	24	39
Cobre	1	7	4	0,5	7
Potássio	3.627	2.043	3.202	3.064	2.028
Cálcio	1.133	322	906	889	320
Sódio	132	47	103	109	47

Tabela 2 - Médias de massas (kg) de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio, referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos no mosto, complementação, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída.

Nutrientes*	Mosto** kg	Compl.** kg	Lêvedo** Entrada kg	Vinho** kg	Vinho** Centr. kg	Lêvedo** Saída kg	D.M.S. (5%)	C.V. (%)
Nitrogênio	94,47 ^c	13,20 ^d	439,49 ^b	547,16 ^a	72,23 ^c	430,03 ^b	22,93	27,74
Fósforo	5,67 ^c	2,95 ^d	56,42 ^b	65,04 ^a	5,02 ^c	55,25 ^b	3,97	4,80
Zinco	0,20 ^e	0,35 ^d	0,82 ^b	1,37 ^a	0,46 ^c	0,81 ^b	0,04	5,44
Magnésio	43,28 ^c	0,95 ^e	11,66 ^d	55,89 ^a	47,16 ^b	11,57 ^d	1,16	3,18
Manganês	0,79 ^c	-	0,15 ^d	0,94 ^a	0,90 ^b	0,16 ^d	0,03	4,29
Ferro	3,03 ^c	-	2,45 ^d	5,48 ^a	3,55 ^b	2,47 ^d	0,17	4,73
Cobre	0,16 ^c	-	0,54 ^b	0,70 ^a	0,07 ^c	0,52 ^b	0,15	38,23
Potássio	405,96 ^c	-	130,29 ^d	536,25 ^a	468,28 ^b	130,09 ^d	12,80	3,55
Cálcio	127,09 ^c	-	20,72 ^d	147,81 ^a	151,97 ^b	20,88 ^d	2,98	2,92
Sódio	15,06 ^b	-	3,00 ^c	18,06 ^a	17,36 ^b	3,00 ^c	2,39	19,20

* As letras superpostas às médias são relativas às comparações múltiplas através do método de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade.

** Médias do nutriente, nas principais fases (dispostos na mesma linha) seguidas de letras distintas, indicam diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Balanços percentuais de nitrogênio, fósforo, zinco, magnésio, manganês, ferro, cobre, potássio, cálcio e sódio referentes a 14 dornas de fermentação alcoólica com 12 ciclos por dorna, no mosto, complementação, lêvedo de entrada, vinho, vinho centrifugado e lêvedo de saída.

Nutrientes	Mosto %	Compl. %	Lêvedo Entrada %	Vinho Centr. %	Lêvedo Saída %
Nitrogênio	17,27	2,41	80,32	14,38	85,62
Fósforo	8,72	4,54	86,75	8,33	91,67
Zinco	14,60	25,55	59,85	36,22	63,78
Magnésio	77,44	1,70	20,86	80,30	19,70
Manganês	84,04	-	15,96	84,90	15,10
Ferro	55,29	-	44,71	58,97	41,03
Cobre	22,86	-	77,14	11,86	88,14
Potássio	75,70	-	24,30	78,26	21,74
Cálcio	85,98	-	14,02	87,92	12,08
Sódio	83,39	-	16,61	85,26	14,74

Tabela 4 - Médias dos resultados de eficiência de fermentação alcoólica, para os 12 ciclos de fermentação referentes a 14 dornas.

Dornas	Eficiência de Fermentação
1	90,09
2	90,62
3	91,30
4	91,24
5	90,17
6	91,45
7	90,61
8	90,01
9	90,92
10	91,14
11	88,39
12	87,86
13	90,86
14	90,63
$\bar{M}$	90,38

Tabela 5 - Médias de açúcares redutores totais (g/100 mL), teores alcoólicos ($^{\circ}$ INPM), pH e temperaturas ($^{\circ}$ C) no mosto, lêvedo e vinho, para os 12 ciclos de fermentação referentes à 14 dornas.

Fases	Análises	ART (g/100mL)	Teor alcoólico ($^{\circ}$ INPM)	pH	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Mosto		21,19	-	5,89	29,8
Lêvedo		0,073	3,88	2,37	-
Vinho		0,24	9,56	4,48	33,9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T.C.F. & DEL BIANCO, V. Produção de levedura alimento e assimilação do nitrogênio em melaços brasileiros.

Rio de Janeiro, INT, 1971. 80p.

AMORIM, H.V. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. Araras, IAA/PLANALSUCAR.COSUL, 1977. 95p.

AMORIM, H.V. Nutrição mineral da levedura; aspectos teóricos e práticos. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4., Piracicaba, 1985. Piracicaba, ESALQ/USP, 1985. p.44-8.

AMORIM, H.V. ; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Novos métodos analíticos para controle da fermentação; ciência e tecnologia, seleção e uso de microrganismos. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p. (Série Manuais Técnicos Científicos).

ARAÚJO, N.Q. Problemas da fermentação alcoólica industrial. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 75(4):60-87; (5): 43-

60, 1970.

ATKIN, L. & GRAY, P.P. Fermentation studies with brewer's yeast I; a synthetic medium. Arch. Biochem, New York, 15:305, 1947.

AULD, D.S.; ATSUYA, J.; CAMPINO, C.; VALENZUELO, P. Yeast RNA polymerase. I. a eukariotic zincmetallo enzyme. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, 69:548-54, 1976.

AZAMORA, S. Aspectos bioquímicos y fisiológicos de las levaduras. La Alimentacion Latinoamericana, Buenos Aires, 11(110):60-76, 1978.

BISHOP, L.R. Horace brown memorial lectuce; a conspectus of brewing progress. J. Inst. Brew., London, 77:12-24, 1971.

BRAU, H.M. Review on the origin and composition of fusel oil. Rio Piedras, Agricultural Experiment Station, 1957. 30p. (Technical paper).

BURKHOLDER, P.R.; MCVEIGH, I.; MOYER, D. Studies on some growth factors of yeasts. Journal of Bacteriology, Baltimore, 48:385-91, 1944.

- CATANI, R.A. & JACINTHO, A.D. Avaliação da fertilidade do solo; métodos de análises. Piracicaba, Livroceres, 1974. 61p.
- COLEMAN, P.L. & WEINER, H. Growth, isolation on characterization of yeast manganese alcohol desidrogenase. Biochem., New York, 12:3466, 1973.
- CONWAY, E.J. & BEARY, M.E. Active transport of magnesium across the yeast cell membrane. The Biochemical Journal, Liverpool, 692:275-80, 1958.
- CONWAY, E.J. & BEARY, M.E. A magnesium yeast and its properties. The Biochemical Journal, Liverpool, 84:328-33, 1962.
- CONWAY, E.J. & DUGGAN, P.F. A general cation carrier in yeast cell wall. Nature, London, 178:1043-4, 1956.
- DEVEREUX, E.D. & TANNER, E.W. Observations on the growth of yeast in pure nutrient solutions. Journal of Bacteriology, Baltimore, 14:317-33, 1927.
- DI CARLO, E.J.; SCHULTZ, A.S.; MCMANUS, D.K. The assimilation of nucleic acid derivatives and related compounds by yeast. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 189

:151-75, 1951.

DUBOIS, E. Regulation genetropé des enzymes du catabolisme de l'arginine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Revue des Fermentation et des Industries Alimentaires, Belgium, 31 (3):3-19, 1976.

ELVEHJEM, C.A. The role of iron and copper in the growth and metabolism of yeast. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 90:111-32, 1931.

FALCONE, M. & ARRUDA, M.R. Estudo sobre obtenção de "pé-de-cuba" para produção de etanol a partir de mosto de melão. São Paulo, Escola Politécnica-USP, Departamento de Engenharia Química, 1964. 29p.

FEDOROVA, J.Y.; TRAUBENBERG, S.E.; POPADICH, I.A.; GRIBOVSKAYA, I.F.; MARHOVA, N.N.; SHEVYAKOVA, L.V. Mineral composition of baker's yeast. Khlebopekarnaya i Konditerskaya Promyshlennost, Moskova (1):34-5, 1978. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 88(19):134, 1978.

FOULKES, E.C. Cation transport in yeast. The Journal of General Physiology, Baltimore, 39(5):687-704, 1956.

FREY, S.W.; DE VITT, W.G.; BELLOMY, B.R. Effect of several

trace metals on fermentation. Proceeding of the American Society of Brewing Chemists, Chicago, 12:199-205, 1967.

FUHRMAN, G.F. & ROTHSTEIN, A. The transport of Zn^{++} , Co^{++} and Ni^{++} into yeast cells. Biochem. Biophys Acta., Amsterdam, 163:325, 1980.

FULMER, E.I.; NELSON, E.V.; SHERWOOD, F.F. The nutritional requirements of yeast. 2. The effect of the composition of the medium on the growth of yeast. Journal of the American Chemical Society, Easton, 43:191-9, 1921.

FULMER, E.I.; UNDERKOFER, L.A.; LESH, J.B. Effect of the composition of the medium upon the growth of yeast in the presence of bios preparations; the effect of magnesium salts. Journal of the American Chemical Society, Easton, 58:1356-8, 1936.

GAMBALE, V. Efeito da adição de K_2SO_4 em cultura de leveduras em vinhaça. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 95(1):35-7, 1980.

GREGORI, R.E.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Respostas peculiares de um cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* submetido a perturbações. Rev. Bras. Tec., Rio de Janeiro, 9:149-55, 1978.

HAROLD, F.M. Inorganic polyphosphates in biology; structure, metabolisms and function. Bacteriological Reviews, Baltimore, 30:772-94, 1966.

HARRISON, J.S. & GRAHAM, J.C.J. Yeasts in distillery practice. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., Ed. The yeasts, London, Academic Press, 1970. v.3, p.283-348.

HARTELIUS, V. Comparative studies on the value of amino acids as a source of nitrogen for yeast. Biochemische Zeitschrift, Berlin, 299:317-33, 1938. Apud. Chemical Abstracts, Easton, 33(9):3414, 1939.

HERNANDEZ, M.R. Nuevas pruebas en torno a la fermentacion de mosto submetidos a bajas pressiones. Separata de la Semana Vitivinicola, Madrid, Estacion de viticultura y Enologia de Haro, 1960. 8p.

HEWITT, E.J. The essential nutrient elements: requeriments and interacion in plant. In: STEWARD, F.G. Plant Physiology; inorganic nutrition of plants. New York, Academic Press, 1963, p.454-78.

HIDEO, M.; SUMICO, T.; SHIGEZO, T. Effect of potassium on the amino acid metabolism of sake yeast, 1974. Apud. Chemical Abstracts, Columbus, 82:241, 1975.

HORII, J. Problemas especiais de fermentação alcoólica.

In: Fermentações industriais e transformações microbianas no solo. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1980. p.70-4.

INDGE, K.J. Polyphosphates of type yeast cell vacuole.

Journal of General Microbiology, Cambridge, 51:447-55, 1968.

JENNINGS, D.H.; HOOPER, D.C.; ROTHSTEIN, A. The participation of phosphate in the formation of a "carrier" the transport of Mg^{++} and Mn^{++} ions into yeast cells. Journal of General Physiology, Baltimore, 41(5):1019-26, 1958.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast; the effect of enviromental and other variables. Process. Bioch, England, 16:42-9, 1981.

JUNI, E.; KAMEN, M.D.; REINER, J.M.; SPIEGELMAN, S. Turn-over and distribution of phosphate compounds in yeast metabolism. Archives of Biochemistry, New York, 18:387-408, 1948.

KARVANEK, M. & JANICEK, G. Amount of important trace elements in baker's yeast, 1971. Apud. Chemical Abstracts.

Columbus, 77:257, 1972.

LAWFORD, H.G. & PIK, J.R. Physiology of Candida utilis yeast in zinc-limited chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26:64-70, 1980 a.

LAWFORD, H.G. & PIK, J.R. Hyper accumulation of zinc by zinc-depleted Candida utilis grown in chemoastat cultures. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26:71-6, 1980 b.

LAWFORD, H.G.; PIK, J.R.; LAWFORD, G.R.; WILLIAMS, T.; KLIGERMAN, A. Hyper accumulation of zinc by zinc depleted Candida utilis growth in chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26:71-6, 1980.

LEGGETT, J.E. Entry of phosphate into yeast cell. Plant Physiology, Lancaster, 36(3):277-84, 1961.

LESH, J.B.; UNDERKOFER, L.A.; FULMER, E.I. The effect of the composition of the medium upon the growth of yeast in the presence of bios preparations. Journal of the American Chemical Society; Easton, 60(2):2505-07, 1938.

LEVANDOVSKI, L.V.; KAVALENKO, A.D.; YANCHEVSKII, V.K.; RU-
DAVA, V.V.; CHEREDNICHENKO, V.V. Determination of mineral nutrition needs in accelerated fermentation of mo-

lasses wort, 1980. Apud: Chemical Abstracts, Columbus, 94(19):501, 1981.

LIMA, U.A. Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividade da *Saccharomyces cerevisiae*, (Hansen). Piracicaba, 1954. 54p. (Doutoramento - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

LING, R.S. & HOSENEY, R.C. Effects of certain nutrients on the gas produced in pre ferments. Cereal Chemistry, St. Paul, 54(3):597-604, 1977.

LITVINENKO, L.A.; KINTANA, M.E.; PETREKEVICH, S.B. Effect of nitrogen input concentration on the growth of Candida utilis in continuous culture with pulsed carbon feed. Chemical Abstracts. Columbus, 94(11):561, 1981.

MC HARGUE, S.S. & CALFEE, R.K. Effect of manganese, copper and zinc on the growth of yeast. Plant Physiology, Lancaster, 6:559-66, 1931.

MAGALHÃES, M.M. dos A.; VAIRO, M.L.R.; BORZANI, W. Influência da adição de fonte de nitrogênio ao mosto no teor de proteína da levedura residual da fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar. Rev. Bras. Tec., Rio de Janeiro,

ro, 1.1(1):13-21, 1980.

MASSART, L. & HORENS, J. L'assimilation d'azote arniné par les levures. Enzimologia, Acta Biocatalytica, Den Haag, 3(5):359-61, 1952.

MENEZES, T.J.B. de Etanol; o combustível do Brasil. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 1980. 223p.

MORRIS, E.O. The chemistry and biology of yeasts. New York, Academic Press, 1958. 763p.

NAIKI, N. & YAMAGATA, S. Isolation and some properties of copper-binding proteins found in a copper-resistant-strain of yeast. Plant Physiology, Lancaster, 17:1281, 1976.

NIELSEN, N. Uritersuchungen uber den gehalt der bierwurze an durch hefe assimilierbarem stickstoff. Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Serie Physiologique, Copenhagen, 21:113-38, 1935.

NORDHEIN, W. Specific relation and correlation in metabolism of yeast cells. Antonie van Leeuwenhoek yeast symposium, Amsterdam, 35:4-9, 1969.

NOTKINA, L.G.; BALLYBERDINA, L.M.; LAVRECHUK, L.D. Effect

of nitrites on the accumulation of bakers yeast, 1974.

Apud. Chemical Abstracts. Columbus, 82:337, 1975.

NOVAES, F.V. Matérias-primas para produção de álcool. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ALCÓOL, 1., São Paulo, 1980. p.3-7.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R. de Tecnologia das aguardentes. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Tecnologia Rural, 1971. 138p.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, E.R. de; VALSECHI, O. I Curso de Extensão em Tecnologia de Aguardente de Cana; apontamentos. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 104p.

OKOROKOV, L.A.; LICHKO, L.P.; KHOLODEWKO, V.P.; KADONTSEVA, V.M.; PETRIKEVICH, S.B.; ZAICHKIN, E.I.; KARIMOVA, A.M. Free and bound magnesium in fungi and yeast. Folia Microbiológica, Prague, 20(6):460-466, 1975. Apud. Chemical Abstracts, Columbus, 85:485, 1976.

OLIVEIRA, J.S. & SOUZA, M.F. Quelques aspects du métabolisme minérale dam la levure Candida utilis. Revista de Ciências Agronômicas, Série A, Lourenço Marques, 3:33-66, 1970.

OLSON, H. & JOHNSON, M.S. Factors producing high yeast yields in synthetic media. Journal of Bacteriology, Baltimore, 57:235-46, 1949.

ORTH, R.A. & BUSHUK, W. Studies of gentenin. 3. Identification of subunits coded by the D-genome their relation to bread making quality. Cereal Chemistry, St.Paul, 50: 680, 1973.

OUGH, G.S. & BELL, A.A. Effects of nitrogen fertilization of grape wines on amino acid metabolism and higher-alcohol formation during grape juice fermentation. Food Science and Technology Abstracts, New York, 13(7):69, 1981.

PECIULIS, J. Physiology biochemical activity of yeasts grown with trace elements, 1972. Apud. Chemical Abstracts. Columbus, 79:329, 1973.

PECIULIS, J.; AUGUSTAITTIENE, E. ; PAKARSKYTE, K.; VALAVICIUS, J. The role of micro elements on the acumulation of proteins and some vitamins in yeast cells. Antonie van Leeuwenhock yeast symposium, Amsterdam, 35:13, 1969.

PERKIN-ELMER. Analytical methods for atomic absortion spectrophotometri. p.i. (catálogo industrial), 1976.

- POMERANZ, Y. & DIKEMAN, E. From barley to beer; a mineral study. Abstract. J. Inst. Brew., Jimbal, 83(1):48, 1977.
- POPENKO, A.K. & BAYAKHUMOV, K.Y. Effect of some trace elements on microorganisms. Chemical Abstracts, Columbus, 75:101, 1971.
- PRESCOTT, S.C. & DUNN, C.G. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York, Mc Gran Hill, 1959. 954p.
- REED, G. & PEPPLER, H.J. Yeast technology. Westport, The AVI, 1973. 378p.
- RICHARDS, O.W. The effect of calcium sulfate on the grown and fermentation of yeast. J. Amer. Chem. Sci. Easton, 47(2):1671-6, 1925.
- ROTHSTEIN, A. & DEMIS, C. The relationship of the cell surface to metabolism; the stimulation of fermentation by extracellular potassium. Arch. Biochem., New York, 44:18-29, 1953.
- ROTHSTEIN, A.; HAYES, A.; JENNINGS, D. The active transport of Mg^{++} and Mn^{++} into the yeast cell. J. Gen. Physiol., Baltimore, 41(3):385-94, 1957.

SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análise química em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 56p.

SCHULTZ, A.S. & POMPER, S. Amino acids as nitrogen source for the growth of yeasts. Archives of Biochemistry, New York, 19:184-92, 1948.

SMYTHE, C.V. The effect of certain tissue extracts of ammonia salts and of certain amides on the rate of fermentation by baker's yeast. Enzymologia, Holland, 6:9-14, 1939.

STEINER, K. & LANZLINGER, U. Zinc and yeast fermentation. J. Inst. Brew. Abstracts, Jimbal, 84(4):251, 1978.

STEVENINCK, J. VAN & BOOIS, H.L. The role of polyphosphates in the transport mechanism of glucose in yeast cells. Journal of General Physiology, Baltimore, 48:43-60, 1964.

STEVENINCK, J. VAN & ROTHSTEIN, A. Sugar transport and metal binding in yeast. Journal of General Physiology, Baltimore, 49:235-46, 1965.

STUPIELLO, J.P. & HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. Saccharum STAB, São Paulo, 4(17):43-6, nov. 1981.

SUGATA, H. & KOCH, F.C. Sulphur metabolism of yeast. Plant Physiology, Lancaster, 1:337-47, 1926.

SUOMALAINEN, H. & KAHANPAA, H. Formation of fusel alcohol from amino acids with branched chains. J. Inst. Brew., London, 69:473-8, 1963.

SUOMALAINEN, H. & OURA, E. Yeast nutrition and solute uptake. IN: ROSE, A.A. & HARRISON, J.S., Ed. The Yeast. London, Academic Press, 1971. v.2, p.3.

SURDIN, Y.; SLY, W.; SIRE, J.; BORDES, A.M.; SZULMAJSTER, H.R. Propriétés et contrôle génétique du système d'accumulation des acides aminés chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica ACTA, Amsterdam, 107:546-66, 1965.

TAUK, S.M. & GAMBALE, V. Efeito da adição de ácido fosfórico em cultura mista de levedura em vinhaça. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 91(5):9-14, 1978.

THORNE, R.S. The ability of certain pure chemical compounds to function as nitrogen sources for yeast. Journal of the Institute of Brewing, London, 39:608-21, 1933.

THORNE, R.S.W. Nitrogen metabolism of yeast, a considera-

tion of the made assimilation of amino acids. Journal of the Institute of Brewing, London, 55:201-22, 1949.

VAIRO, M.L.R.; GREGORI, E.E.; BORZANI, W. Respostas de um cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* a perturbações provocadas por adição de sulfato de amônio. Revista Brasileira de Tecnologia, São Paulo, 6:1-6, 1975.

VALSECHI, O. Aguardente de cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 1960. 116p.

VALSECHI, O. & OLIVEIRA, E.R. Tecnologia do álcool. Piracicaba, ESALQ/USP, 1967. v.1.

VASCONCELOS, J.N. Influência da complementação de nutrientes nitrogenados e fosfatados sobre o processo de fermentação alcoólica industrial. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 105(4/6):41-58, 1987.

WANDZILAK, T.M. & BENSON, R.W. Yeast RNA polymerase. 3. A zinc metalloenzyme. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, 76:247-52, 1977.

WHITE, J. Yeast technology. London, Chapman & Hall, 1954. 432p.

WICKERHAM, L.J. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. Journal of Bacteriology, Baltimore, 52:293-301, 1946.

WILLIAMS, R.J.; EAKIN, R.E.; SNELL, E.E. The relationship of inositol, thiamin, biotin, pantothenic acid and vitamin B₆ to the growth of yeasts. The Journal of the American Chemical Society, Easton, 62:1204-5, 1940.

ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. (Doutoramento - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).