EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO DA LEVEDURA
Saccharomyces cerevisiae NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

ELENI GOMES

Orientador: Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

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.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1988

G633e Gomes, Eleni
Efeito do tratamento ácido da levedura (Saccharomyces cerevisiae) sobre a fermentação alcoólica. Piracicaba, 1988.
206p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fermentação alcoólica 2. Levedura - Efeito do tratamento ácido I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 663.13

Aos meus pais

· aos meus irmãos

ao Roberto.---

DEDICO.

AGRADEÇO

- Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim;
- Ao Sérgio Henrique Boer, Luiz Lucatti, Neder Atalla Luiz e Antonio Carlos Trovaiolli, pelo auxílio técnico;
- À Antonio Francisco Iemma e Maria Izolina F. Alves, pela análise estatística;
- À FAPESP, FEALQ e FERMENTEC S/C LTDA. pelo auxílio financeiro;
- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP;
- Ao Departamento de Química - ESALQ/USP;
- A Luiz Carlos Basso, Luiz Eduardo Gutierrez, Valentina de Fátima De Martin e Edvaldo Alberto Zago.
- À Prof^a Dr^a Anita D. Poněk.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xv
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Composição química da célula de levedura ..	04
2.2. Efeito da temperatura em células de levedu ra	05
2.3. Efeito do pH e lixiviação de minerais em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09
2.4. Reservas de carboidratos em <i>Saccharomyces ce</i> <i>revisiae</i> : funções e metabolismo	15
2.4.1. Glicogênio: caracterização	15
2.4.1.1. Glicogênio: biossíntese	18
2.4.1.2. Glicogênio: regulação da biossíntese	19
2.4.1.3. Glicogênio: catabolismo ...	22
2.4.2. Trealose: caracterização	23
2.4.2.1. Trealose: biossíntese	24
2.4.2.1.1. Trealose: regulação da biossíntese	25
2.4.2.2. Trealose: catabolismo	29
2.4.3. Metabolismo de glicogênio e trealo- se em condições não proliferantes e de estresse	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Mostos utilizados	41

3.1.1. Determinação do pH dos mostos	41
3.1.2. Determinação dos elementos minerais nos mostos e melaços	41
3.1.3. Suplementação de sais do mosto	42
3.1.4. Determinação de sulfito no melaço ...	43
3.1.5. Determinação do ART no melaço e mos- tos	43
3.2. Fermento utilizado	44
3.2.1. Determinação dos carboidratos de re- serva do fermento	45
3.2.1.1. Amostragem	45
3.2.1.2. Determinação do glicogênio .	45
3.2.1.3. Determinação da trealose ...	46
3.2.2. Determinação dos elementos minerais no fermento	46
3.3. Fermentação alcoólica e tratamento do fermen- to	46
3.3.1. Condução do experimento	46
3.3.2. Primeiro ciclo fermentativo	48
3.3.3. Tratamentos do fermento	48
3.3.3.1. Análises do fermento duran- te o tratamento	50
3.3.3.1.1. Determinação dos carboidra- tos de reserva	50
3.3.3.1.2. Determinação dos elementos minerais no fermento	50
3.3.3.1.3. Determinação do número de células vivas	51
3.3.4. Segundo ciclo fermentativo	51
3.3.4.1. Determinação do AR nos vi- nhos	52
3.3.4.2. Determinação do pH dos vi- nhos	52

3.3.4.3. Determinação dos teores alcoólicos e rendimentos das fermentações	52
3.3.4.4. Determinação do glicerol dos vinhos	53
3.4. Delineamento estatístico	53
4. RESULTADOS	55
4.1. Efeitos dos tratamentos sobre a elevação do pH da suspensão de células	55
4.2. Efeitos dos tratamentos sobre o número de células vivas por mililitro de suspensão	57
4.3. Influência dos tratamentos sobre os elementos minerais na levedura e na água da suspensão	60
4.3.1. Fósforo	60
4.3.2. Nitrogênio	63
4.3.3. Potássio	68
4.3.4. Magnésio	71
4.3.5. Cálcio	75
4.3.6. Zinco	78
4.4. Influência dos tratamentos sobre os carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) da levedura	82
4.4.1. Trealose	83
4.4.2. Glicogênio	85
4.5. Influências dos tratamentos aplicados às leveduras sobre a capacidade fermentativa das mesmas	88
4.5.1. Açúcar redutor (AR) residual dos vinhos	88
4.5.2. Glicerol	92
4.5.3. Rendimento das fermentações	93

Página

4.6. Correlação entre as variáveis analisadas nos ensaios	95
4.6.1. Relação entre elementos minerais e conteúdo dos carboidratos de reserva das leveduras	95
4.6.2. Relação entre elementos minerais, carboidratos de reserva, glicerol e rendimento das fermentações	97
5. DISCUSSÃO	110
5.1. Influência dos tratamentos sobre o número de células vivas por mililitro de suspensão ...	110
5.2. Influência dos tratamentos sobre os teores de minerais das leveduras	113
5.3. Influência dos tratamentos sobre os carboidratos de reserva das leveduras	125
5.3.1. Trealose	125
5.3.2. Glicogênio	129
5.4. Influência dos tratamentos das leveduras sobre as porcentagens de glicerol e AR dos vinhos e sobre o rendimento das fermentações ..	131
6. CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
APÊNDICE	166

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Esquema dos ensaios realizados	47
02	Relação entre os teores de fósforo das leveduras e a elevação do pH (Δ pH) da suspensão durante os tratamentos	64
03	Relação entre os teores de cálcio das leveduras e a elevação do pH (Δ pH) da suspensão durante os tratamentos	79
04	Relação entre os teores de glicogênio das leveduras em função da elevação do pH (Δ pH) da suspensão, durante os tratamentos	87
05	Relação entre as porcentagens de AR dos vinhos no final das fermentações e o Δ pH da suspensão, no momento da tomada das amostras de fermento para o início das fermentações	90
06	Relação entre os teores de fósforo e glicogênio das leveduras durante os tratamentos	96
07	Relação entre os teores de fósforo e trealose das leveduras durante os tratamentos	98
08	Relação entre os teores de cálcio e trealose das leveduras durante os tratamentos	99

FIGURA Nº

Página

09	Relação entre as porcentagens de AR dos vinhos no final das fermentações e os teo res de fósforo das leveduras no início das mesmas	100
10	Relação entre as porcentagens de AR dos vinhos no final das fermentações e os teo res de glicogênio das leveduras no iní cio das mesmas	101
11	Relação entre as porcentagens de glicerol nos vinhos no final das fermentações e os teores de fósforo das leveduras no iní cio das mesmas	103
12	Relação entre as porcentagens de glicerol nos vinhos no final das fermentações e os teores de potássio nas leveduras no iní cio das mesmas	104
13	Relação entre as porcentagens de glicerol e AR dos vinhos	105
14	Relação entre os rendimentos das fermenta ções e os teores de fósforo das leveduras no início das mesmas	106
15	Relação entre os rendimentos das fermenta ções e as porcentagens de Ar dos vinhos .	108
16	Relação entre os rendimentos das fermenta ções e as porcentagens de glicerol dos vi nhos	109

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Composição elementar de leveduras comerciais (HARRISON, 1971)	6
02	Teores de minerais (ppm) nos mostos e me- laço	43
03	Composição química do fermento comercial Fleischman utilizado nos ensaios	44
04	Tratamentos aplicados ao fermento após o primeiro ciclo fermentativo	49
05	Esquema de análise de variância para o de- lineamento fatorial	54
06	Comparação entre os valores médios de pH da suspensão de células medidas durante os tratamentos	56
07	Comparação entre médias dos números de células vivas por mililitro de suspensão dentro de cada fator aplicado no trata- mento	58
08	Comparação entre médias para a variável fósforo na levedura, e para a variável fós- foro na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos	62

TABELA Nº

Página

09	Comparação entre médias para a variável <u>ni</u> trogênio na levedura e para a variável ni- trogênio na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos	67
10	Comparação entre médias para a variável <u>po</u> tássio na levedura e para a variável po- tássio na água da suspensão, dentro de ca- da fator aplicado nos tratamentos	70
11	Comparação entre médias para a variável <u>mag</u> nêsio na levedura e para a variável magnê- sio na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos	73
12	Comparação entre médias para a variável <u>cál</u> cio na levedura e para a variável cálcio na água da suspensão, dentro de cada fator a- plicado nos tratamentos	77
13	Comparação entre médias para a variável <u>zin</u> co na levedura e para a variável zinco na água da suspensão, dentro de cada fator a- plicado nos tratamentos	81
14	Comparação entre médias para a variável <u>trea</u> lose e para variável glicogênio na levedu- ra, dentro de cada fator aplicado nos tra- tamentos	84
15	Comparação entre médias para as variáveis <u>AR</u> , glicerol e rendimento das fermentações den- tro de cada fator aplicado nos tratamentos do fermento, antes do início do ciclo fermentativo	91

TABELA Nº

Página

16	Análise de variância para os valores de pH da suspensão de células	167
17	Análise de variância para o número de células vivas por mililitro de suspensão ...	168
18	Análise de variância para os teores de <u>fósforo</u> nas leveduras	169
19	Análise de variância para os teores de <u>fósforo</u> na água da suspensão de leveduras ...	170
20	Análise de variância para os teores de <u>nitrogênio</u> nas leveduras	171
21	Análise de variância para os teores de <u>nitrogênio</u> na água da suspensão de leveduras	172
22	Análise de variância para os teores de <u>potássio</u> nas leveduras	173
23	Análise de variância para os teores de <u>potássio</u> na água da suspensão de levedura ..	174
24	Análise de variância para os teores de <u>magnésio</u> nas leveduras	175
25	Análise de variância para os teores de <u>magnésio</u> na água da suspensão de levedura ...	176
26	Análise de variância para os teores de <u>cálcio</u> nas leveduras	177

TABELA Nº

Página

27	Análise de variância para os teores de cálcio na água da suspensão de leveduras	178
28	Análise de variância para os teores de zinco nas leveduras	179
29	Análise de variância para os teores de zinco na água da suspensão de leveduras	180
30	Análise de variância para os teores de trealose nas leveduras	181
31	Análise de variância para os teores de glicogênio nas leveduras	182
32	Análise de variância para as porcentagens de AR dos vinhos	183
33	Análise de variância para as porcentagens de glicerol dos vinhos	184
34	Análise de variância para os rendimentos (%) das fermentações	185
35	Valores de pH da suspensão de leveduras, em função dos tratamentos	186
36	Número de células viáveis ($\times 10^8$) por mililitro de suspensão, em função dos tratamentos	187
37	Teores de fósforo na levedura (%) e na água da suspensão (ppm), em função dos tratamentos	189

TABELA Nº

Página

38	Teores de nitrogênio na levedura (%) e na água da suspensão (ppm) em função dos <u>tra</u> tamentos	191
39	Teores de potássio na levedura (%) e na água da suspensão (ppm), em função dos <u>tra</u> tamentos	193
40	Teores de magnésio na levedura e na água da suspensão (ppm), em função dos <u>trata</u> mentos	195
41	Teores de cálcio na levedura e na água da suspensão (ppm), em função dos <u>trata</u> mentos	197
42	Teores de zinco na levedura e na água da suspensão (ppm), em função dos <u>trata</u> mentos	199
43	Teores de trealose e glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ ma <u>t</u> éria seca) das leveduras, em função dos <u>trata</u> mentos	201
44	Porcentagens (g/100 ml) de AR e glicerol nos vinhos das fermentações, em função dos <u>trata</u> mentos prévios das leveduras	203
45	Grau alcoólico e rendimento das <u>fermenta</u> ções, em função dos <u>trata</u> mentos prévios das leveduras	205

EFEITO DO TRATAMENTO ÁCIDO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*
NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autora: ELENI GOMES

Orientador: Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

RESUMO

O processo industrial de produção de álcool etílico no Brasil segue, na maioria das indústrias, o modelo de Melle-Boinot. Este processo consiste, essencialmente em centrifugar o vinho ao término do ciclo fermentativo, e as leveduras em temperatura ulterior após submetê-las a um tratamento ácido (pH 2,5 a 2,7) afim de reduzir as bactérias remanescentes da fermentação anterior.

O presente trabalho teve por objetivo estudar a influência da variação do tratamento ácido sobre os teores de minerais (N, P, K, Ca, Mg e Zn), e carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) das leveduras e sobre o rendimento da fermentação alcoólica.

Nos experimentos foram utilizados a levedura de panificação Fleischman e mostos obtidos de diluições de melão de cana-de-açúcar.

Os ensaios foram conduzidos em dois ciclos fermentativos, intercalados por tratamentos de leveduras, os quais constaram de:

- pH 2,0; 2,5 e 3,0 corrigidos com ácido sulfúrico;
- diluição do creme de leveduras com água até concentração celular de 30 e 40% (g massa celular úmida/100g suspensão);
- temperaturas ambiente (em torno de 25°C), 30° e 40°C;
- tempo de tratamento de 0, 1,5, 3 e 6 horas, contados a partir da correção do pH da suspensão.

Os tratamentos foram executados em esquema fatorial, sendo aplicada uma combinação fatorial a cada ensaio, fixando-se os tempos de tratamento.

A cada intervalo de tempo de tratamento (0, 1,5, 3 e 6 horas) foram tomadas amostras de leveduras das susensões para a realização do segundo ciclo fermentativo, sendo o vinho resultante, analisado quanto às porcentagens de AR (açúcar redutor), glicerol e grau alcoólico através do qual obteve-se a eficiência da fermentação.

Os resultados obtidos indicaram que a temperatura do tratamento do fermento afetou todos os parâmetros analisados (minerais, carboidratos de reserva, AR, glicerol e rendimento da fermentação).

O potássio foi o elemento lixiviado em maior quantidade pelas células, sendo esta lixiviação mais intensa a 40°C e a pH 2,0.

Não houve consumo substancial das reservas nas 6 horas de tratamento. A 30°C ocorreu acúmulo de trealose.

Foram obtidas maiores porcentagens de AR e glicerol nos vinhos das fermentações nas quais foram utilizadas as leveduras tratadas a 40°C.

Constatou-se uma correlação positiva entre os teores de fósforo e os teores de glicogênio e trealose das células durante os tratamentos.

Os teores de fósforo das leveduras no início do ciclo fermentativo correlacionou-se negativamente com a produção de glicerol e positivamente com os rendimentos das fermentações.

Foi observado ainda, que o rendimento das fermentações está diretamente relacionado com os teores de glicerol e AR residual dos vinhos.

EFFECT OF YEAST ACIDIC TREATMENT (*Saccharomyces cerevisiae*)
ON ETHANOLIC FERMENTATION

Autor: ELENÍ GOMES

Adviser: Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

SUMMARY

The industrial process of ethanol production in Brazil, at the majority of plants, is based on the Melle-Boinot model. This process, essentially, consists on centrifuging down the yeast cells at the end of fermentative cycle and using them again in posterior fermentation, after being properly treated in acid medium (pH 2.5 a 2.7) to control the remanent bacteria from previous fermentations..

The objetctives of this dissertation is to study the effect of different acid concentrations on the content of mineral nutrients (N, P, K, Ca, Mg and Zn), on the reserve carbohydrates (glicogen and trehalose) of the yeasts and on the alcoholic fermentation yeast.

Fleischman bakery ferment and obtained from diluted sugarcane molasses were used in all experiments.

The assays were carried out in two cycles fermentation alternated by the treated yeast.

The treatments consisted on:

- pH 2.0, 2.5 and 3.0 (ajusted with sulfufic acid;

- dilution of the yeast cream with distilled water up to cell concentration of 30% and 40% (grams of cell fresh weight/100g suspension);
- room temperature (25°C), 30°C and 40°C;
- treatments duration of 0, 1.5, 3.0 and 6.0 hours (starting counting time from the suspension pH adjustment).

The treatments were performed under a factorial statistical design where a factorial combination was applied for each assay being the duration of the treatment fixed.

At time intervals of 0, 1.5, 3.0 and 6.0 hours samples of yeast from the suspension were transferred to 150 ml centrifuge tubes in order to perform the second fermentation cycle. Reducing sugar (AR), glycerol and ethanol content were assayed in the resulting fermented must. From these data the fermentation yield was always determined.

The obtained results indicated that temperature of the yeast during the treatment affects all the analysed parameters (mineral nutrients, reserve carbohydrates, reducing sugar, glycerol and fermentation yield).

Potassium was the nutrient which showed higher lixiviation from the cells and was more intense at pH 2.0 and temperature of 40°C.

No significant consumption of the reserve material could be observed even for the 6 hours treatment.

For the 30°C treatment accumulation of trehalose was observed.

The reducing sugar and glycerol content were higher in the beers from fermentations utilizing yeast treated at 40°C.

It was observed a positive correlation between phosphorous content and the content of glycogen and trehalose of the cells during the treatments.

The content of phosphorus in the yeast at the beginning of the fermentative cycle correlates negatively with the formation of glycerol and positively with the fermentation yields.

It was also observed that the fermentation yield is directly related to the content of glycerol and to the residual reducing sugar in the beer.

1. INTRODUÇÃO

A partir do início do presente século, além do crescente uso industrial, foi cogitada a utilização do álcool etílico como carburante.

A crise energética mundial, decorrida da escassez e do alto preço do petróleo, fez com que despertasse o interesse pela busca de novas fontes de energia.

No Brasil, a decisão de produzir álcool etílico para equilibrar as necessidades energéticas, surgiu basicamente em virtude da apreciável infra-estrutura agroindustrial já existente no país e do baixo preço do açúcar no mercado mundial.

Desde então, tem-se buscado incessantemente, melhorias no sistema fermentativo de produção de etanol, visando maior aproveitamento da matéria-prima e eficiência no processo industrial.

Dentre os diferentes sistemas de fermentação conhecidos, o sistema de recirculação de leveduras, ou Melle Boinot, é o mais difundido no Brasil, sendo utilizado por cerca de 90% das indústrias alcooleiras.

Desenvolvido em 1933, o sistema Melle - Boinot apresenta a seguinte marcha: Após o término da fermentação, o vinho resultante passa por filtros de malhas grossas (cerca de 3 mm) e malhas finas (cerca de 0,55 mm), seguindo para as centrífugas. Após a centrifugação, obtém-se uma suspensão concentrada com cerca de 60% de massa celular, e um sobrenadante composto por vinho, resíduos leves e bactérias. Este sobrenadante é enviado para a dorna volante, onde fica aguardando para ser destilado.

A suspensão concentrada de células, denominada normalmente de creme ou leite de leveduras, é enviada para as cubas de tratamento, onde sofre diluição com água (1,5 a 2 vezes o volume do leite) e adição de ácido sulfúrico, até o meio atingir um pH de 2,5 a 2,7. Essa suspensão deve permanecer sob tais condições por aproximadamente 3 horas, de modo que as bactérias remanescentes do processo sejam reduzidas a níveis não prejudiciais à fermentação posterior. O leite de leveduras, assim tratado, retorna às dornas, servindo de inóculo para o próximo ciclo fermentativo (HORI, 1980).

A proposta do sistema de recirculação de leveduras é a total recuperação do fermento, de maneira a tornar mínima a formação de novas células, proporcionando economia de açúcar e conseqüentemente, aumentando o rendimento nas fermentações subseqüentes.

Apesar do tratamento ácido do leite de leveduras

duras característico desse processo, ser aplicado rotineiramente nas indústrias alcooleiras, pouco se conhece a respeito de seu efeito sobre a composição química e a fisiologia das células de fermento.

Por outro lado, durante o período de safra das destilarias, além das paradas programadas, surgem problemas os quais provocam interrupções no processo fermentativo, determinando que se armazene o leite de leveduras para posterior retorno às fermentações.

A conservação deste fermento nessas circunstâncias, é feita baseado em evidências práticas e em alguns poucos dados experimentais.

Sob o aspecto de conservação de células de levedura nas indústrias, são considerados como fatores principais, a diluição do leite, valores de pH do meio e temperaturas, nos quais devem ser mantidas as células, de modo a preservarem por mais tempo sua viabilidade e capacidade fermentativa.

Com base em tais questões e considerando a importância prática e econômica de se manter o fermento viável nas interrupções do processo fermentativo, desenvolveu-se um estudo no qual foi testada a conversão de leveduras em suspensão sob diferentes condições, assim como, o efeito desses tratamentos sobre a capacidade fermentativa das células, expressa nos rendimentos das fermentações.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição Química da Célula de Levedura

A composição química da levedura varia com a linhagem, fase de crescimento e condições físicas e químicas do meio de cultivo (LIMA, 1954).

Leveduras de panificação apresentam cerca de 25% de matéria seca (SUOMALAINEN & OURA, 1971), da qual 10% é representada pela trealose; 12% pela glicogênio, 8% de glucana e 6% de manana (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961).

O teor de proteína bruta ($N \text{ total} \times 6,25$), situa-se entre 40 e 56% da matéria seca. Cerca de 80% do nitrogênio encontra-se na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucleicos, 8% como amônia e quantidades menores em compostos como lecitina, glutatona, ácido adenílico, vitaminas e coenzimas (PEPPLER, 1970).

Os lipídeos não excedem 7% da matéria seca (EDDY, 1958), sendo representados principalmente por glicérides de ácidos graxos, fosfolipídeos (lecitina e cefalina) e esteróis (ergosterol) (GAMBIRÁSIO, 1967).

As cinzas representam de 1,9 a 10% do peso seco da levedura, dependendo da linhagem e do meio de crescimento, sendo o fósforo e o potássio, seus maiores componentes (EDDY, 1958).

A Tabela 1 mostra os intervalos relativos às proporções dos elementos em leveduras comerciais, incluindo a de cerveja, panificação e levedura utilizada como alimento animal ou humano (HARRISON, 1971).

2.2. Efeito da Temperatura em Células de Leveduras

Linhagens mesofílicas de *Saccharomyces cerevisiae* crescem num intervalo compreendendo uma temperatura mínima de 10°C e uma máxima de 40°C, estando a temperatura ótima entre 28 e 35°C (JONES et alii, 1981).

A manutenção de células em temperatura próxima à máxima leva à alterações bioquímicas nas mesmas. Tais alterações consistem de aumento no requerimento de ácidos graxos para manutenção da rigidez da membrana (PORTER & OUGH, 1982), aumento acentuado na fração de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961), maior sensibilidade ao etanol, diminuições da atividade enzimática e dos teores de proteína, RNA e DNA da célula (SLAPACK et alii, 1987).

Tabela 1. Composição elementar de leveduras comerciais e mel-
laços (HARRISON, 1971).

Elemento	Levedura (g/100g matéria seca)	Melaços (g/100g matéria seca)
C	45 - 77	39 - 41
H	6,0 - 6,5	6,3 - 6,8
O	31 - 32	47 - 50
N	7,5 - 9,0	0,1 - 2,8
K	0,9 - 3,5	0,8 - 5,2
P	1,1 - 2,0	0,01 - 0,9
S	0,3 - 0,5	0,15 - 0,2
Mg	0,15 - 0,5	0,007 - 0,75
Ca	0,04 - 0,9	0,018 - 1,2
Na	0,02 - 0,2	0,82 - 1,4
Zn	0,004 - 0,13	0,0006 - 0,013
Fe	0,003 - 0,10	0,01 - 0,021
Cu	0,002 - 0,012	0,0001 - 0,006
Mn	0,0004 - 0,0035	0,001 - 0,004
Co	0,0005	0,00004 - 0,0001
Mo	0,000005 - 0,000009	0,000009 - 0,000026
Cl	0,004 - 0,1	1 - 3
I	0,00005 - 0,0005	-
Pb	0,0001 - 0,0007	0,0006
As	0,00001	-
Si	-	0,028
Sr	-	0,0005
B	-	0,0002 - 0,0004

Foi demonstrado que a medida que se eleva a temperatura há acentuada diminuição na capacidade respiratória das leveduras. Da mesma forma leva a um aumento na taxa de fermentação (POURTER & OUGH, 1982).

Têm sido descritos diversos fatores ambientais que atuam sinergisticamente com a alta temperatura. POZMOGOVA *et alii* (citado por SLAPACK *et alii*, 1987) demonstraram que o efeito nocivo da alta temperatura sobre as leveduras, é acentuado a pH menos favorável. Os mesmos autores, observaram que células em fase de crescimento exponencial são mais sensíveis à temperatura alta do que aquelas em fase estacionária de crescimento.

Leveduras incubadas à temperaturas acima do ótimo apresentam maior requerimento nutricional durante o crescimento. No entanto, células sob jejum, são mais resistentes ao calor do que células em meio rico em nutrientes (PARIS & PRINGLE, 1983).

LEWIS & KUIPER (1972) demonstraram que *Saccharomyces uvarum* mantida em suspensão com água a 40°C, não apresentou alteração na viabilidade. Entretanto, a adição de glicose ao meio provocou rápida queda na viabilidade celular. Tal efeito, segundo os autores, seria decorrente da alteração da membrana citoplasmática por ação combinada da temperatura e absorção do açúcar.

A manutenção de leveduras à temperatura acima do ótimo induz a liberação de aminoácidos hidrofóbicos pe-

las mesmas, os quais atuariam como "termoprotetores", estabilizando a membrana e aumentando a resistência das células ao calor. Desta forma, segundo RUDENOK & KONEV (1980) (citado por SLAPACK *et alii* 1987), a maior termotolerância observada por leveduras em suspensão com alta concentração de massa celular, é consequente dos maiores níveis desses aminoácidos "termoprotetores" no meio, atingidos nessas condições.

Investigações correlacionando teor de trealose da célula e sua resistência ao calor, sugeriram que microrganismos termotolerantes produzem mais trealose quando mantidos em temperatura alta, como um mecanismo para prevenir a desidratação, sem que haja necessidade de aumentar a rigidez da membrana (CROWE & O'DELL, 1979; OURA & TANNER, 1987).

Outro fator relacionado ao crescimento em temperatura alta é a presença de proteínas de choque térmico (H.S.P. - Heat Shock Proteins). Uma breve exposição de células a temperatura acima do ótimo (37°C por 30 minutos) induz uma série de HPS específicas (< 16), as quais conferem termoresistência às mesmas. Tal fenômeno parece ser universal, tendo sido observado em *Drosophila*, leveduras e bactérias (RITOSSA, 1962; WATSON & CAVICCHIOLI, 1984; PLESSET *et alii*, 1987).

2.3. Efeito do pH e Lixiviação de Minerais em *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras, como qualquer outro organismo requerem para seu crescimento uma determinada faixa de concentração de íons hidrogênio no meio, na qual são mantidas a estrutura e atividade de suas moléculas.

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* toleram ampla variação de pH, crescendo entre os limites de 2,5 e 8,5. O índice ótimo de pH obtido para essa levedura aproxima-se de 4,5 (COONEY, 1981).

O pH interno das células de *S. cerevisiae* mostra-se relativamente independente do pH externo, mantendo-se entre 5,8 e 6,3, mesmo quando o pH do meio varia de 3,0 a 7,0 (JONES et alii, 1981).

A manutenção do pH intracelular durante o crescimento das leveduras, está relacionada com a excreção de íons H^+ gerados pela absorção de íons NH_4^+ (COONEY, 1981). Tal hipótese foi confirmada por dados experimentais obtidos por SLAVIK & KOTIK (1984), as quais demonstraram que a inibição da translocação de H^+ através da membrana, provocada pelo tratamento das células de leveduras com dietilstibestrol, leva a uma redução do pH interno das mesmas.

Segundo JANACEK et alii (1980) a liberação de íons H^+ juntamente com ácidos orgânicos, leva ao abaixamento do pH do meio de suspensão de células, após a alcalinização do mesmo.

Quando tal suspensão é suplementada com glicose, ocorre uma intensificação no abaixamento do pH demonstrando haver estreita correlação entre a glicólise e a liberação de íons H^+ (SIGLER *et alii*, 1981).

A liberação de íons H^+ aumenta acentuadamente quando, além da glicose, são adicionados cátions monovalentes à suspensão de leveduras, na sequência $K^+ > Rb^+ > Li = Na^+$ (SIGLER *et alii*, 1981).

A associação entre metabolismo de carboidratos e absorção de potássio foi demonstrada por ROTHSTEIN & ENNS (1946), sendo seus dados corroborados pelos apresentados por SCOTT *et alii* (1951). De acordo com esses autores, a inibição da via glicolítica por ácido indol acético, além de bloquear a absorção de potássio, provoca a perda desse elemento pela célula.

A constatação de que a absorção de potássio era acompanhada da liberação de íon H^+ , levou diversos autores a proporem um mecanismo de troca K^+/H^+ entre o meio e a célula (CONWAY & DOWNEY, 1950; FOULKES, 1956; CONWAY & DOGGAN, 1958). Tal mecanismo de troca envolveria um carreador, atuando como uma bomba de prótons, cujo funcionamento se daria às custas de energia proveniente do metabolismo celular (CONWAY *et alii*, 1950).

Essa hipótese foi suportada por MITCHELL (1961), o qual propôs ainda, a presença de atividade de ATPase de membrana criando um potencial eletroquímico necessário para a

transferência do íon K^+ para dentro da célula contra gradiente de concentração.

No entanto, PEÑA (1975), tratando células de levedura com dinitrofenol (D.N.P.), conhecido inibidor da fosforilação oxidativa, observou que a inibição da absorção de potássio ocorreu antes que o ATP das células caísse a níveis críticos. Foi proposto pelo autor que a inibição da absorção de potássio não foi devido à diminuição do ATP, mas sim ao aumento da liberação desse elemento pela célula, observado em tais condições. O efluxo de H^+ da célula durante o experimento, ocorreu através de um mecanismo à parte do transporte de K^+ .

A liberação de H^+ , através do mecanismo distinto da troca direta K^+/H^+ também foi eventada por KOTIK & SIGLER (1981) e confirmada por RAMOS (1985). Este último, submetendo célula de levedura a tratamento com os antibióticos nistatina e anfotericina, obteve inibição na absorção de K^+ antes da inibição da excreção de H^+ .

Por outro lado, dinitrofenol inibiu o fluxo do íon H^+ antes de inibir o fluxo do íon K^+ .

VILLALOBO (1984) estudando transporte de potássio em lipossoma de *Saccharomyces pombe*, observou que ocorria a translocação de íons K^+ e H^+ na ausência de ATP, quando havia um potencial de membrana induzido pelo efluxo de H^+ proporcionado, no experimento, por um condutor de prótons. Na ausência de condutor do íon H^+ e presença de ATP, o potás

sio interno estimulou a hidrólise do ATP. O autor sugeriu que a translocação do íon K^+ através da membrana apresenta 2 componentes cinéticos diferentes: utilizando o potencial de membrana, gerado pela translocação do íon H^+ e a energia livre gerada pela hidrólise do ATP. Tais suposições foram confirmadas por RAMOS (1985).

A influência do pH do meio sobre o transporte de potássio foi estudada por ROTHSTEIN & BRUCE (1958). Estes pesquisadores, mantendo leveduras de panificação em suspensão a pH 3,5, na ausência de potássio e em aerobiose, detectaram uma perda de íon K^+ relativamente constante, cuja taxa foi de 10 mM/kg de levedura/h. Sob anaerobiose, o efluxo de K^+ foi reduzido a 1 mM/kg/h. Observaram ainda, que esse efluxo apresentava-se menor a 5 ou 15°C do que a 25° ou 30°C.

Foi concluindo que o efluxo de íon K^+ a pH baixo deve-se ao aumento no influxo de H^+ através da membrana.

Estes dados concordam com os obtidos POR CONWAY & DOWNEY (1950) as quais demonstraram que o efluxo de íons K^+ em função do influxo de íons H^+ , envolve movimento de potássio de um meio rico, a célula (0,12 a 0,16 mM/kg célula) para um meio livre desse elemento, e movimento de íon H^+ de um meio rico (pH 3,5) para um citoplasma pobre em H^+ (pH aproximadamente 6,0).

Estudos cinéticos da translação de cátion atra

vés da membrana, em função do pH do meio evidenciaram dois tipos de efeito do íon H^+ sobre esse processo. A pH de 4,0 a 6,0 o íon H^+ atua como inibidor não competitivo da absorção de K^+ . O efeito competitivo, a pH abaixo de 4,0 poderia ser interpretado como interação do íon H^+ com o carreador responsável pelo transporte de potássio para dentro da célula. Esse carreador, tendo maior afinidade por íon H^+ do que por íon K^+ , transportaria o primeiro para dentro da célula, resultando num acentuado efluxo do segundo. O efeito não competitivo ocorreria como resultado da combinação do H^+ com um segundo sítio do carreador, sendo revertido pelo aumento da concentração de K^+ ou outro cátion metal alcalino no meio (ARMSTRONG & ROTHSTEIN, 1964).

Segundo SEASTON et alii (1976) a perda espontânea de íons K^+ por células de *Saccharomyces uvarum* em suspensão (a pH 4,5; 30°C e com baixo nível de ATP) chega a 70% do conteúdo total do potássio celular, enquanto que o pH intracelular cai de 6,2 para 5,7. Semelhante diminuição no pH intracelular foi observada por RODRIGUES-NAVARRO & RAMOS (1984) em idêntica condição experimental. Esses autores propuseram uma troca entre o K^+ da célula e o H^+ do meio independente de ATP.

No entanto, estudos realizados por CALAHORRA et alii (1987), utilizando vesícula de membrana plasmática de levedura; carregadas de cloreto de potássio, demonstraram que

a adição de ATP ao sistema leva a um aumento no efluxo de K^+ através da membrana, gerando um potencial de membrana o qual dirigiria o influxo de outros íons, com auxílio do carreador de cátions monovalentes.

Além do potássio, o fluxo de cálcio em células de *Saccharomyces cerevisiae* também mostra-se influenciado pelo pH do meio. De acordo com EILAN (1982), células crescidas em meio com ^{45}Ca , quando mantidas em meio a pH 5,0 (tampão, glicose e ausência de cátions) lixivaram 20% do cálcio celular até a segunda hora do experimento, não havendo diminuição desse elemento nas células nas 24 horas subsequentes.

Quando o pH do meio foi 7,5 a liberação do ^{45}Ca foi menos intensa nas duas primeiras horas, porém, aumentou no período entre 2 e 24 horas de ensaio. Foi sugerido pelos autores, que a liberação de cálcio ocorrida logo no início, a pH 5,0, foi devido à troca Ca^{2++}/H^+ através da membrana plasmática. O cálcio liberado na segunda fase (entre 2 e 24 horas) corresponderia àquele sequestrado em organelas celulares, possivelmente vacúolos, e sua liberação seria mediada por mecanismos distintos da troca por íon H^+ .

Leveduras em suspensão com água destilada, excretam sódio lentamente, acompanhado por ânions como bicarbonato e succinato (CONWAY & DOWNEY, 1950).

O efluxo de sódio das células, da mesma forma que o potássio, está ligado ao seu potencial de oxidação-redução o qual seria responsável por fornecimento de energia ao sis-

tema de transporte modulado por carreador (CONWAY & KERMAN, 1955; FOULKES, 1956). Entretanto, a liberação de sódio por células em suspensão em água, só ocorre quando estas foram crescidas em meio rico em sódio, ao contrário do que ocorre com potássio, cuja liberação ocorre mesmo em células sem nenhum enriquecimento prévio (FOULKES, 1956).

Leveduras crescidas em meio rico em sódio, quando mantidas em meio contendo fósforo inorgânico ($\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$), sempre perdem sódio e absorvem fósforo, quer na presença ou ausência de glicose ou potássio. Em meio com ausência de glicose, o fósforo absorvido é acumulado na célula na forma de fósforo inorgânico ou no pool de açúcar fosfato, não se incorporando à reserva de polifosfato.

A não formação de polifosfato, possivelmente decorreria do requerimento do P_i no processo metabólico, a partir do qual seriam formados os ânions liberados juntamente com o sódio (HOEFELER et alii, 1987).

2.4. Reservas de Carboidratos em *Saccharomyces cerevisiae*

Funções e Metabolismo

2.4.1. Glicogênio: caracterização

O glicogênio, extraído pela primeira vez em 1857 por CLAUDE BERNARD, foi estudado posteriormente por MEYER

(1943). Este autor propôs um modelo para a molécula, o qual consistia de unidades de glicose ligadas através de ligações glicosídicas $\alpha(1-4)$ e $\alpha(1-6)$, obedecendo a uma regularidade de cadeias de dois tipos, A e B. As cadeias do tipo A se ligariam à molécula por ligações $\alpha(1-6)$, não sofrendo ramificações e sendo sempre exteriores. As cadeias do tipo B, ou cadeias principais, seriam constituídas por ligações $\alpha(1-4)$ e ramificadas por cadeias do tipo A (LEÃO, 1975).

O modelo físico químico do glicogênio proposto por FRENCH (1964), consiste numa molécula com forma esférica, capaz de conter em sua superfície, uma enorme quantidade de cadeias A e B, cujo peso molecular é cerca de 2×10^7 na forma anidra e 4×10^7 quando hidratado.

As moléculas de glicogênio apresentam pequenas variações em suas propriedades e estruturas de acordo com a fonte biológica de origem, sendo possível diferenciá-las a partir de suas características físico-químicas. Assim, o fracionamento do glicogênio proveniente de levedura de panificação por eletrodiálise e por B.amilase, obtém-se 2 frações: uma maior (73% da molécula) relativamente insolúvel em água e com um limite de hidrólise por B.amilase de 46%; e outra fração menor e mais solúvel (27%), da qual, 49% é convertida em isomaltose (JEAN, 1944 citado por LEÃO, 1972). A análise de várias amostras de glicogênio animal tem revelado um limite de hidrólise por B.amilase de 32 a 54%.

Estudos sobre o glicogênio de leveduras, rea-

lizadas por LING (1925) ressaltaram a existência de dois tipos de glicogênio. Um primeiro tipo, estaria contido no material solúvel da célula, enquanto um segundo tipo estaria fisicamente acoplado a uma membrana de glucana, sendo insolúvel (NORTHCOTE, 1953).

Por outro lado, o método de extração de carboidratos de leveduras por processo de fracionamento, apresentado por TREVELYAN & HARRISON (1952) levam à distinção de uma fração de glicogênio alcali e outra ácido solúvel. Entretanto, conforme constatado por BERCH & ROTHSTEIN (1957) os dois tipos de glicogênio (solúvel e insolúvel) são quimicamente iguais sendo a fração ácido solúvel apenas um artefato da extração alcalina, desaparecendo quando se utiliza alcali forte para a extração.

Foi demonstrado por SMITH & SMITH (1974) que a obtenção de protoplasto de *Saccharomyces cerevisiae*, leva a uma drástica redução na fração insolúvel do glicogênio, mesmo quando foi utilizado glutaraldeído (substância que impede o metabolismo endógeno desse polissacarídeo), enquanto que a fração solúvel permaneceu constante. Os autores concluíram que a fração insolúvel do glicogênio estaria contida no espaço periplasmático, ligado a um componente insolúvel da parede e não envolto por membrana como sugerido por NORTHCOTE.

Além da diferenciação física do glicogênio foi proposto uma diferenciação metabólica para a molécula. Estu-

dos cinéticos sobre o metabolismo endógeno do glicogênio revelaram que as cadeias externas da molécula são metabolizadas por fermentação endógena, enquanto que as cadeias internas, são mobilizadas por via oxidativa (EATON, 1961).

2.4.1.1. Glicogênio: Biossíntese

A biossíntese de glicogênio requer duas enzimas distintas, uma responsável pela formação de ligações glicosídicas α (1-4) e outra pela formação de ligações α (1-6).

O clássico trabalho de LELOIR & CABID (1953) estabeleceu que as ligações α (1-4) - D - glicose da molécula de glicogênio são resultantes de sucessivas transferências de resíduos de glicose da uridina - difosfato - glicose para o polissacarídeo aceptor. A reação não é reversível e é catalizada pela enzima glicogênio - UDP - glicosil transferase. Enzima semelhante foi isolada de levedura de panificação, por ALGRANATI & CABID (1962).

A cadeia linear de ligações α (1-4) - glicose, são interligadas através de ligações glicosídicas α (1-6) catalizadas por uma enzima ramificadora. Esta enzima, extraída pela primeira vez a partir de levedura de panificação por KNOLBERG & MANERS (1936) (citado por LEÃO, 1972), "in vivo" atua de maneira alternada com a glicogênio sintase, constituindo uma molécula com estrutura multiramificada.

A biossíntese de glicogênio envolve os seguin

tes passos: a) fosforilação da glicose pela hexoquinase; b) conversão da glicose - 6 - fosfato em glicose - 1 - fosfato; c) formação da uridil - difosfato - glicose pela pirofosforilase; d) ação combinada da glicogênio sintase e enzima ramificadora (SMITH *et alii*, 1968).

2.4.1.1.1. Glicogênio: Regulação da Biossíntese

A regulação da biossíntese de glicogênio estudada por ROTHMAN & CABID (1969) em leveduras, é feita por ativadores como a glicose - 6 - fosfato (G.6.P.); ATP e inibidores alostéricos como íons Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} e PO_4^{3-} .

Trabalho realizado posteriormente pelos mesmos pesquisadores (ROTHMAN & CABID, 1969) mostrou que a síntese de glicogênio em levedura é totalmente inibida pela adição de íons NH_4^+ . Segundo os autores, a adição de NH_4^+ não leva à inibição do glicogênio sintase, nem altera a relação ATP/ADP da célula, mas sim, leva à desinibição da fosfofrutoquinase, baixando o nível celular de G.6.P. Concluíram que a glicogênio sintase só é ativa quando os níveis de G-6-P o permitem.

Leveduras crescendo em meio com baixo nível de nitrogênio assimilável apresentam acentuada síntese de reservas (BRANDT, 1941; TREVELYAN, 1956; SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961; LILLIE & PRINGLE, 1980). Foi observado ainda, que quando as células são privadas de outros nutrientes como enxo-

fre e fósforo, acumulam grande quantidade de carboidratos de reserva, sugerindo que tal acúmulo é uma resposta geral à limitação de nutrientes (LILLIE & PRINGLE, 1980).

Entretanto, estudos sobre o controle da síntese de glicogênio durante o crescimento de levedura, levam à conclusão de que, além dos níveis de nutrientes e metabólitos, a biossíntese é dependente da interconvenção da glicogênio sintase da forma fosforilada inativa (D) para a forma defosforilada ativa (I) (ROTHMAN & CABID, 1970). Esta interconvenção é feita pela remoção do grupamento fosfato da forma D pela enzima proteína-fosfatase Mg^{2+} dependente, a qual é regulada pelos níveis de G-6-P. A reação oposta (I-D) requer Mg^{2+} e ATP.

Leveduras cultivadas em meio com baixo nível de glicose e alimentação lenta, possuindo baixo nível de ATP, apresenta síntese de glicogênio durante o crescimento exponencial a qual é interrompido no final da fase de crescimento quando o nível de ATP é alto, iniciando então a quebra dessa reserva (GRBA et alii, 1975). Entretanto, células de leveduras crescendo em meio com concentração de glicose mais elevada, apresentam a interconvenção do glicogênio sintase da forma D para a forma I somente no início da diauxia (exaustão da glicose do meio), obedecendo a um modelo de repressão catabólica. Foi sugerida a existência de dois sistemas regulatórios da biossíntese, um através de controle metabólito e outro por controle da interconvenção das 2 formas da enzima (BECKER, 1977).

LEÃO **et alii** (1984) utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes susceptibilidades à repressão catabólica, obtiveram modelos idênticos de acúmulo de glicogênio nas diferentes linhagens. A biossíntese de glicogênio foi lenta durante o crescimento exponencial, acentuando-se após ter diminuído a concentração de glicose no meio e o crescimento ter cessado. A quantidade final de glicogênio foi sempre maior nas células parcialmente derreprimidas. Concluíram, os autores, que a repressão catabólica não interfere no modelo de acúmulo de glicogênio, mas sim na quantidade do glicídeo acumulada.

Durante o ciclo fermentativo, leveduras de panificação apresentam um modelo de acúmulo de glicogênio característico, envolvendo 3 fases distintas. A primeira ocorre rapidamente após a alimentação, caracterizada por intensa mobilização de glicogênio existente na célula, consumo de oxigênio e síntese de lipídeos. Uma segunda fase, correspondendo à maior parte do ciclo, resulta em acúmulo de glicogênio pelas células. Ao final desta, já completada a fermentação, inicia-se uma terceira fase, caracterizada por dissimilação parcial do glicogênio armazenado, embora muito mais lentamente que na primeira fase (BERCK & ROTHSTEIN, 1957).

Além dos fatores bioquímicos, os fatores inerentes ao meio de crescimento influem direta ou indiretamente no metabolismo das reservas de carboidratos da célula.

A velocidade de crescimento está diretamen-

te ligada à mobilização e síntese das reservas, as quais são mais intensamente mobilizadas quanto maior for a taxa de crescimento (KÜENZI & FIECHTER, 1972; PANEK, 1983). Nessas condições, a trealose desaparece rapidamente das células, porém o glicogênio diminui mais lentamente. Com base nesses dados, KÜENZI & FIECHTER (1972) concluíram que um mecanismo regulatório permitiria o fluxo direto da glicose entre as vias catabólicas e anabólicas, ativadas em tempos diferentes. Esse mecanismo envolveria atividade específica do UDPG - pirofosfatase (catalizando a formação de UDPG) e da glicogênio fosforilase, responsável pela quebra do glicogênio.

O crescimento anaeróbico (CHESTER, 1963; MANDL *et alii*, 1973) leva a maior acúmulo de carboidratos de reserva por linhagens de *S. cerevisiae*, do que crescimento aeróbico (40% e 10% do peso seco, respectivamente). Entretanto, resultados opostos foram obtidos para levedura de panificação (SUOMALAINEN & PÄFFLI, 1961; GRBA *et alii*, 1975).

A temperatura mais favorável para síntese de glicogênio, segundo GRBA *et alii* (1975), foi 30°C para levedura de panificação e 7°C para levedura de cervejaria.

2.4.1.2. Glicogênio: Catabolismo

Em células animais, a degradação do glicogênio é controlada pelo nível de AMPc (adenosina - 5 - monofosfato cíclico) e realizada pela enzima fosforilase existente

em duas formas interconvertíveis: a forma fosforilada ativa (fosforilase a) e na forma defosforilada inativa (fosforilase b).

A remoção do grupo fosfato da fosforilase a é feita por ação de uma fosforilase sendo a fosforilase b resultante, refosforilada por uma fosforilase quinase, ativada pelo AMPc.

No entanto, segundo SAGARTIA *et alii* (1971), a enzima glicogênio fosforilase em leveduras, não é AMPc sensível, não ocorre em duas formas (a e b), sendo inibida competitivamente, "in vitro", pela G-6-P; UDP.Glicose e glicose. Porém, estes metabólitos não regulam a atividade da fosforilase "in vivo". Foi sugerido que a não atuação dos inibidores competitivos "in vivo" deve-se ao fato da fosforilase estar ligada de maneira saturada às partículas de glicogênio, uma vez que a concentração de grupos terminais na molécula é bastante elevada.

2.4.2. Trealose

2.4.2.1. Trealose: Caracterização

α,α .trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose ligado pelo carbono anômérico.

Descoberta em 1832 por WIGGERS, no centeio es pigado, foi cristalizada em 1925 por KOCH & KOCH, após ex tração a partir de levedo de panificação (PANEK, 1975).

A trealose encontra-se amplamente distribuída na natureza, tendo sido isolada de bactérias, algas, fun gos, insetos, nematóides, anelídeos e vegetais. Nestes orga nismos, a trealose está envolvida com os mais diversos meca nismos (CHARLAB, 1983).

Em micobactérias, a trealose aparece associa da com outras substâncias formando glicolipídeos, sulfoli pídeos e polissacarídeos importantes na composição da parede celular e muitas vezes relacionadas com a antigenicidade.

Nos insetos, é observada na hemolinfa, ocorrendo em todos os estágios e atuando, nos adultos, como re serva para o voo (CHARLAB, 1983).

Em leveduras, a função da trealose não foi ain da devidamente esclarecida. Diversos pesquisadores têm atri buído a esse glicídeo outras funções além daquela relativa a carboidrato de reserva, conforme será discutido adiante.

2.4.2.2. Trealose: Biossíntese

O mecanismo de biossíntese de trealose, des crito por CABID & LELOIR (1958) para levedura de cervejaria, envolve a transferência do resíduo de D-glicose do nucleotí deo UDP - glicose para a glicose-6-P, por ação da enzima trea

lose-6-fosfato sintase, formando trealose-6-fosfato e uridina fosfato. O grupo fosfato da trealose-6-P é removido por uma fosfatase específica (trelose-6-P fosfatase) liberando a trealose.

A presença de fosfatase muito ativa, retirando o produto intermediário da reação (trelose-6-P) consiste, provavelmente, num mecanismo de estímulo à síntese da trealose (PANEK, 1962).

A enzima sintase exibe atividade máxima a pH 6,6, na presença de 25 mM de Mg^{2+} (CABID & LELOIR, 1958). O papel do íon Mg^{2+} na reação depende da sua concentração no meio. Em baixa concentração (menos que 12 mM) o Mg^{2+} liga-se à glicose-6-P formando o complexo G-6-P- Mg^{2+} , que constitui-se um melhor substrato para enzima do que o éster livre. Com o aumento da concentração de magnésio e mantendo-se a concentração de G-6-P, o cátion interage diretamente com a enzima acarretando a inibição da reação de síntese da trealose (OESTREICHER & PANEK, 1982).

2.4.2.3. Trealose: Regulação da Biossíntese

ELANDER (1969) estudando a atividade da enzima trealose-6-fosfato sintase em leveduras, demonstrou que os nucleotídeos Uridina-5-pirafosfato são inibidores competitivos de UDP-Glicose na reação. Em pesquisas posteriores, foi constatado que essa enzima também é inibida por 20 mM de fos

fato inorgânico e trealose-6-P. A trealose livre não apresentou efeito sobre a enzima "in vitro" (ELBEIN, 1974).

O metabolismo da trealose em leveduras durante o crescimento aeróbico em meio completo, segue um modelo para mobilização e biossíntese, característico para cada fase do crescimento. Logo após a inoculação (lag fase) há uma rápida quebra da trealose, a qual permanece em baixo nível até o final da primeira fase do crescimento logarítmico (início da diauxia) quando então inicia-se a ressíntese da trealose (BRANDT, 1941; TREVILIN & HARRISON, 1956; SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961; PANEK, 1962; KÜWENZI & FIECHTER, 1972; PLAAT, 1974).

A mobilização da trealose observada na fase lag é acompanhada por liberação de CO_2 (PANEK, 1963) e independe da concentração de glicose do meio (VASCONCELLOS & PANEK, 1978). Entretanto, quando as células são colhidas na fase de crescimento logarítmico e reinoculadas em meio fresco contendo glicose, acumulam grande quantidade de trealose, sugerindo que a síntese ou degradação desse glicídeo estão relacionadas com o estado fisiológico das células (VASCONCELLOS & PANEK, 1978).

Durante a fase de crescimento exponencial sob aerobiose, ocorrem síntese e mobilização simultâneas da trealose, resultando na pequena quantidade dessa reserva armazenada nessas condições. Por outro lado, durante o crescimento das leveduras, há ativação na síntese de aminoácidos, a qual passaria a competir pelo metabólito intermediário comum, a

UDP-glicose, em detrimento da síntese de trealose (TREVELYAN & HARRISON, 1954; PANEK, 1962).

A possível competição entre as vias de biossíntese de trealose e aminoácidos foi suportada por dados apresentados por TREVELYAN & HARRISON (1954). Estes autores observaram que em meio completo em nutrientes, as células de leveduras acumulam mais aminoácidos e menos trealose, sendo o inverso obtido na ausência de nitrogênio.

Em processo fermentativo (anaeróbico) o metabolismo da trealose em leveduras apresenta comportamento idêntico ao observado em crescimento aeróbico. Há intensa mobilização da trealose logo após inoculação, correspondendo a maior taxa de fermentação. Após o término do ciclo fermentativo, há ressíntese da trealose, seguida estabilização da mesma (TREVELYAN & HARRISON, 1956).

A transferência de células em final de fermentação, para um meio com glicose e sem nitrogênio, não só diminui a quebra da trealose como também leva a uma taxa máxima de fermentação (TREVELYAN & HARRISON, 1954). A quantidade de trealose acumulada no final do processo é acentuadamente maior do que aquela observada na presença de nitrogênio (KÜENZI & FIECHTER, 1972; PLAAT, 1974).

Em 1955, MILHAUD & AUBERT observaram a existência de síntese de trealose em leveduras mantidas em condições não proliferantes, a partir de glicose como fonte externa de carbono (LEÃO, 1972). Nestas mesmas condições, AVIGAD

(1960) constatou a ocorrência de um rápido "turnover" de trealose, numa taxa de 5 moles de glicose/minuto/g matéria seca de levedura. O autor sugeriu que também nessas condições operaria um sistema ativo de síntese e quebra de trealose.

Células de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam intenso acúmulo de trealose durante a diauxia (PANEK, 1962). Somente células colhidas após o final da primeira fase de crescimento experimental sintetizam trealose quando mantidas em condições não proliferantes, indicando um possível controle da trealose sintase através de repressão catabólica (PANEK, 1975). Os mesmos autores propuseram que além da liberação da repressão catabólica, uma mitocôndria operante seria pré-requisito para a síntese desse glicídio.

A transferência de leveduras em estágio final de crescimento anaeróbico para uma condição aeróbica, leva ao aumento no teor de trealose das mesmas (BRANDT, 1941).

Trabalhos posteriores também evidenciaram maior acúmulo de trealose em células em crescimento aeróbico em relação às aquelas crescidas sob anaerobiose (SUOMALAINEN & PFAFFLI, 1961; GBRA et alii, 1975).

Células crescidas em anaerobiose, acumulam igual quantidade de trealose quando mantidas em condições não proliferantes, em presença de glicose, sob aerobiose ou semi-anaerobiose. Entretanto, a aeração proporciona uma síntese mais rápida do glicídeo. Tal fenômeno foi caracterizado como consequência da transformação das mitocôndrias, precurso

ras, formadas durante o cultivo anaeróbico, em mitocôndrias derreprimidas (PANEK, 1975).

GRBA *et alii* (1975) determinaram uma temperatura ótima de 45°C para a biossíntese de trealose. Durante o crescimento a 30°C, o mecanismo de mobilização e síntese dessa reserva obedece ao modelo descrito anteriormente. Porém a 37°C ocorre síntese de trealose durante o crescimento exponencial.

A influência do pH do meio sobre a síntese de trealose em leveduras, foi estudada por BARWELL & BRUNT (1969). Os autores observaram inibição da síntese quando o pH do meio foi menor que 4,5, embora tenha ocorrido absorção de glicose pelas células numa faixa de pH de 2,0 a 8,0. Foi sugerido uma alteração na atividade a trealose sintase, decorrente da alteração do pH intracelular.

2.4.3.4. Trealose: Catabolismo

Em *S. cerevisiae*, é conhecida somente uma enzima capaz de hidrolizar a ligação glicosídica da molécula de trealose, a trealase (α . α .trealose-1-D-glicoidrolase).

A trealose foi detectada pela primeira vez em 1893 por BOUQUELOT, no fungo *Aspergillus* (CHARLAB, 1983).

O pH ótimo para atuação da enzima varia de 3,7 a 7,5 e o K_m está entre 20 mM a 400 mM nos diferentes organismos. Em alguns seres, a trealase é encontrada na fração

solúvel, enquanto que em outros, ligada à membranas (ELBEIN, 1974). Tais oscilações no comportamento da enzima podem estar relacionadas com o papel fisiológico de seu substrato num determinado sistema biológico.

A enzima trealase e seu substrato, em leveduras de panificação, estão separados fisiologicamente, encontrando-se a primeira, solúvel no citoplasma, enquanto o segundo aparece ligado à membrana (SOUZA & PANEK, 1968).

A purificação parcial da trealase de leveduras de panificação realizada por PANEK & SOUZA (1968) revelou um pH ótimo para a atuação da enzima de 5,7 e um K_M de $4 \times 10^{-4} M$. ORTIZ *et alii* (1983) utilizando outra cepa de *S. cerevisiae* obtiveram um pH ótimo de 6,0 e um K_M de $5,62 \times 10^{-3} M$.

Embora o pH ótimo para a trealose tenha sido sempre caracterizado como sendo menor que 6,0, KELLY & CATLEY (1976) observaram que a elevação do pH do meio até 7,0 provocava, "in vitro", um aumento na atividade da enzima de até 7 vezes. Foi proposto posteriormente por WIENKEN & SCHELLEMBERG (1982) a existência de uma trealase ativa a pH 5,0, a qual estaria contida em vacúolos e outra trealase ativada por AMPc, presente no citosol. Essa hipótese foi confirmada por LONDESBOROUGH & VARIMO (1984), quando identificaram uma trealase C, com pH ótimo de 6,7 e requerimento de Ca^{++} , Mn^{++} e AMPc para sua atividade e trealase V, com pH ótimo de 4 a 5, sem exigência de íons bivalentes para sua ativação. Esta última corresponde à trealase vacuolar e só é ativada

em condições que não permitem a atuação da trealase C. Essa ativação é realizada através de proteases (HARRIS & COTTER, 1987).

A regulação da enzima trealase pelo nível de AMP-3'-5'-cíclico da célula, foi demonstrada por PLAAT (1974). Esse autor observou que durante a fase lag, que precede o crescimento, há intensa degradação da trealose coincidindo com o aumento na concentração do AMPc da célula, o qual retorna a um nível básico quando cessa a degradação.

Estudos "in vitro" revelaram que uma concentração de 0,1 mM de AMPc, em pH 7,0 a 30°C, leva a ativação de 50% do total da enzima (PLAAT, 1974).

O mecanismo de ativação da enzima trealase pelo AMPc consiste num sistema em cascata AMPc dependente, envolvendo uma proteína quinase, ATP e Mg^{2+} (CHVOJKA et alii, 1981; ORTIZ et alii, 1983).

Numa revisão sobre regulação do metabolismo da trealose PANEK (1985) concluiu que um mesmo mecanismo de fosforilação, regulando enzimas envolvidas na síntese e degradação da trealose, levaria, em condições de predominância de fosforilação, à quebra do glicídio, enquanto que em condições opostas, resultaria no acúmulo do mesmo.

2.4.3. Metabolismo de Glicogênio e Trealose em Condições não proliferantes e de Estresse

Células de leveduras podem apresentar de 1% a

23% de seu peso seco como glicogênio e trealose, dependendo das condições ambientais e do estágio de seu ciclo de vida (CHESTER, 1963; ROTHMAN & CABIB, 1970; KUENZI & FIECHER, 1972).

Esta ampla variação no conteúdo das reservas de carboidratos sugere que ambas exercem importantes funções durante o ciclo de vida das células, estando relacionadas com a manutenção, diferenciação e sobrevivência das mesmas.

Há evidências que estes glicídeos funcionem como fonte de carbono e energia para leveduras sob condições de jejum (FALES, 1951; EATON, 1960; CHESTER, 1963; PANEK, 1963); durante adaptação respiratória (PANEK & MATOON, 1977; QUAIN & HAWLAM, 1979; LILLIE & PRINGLE, 1980); na formação e germinação de esporos (ROUSNEAU, 1972; KANE & ROTH, 1974; COLONNA & MAGEE, 1978; FONZI *et alii*, 1979; PANEK & BERNARDES, 1983); em células vegetativas por ocasião de transferência da fase estacionária para meio fresco (PRINGLE, 1975; VASCONCELLOS & PANEK, 1978); e em células em mitose sob limitação de carbono e energia (VON MEYENBURG, 1969; KUENZI & FIECHER, 1969; 1972).

O comportamento dos carboidratos de reserva durante o crescimento de leveduras tem sido amplamente estudado. Entretanto, a utilização destas reservas pelas células, na ausência de qualquer substrato, tem sido objetivo de inúmeros trabalhos, por vezes conflitantes, deixando diversos aspectos em aberto.

O consumo de oxigênio ou produção de etanol e

dióxido de carbono a partir das reservas de carboidratos constituem processos que se denominam respectivamente, respiração e fermentação endôgena.

STIER & STANNARD (1936a), estudando a taxa respiratória de duas linhagens de *S. cerevisiae* cultivadas aerobicamente, revelaram que em meio sem nutrientes, houve um período de constante consumo de O_2 e produção de CO_2 ($Q/R=1$), característica de células com amplo material de reserva. Esse quociente respiratório ($=1$) manteve-se durante a maior parte do ensaio, declinando quando a taxa respiratória decresceu para aproximadamente $1/4$ do seu valor inicial, tornando-se então, proporcional à concentração do substrato, possivelmente o glicogênio. Concluíram os autores, que as leveduras são incapazes de fermentar suas reservas, e que o catabolismo destas se deu por mecanismo puramente aeróbico, distinto daquele envolvido no metabolismo do substrato externo (STIER & STANNARD, 1936b).

Resultados obtidos por SPIEGELMAN & NOZAWA (1945) concordaram com os apresentados por aqueles autores no que se refere à via puramente oxidativa para a mobilização das reservas, porém, afirmaram que o metabolismo endôgeno segue o mesmo mecanismo postulado para a respiração do substrato exôgeno.

A primeira evidência de fermentação endôgena em leveduras foi divulgada por BRADY *et alii* (1956). Estes autores constataram uma pequena queda nas reservas de car-

carboidratos acompanhada por formação de etanol e CO_2 , quando as células eram mantidas em anaerobiose. // Entretanto, foi CHESTER (1959a) quem demonstrou que em linhagens de *S. cerevisiae* as reservas de carboidratos eram degradadas por processo fermentativo durante a ausência de nutrientes, sob aerobiose ou anaerobiose. Como resultado dessa fermentação, observou-se uma queda de 50% do conteúdo total de carboidratos (glicogênio + trealose) num período de 5 horas. // Em ensaio sob anaerobiose, o decréscimo de teor de carboidratos foi de 85 a 100% da quantidade calculada para a liberação de CO_2 . O etanol acumulado correspondeu a cerca de 70% da quantidade esperada de CO_2 . Sob aerobiose a fermentação endógena evidenciou-se por alto quociente respiratório inicial e produção de etanol, o qual foi acumulado por 2 horas, desaparecendo a seguir, do sistema. Em ensaios posteriores foi verificado que a presença de oxigênio no meio estimula a fermentação endógena (CHESTER, 1959b).

EATON (1960), mantendo células de *S. cerevisiae* em suspensão com tampão fosfato, em aerobiose, constatou a liberação de CO_2 a partir de reservas endógenas, caracterizada por dois processos de primeira ordem ocorrendo simultaneamente.

Considerando que sob aeração, apenas o teor de glicogênio diminuiu enquanto a trealose permaneceu inalterada, concluiu-se que nesta condição apenas o polissacarídeo é metabolizado. No entanto, quando a suspensão foi mantida em

anaerobiose, houve produção de etanol equivalente à liberação de dióxido de carbono, com consistente consumo de glicogênio e trealose. Foi inferido que o glicogênio constitui dois "pools" metabolicamente distintos, sendo um deles metabolizado por via oxidativa e outro por via fermentativa. A trealose foi metabolizada somente por via fermentativa. Ainda segundo EATON, os lipídeos não tiveram nenhuma atuação como substrato para respiração endôgena, como seria suposto a partir dos resultados apresentados por STICKLAND (1956).

Em ensaios posteriores, foi demonstrado que o "pool" de glicogênio fermentescível corresponderia à glicose das cadeias externas da molécula, sendo a cadeia central o "pool" oxidável (EATON, 1961).

A não metabolização da trealose por oxidação endôgena, também observada por WILSON & McLEOD (1976), difere dos resultados obtidos por PÁCA (1981). Segundo esse autor, leveduras de panificação, suspensas em solução de cloreto de sódio (0,9%), em aerobiose, iniciam a mobilização de trealose após 10 horas de "jejum" a pH 5,5 e após 16 h a pH 4,4. Após 32 horas, os teores de glicogênio e trealose das células atingiram 33% e 27%, respectivamente, dos seus teores iniciais.

[Leveduras crescidas sob condições aeróbicas, apresentam menor atividade respiratória e menor consumo de reservas quando mantidos em meio sem nutrientes, do que aquelas crescidas anaerobicamente. O maior consumo de reservas

apresentado por leveduras provenientes de crescimento anaeróbico possivelmente foi devido às maiores exigências de carbono e energia provocadas pelo fenômeno de adaptação respiratória observados nessas células (CHESTER, 1963; WILSON et alii, 1977). Esta hipótese encontra argumentos nos resultados apresentados por KOVAC et alii (1967), o qual observou que as quantidades de fosfolipídeos, ácidos graxos e esterol nas células, aumentam durante a adaptação respiratória, ao mesmo tempo em que ocorre a transformação da estrutura pró-mitocôndria em mitocôndria ativa.

De acordo com CHESTER (1963), leveduras crescidas anaerobicamente mobilizam 63% de seu conteúdo de trealose e glicogênio em 5 horas de jejum aeróbico. Foi verificado que o etanol e acetato liberados ao meio, durante esse período, tenderam a desaparecer da suspensão. O oxigênio consumido durante o experimento foi suficiente para oxidar apenas 50% do acetato consumido do meio. O autor sugeriu que o acetato não oxidado foi utilizado na síntese de material celular, conforme demonstrado por SMEDLEY-McLEAN & HOFFERT (1923) em leveduras de cervejaria.

Segundo PÁÇA (1981), a produção de etanol a partir de fermentação endógena em leveduras de panificação, tende a diminuir após um período de 6 horas de jejum aeróbico. Durante esse período haveria indução das enzimas envolvidas nos ciclos do ácido tricarbóxílico, glioxilato e cadeia respiratória.

Uma vez ativada a via oxidativa, as células passariam a utilizar o etanol como fonte de carbono e energia.

Com a redução da concentração de etanol no meio (após 10 horas de jejum), iniciou-se intensa degradação dos carboidratos de reserva, com manutenção de uma baixa atividade respiratória. Após 32 horas de jejum houve interrupção da quebra das reservas, com acentuada formação de acetato. Como a taxa de oxidação de etanol manteve-se constante durante esse período, o autor sugeriu que a formação de acetato estaria relacionada com a variação nos níveis de etanol e acetaldeído intracelular e seria o mecanismo pelo qual a célula balancearia sua razão NAD/NADH e reduziria sua atividade metabólica endógena.

Leveduras de panificação, após crescimento aeróbico, não metabolizam suas reservas por um período de 2 horas em ausência de nutrientes, sob aerobiose, ao contrário, acumulam trealose e glicogênio na proporção 5:1 (PANEK, 1963).

Segundo PANEK & MATOON (1977) a síntese de trealose nessas condições só é observada quando as células apresentam mitocôndrias ativas. Por outro lado, a diminuição no "pool" de aminoácidos (OURA *et alii*, 1974; PANEK, 1975) e a presença das enzimas isocitrato liase, piruvato carboxilase e frutose difosfatase ativas nessas células (DIVJAK & MOR, 1973) sugerem uma via neoglicogênica para a síntese de trealose durante o jejum.

A formação de esporos em leveduras, considera da uma resposta à condição de estresse, é precedida de intenso acúmulo de trealose (cerca de 18 vezes o valor original) e glicogênio (ROTH, 1970). Durante a fase de amadurecimento dos esporos, ocorre mobilização do glicogênio acumulado, por ativação da enzima amiloglucosidase, responsável pela glicogênólise nestas condições (KANE & ROTH, 1974; COLONNA & MAGEE, 1978). A germinação desses esporos é caracterizada pela quebra da trealose (PANEK & BERNARDES, 1983).

Linhagens mutantes de *S. cerevisiae*, impossibilitadas de acumular glicogênio, não esporulam, enquanto que esporos de mutantes que não acumulam trealose são incapazes de germinar. Desta forma, foi designada a função específica do glicogênio no processo de formação de esporos, enquanto que a trealose atuaria na germinação dos mesmos (PANEK & BERNARDES, 1983).

Diversos pesquisadores têm relacionado a estabilidade das células com seus teores de carboidratos de reserva. Estudos comparando perda de viabilidade durante jejum aeróbico, entre células crescidas aerobica e anaerobicamente, revelaram que a viabilidade em ambos os tipos permanece alta por 24 horas. Porém, após esse período, o decréscimo na viabilidade é muito maior nas células crescidas em anaerobiose. Foi inferido que tal perda da viabilidade está diretamente ligada ao maior consumo de reservas observado nessas células, devido ao processo de adaptação respiratória

(BALL & ATKINSON, 1975). Estes resultados foram corroborados por WILSON & McLEOD (1976), os quais sugeriram ainda que além do consumo das reservas, a queda na viabilidade também decorreu da deficiência estrutural da membrana provocada pela carência de esterol e ácido graxo conseqüente do crescimento anaeróbico.

Segundo PANEK *et alii* (1985), linhagens mutantes de *S. cerevisiae* possuindo baixa atividade da enzima trealose-6-fosfato sintase, são mais frágeis quando mantidas em suspensão na ausência de crescimento.

Tem sido proposto que a sobrevivência de organismos durante a dessecação está relacionada com os seus teores de trealose (BECKER *et alii*, 1980; ZIKMANIS *et alii*, 1985). Da mesma forma, a termotolerância em leveduras e a manutenção das estruturas citoplasmáticas sob condições de estresse foram designadas como características de células produtoras de elevadas quantidades de trealose (KELLER *et alii*, 1982).

O mecanismo pelo qual a trealose promove o estabelecimento das células sob estresse não foi ainda devidamente esclarecido. Conforme sugerido por CROWE (1979) a trealose interagiria com os fosfolipídeos da membrana celular prevenindo danos nesta durante a reidratação de células submetidas previamente à dessecação. Desta forma seria excluída a fase transitória da membrana aumentando a estabilidade da mesma.

Com base nos aspectos abordados, conclui - se que os carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, atuam como reservas de carbono e energia nos diferentes estágios de ciclo de vida da levedura. Porém, além dessa função, a trealose aparece envolvida em mecanismo que aumentam a estabilidade das células em condições distintas daquelas ótimas para seu desenvolvimento. Essa segunda função de trealose poderia justificar a presença de dois tipos diferentes de carboidratos de reserva num mesmo organismo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Mostos Utilizados

Os mostos utilizados nos ensaios foram obtidos a partir de melaço proveniente da Usina Santa Elisa S/A, Sertãozinho, SP, o qual foi diluído até concentração de 15% (g/100 ml) de seu ART, sendo o pH corrigido a 4,5 com ácido sulfúrico. Estes mostos foram esterilizados em auto clave a 120°C, sob pressão de 1,0 atmosfera, por 20 minutos. A adição de sais foi feita logo após o resfriamento dos mostos, seguida do congelamento dos mesmos até o momento do uso.

3.1.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi feita em pH metro digital mod. 601, Orion Research.

3.1.2. Determinação dos Elementos Minerais nos Mostos e Melaços

Os teores de minerais do melaço e dos mostos

foram determinados após digestão sulfúricas e nitroperclóricas das amostras utilizando-se bloco digestor modelo 40-25 da Sarge Aparelhos Científicos.

O nitrogênio, após digestão sulfúrica da amostra, foi determinado pelo método Kjeldahl, modificado por SARRUGE & HAAG (1974).

As quantificações de cálcio, magnésio e zinco foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica, a partir do extrato obtido pela digestão nitro perclórica (SARRUGE & HAAG, 1974). Deste mesmo extrato, foram determinados o teor de fósforo, segundo o método descrito por CATANI & JACINTO (1974) e o teor de potássio, através de leitura em fotômetro de chama NK-200 - Digimed.

3.1.3. Suplementação de Sais no Mosto

Foram utilizados para a suplementação dos mostos, os seguintes sais:

- 130 ppm de fósforo, na forma de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4);
- 8 ppm de zinco, na forma de fosfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- 300 ppm de magnésio na forma de sulfato de magnésio (MgSO_4).

Os teores de elementos minerais no melaço e nos mostos após a adição de sais, são representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Teores de minerais (ppm) no melaço e no mosto.

	N	P	K	Ca	Mg	Zn	Sulfito
melaço	1120	443	8800	2000	2000	-	51
mosto	390	133	3250	868	1181	52	-

3.1.4. Determinação de Sulfito no Melaço

O teor de sulfito foi determinado colorimetricamente através da reação com p-rosanilina, após destilação da amostra em meio ácido, conforme o método de NAUMAN (1960), adaptado por Basso (1986)*.

3.1.5. Determinação do ART no Melaço e Mostos

As concentrações (g/100 ml) de açúcares redutores totais (ART) nos mostos e melaços foram determinados segundo o método de Somogyi e Nelson, adaptado por AMORIM et alii (1982).

* BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Departamento de Química, Setor Bioquímica - Piracicaba, SP).

3.2. Fermento Utilizado

Foi utilizado nos ensaios, a levedura de panificação Fleischman (*Saccharomyces cerevisiae*).

O fermento comercial Fleischman era adquirido semanalmente, sendo realizadas análises para determinação dos seus teores de carboidratos de reserva (glicogênio e trealose), matéria seca, viabilidade (número de células viáveis/grama de fermento úmido) e elementos minerais, cujos resultados encontram-se nos intervalos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química do fermento comercial Fleischman.

Componente	Levedura (g/100 g peso seco)
Matéria seca (g/100 peso úmido)	20 - 25
Glicogênio	8,0 - 11,0
Trealose	3,0 - 11,4
N	6,58 - 7,72
P	0,51 - 0,95
K	1,50 - 2,06
Mg	0,093 - 0,19
Ca	0,032 - 0,057
Zn	0,0045 - 0,0074
células vivas ($\times 10^8$ /g massa celular úmida)	130 - 150

3.2.1. Determinação dos Carboidratos de Reserva do Fermento

3.2.1.1. Amostragem

A quantidade de fermento (12 mg de matéria seca) necessária para as determinações de glicogênio e trealose foi obtida a partir de uma suspensão de células. O volume de amostra a ser tomado foi baseado em reta padrão de matéria seca da suspensão, obtida conforme o seguinte ensaio.

Foram pesados 10 g de fermento comercial, o qual foi lavado 2 vezes por suspensão em água gelada e centrifugação a 19000 rpm (686xg) em centrífuga modelo PR-2, IEC. Em seguida, as células foram ressuspendidas em água destilada à concentração de 30g de massa celular úmida por 100g de suspensão.

Desta suspensão, foram tomados 0,1; 0,2; 0,5; 0,7 e 1,0 ml e determinados o peso seco da massa celular correspondente.

3.2.1.2. Determinação do Glicogênio

O glicogênio no fermento foi analisado pelo método enzimático com α -amiloglucosidase (sigma - 8400 unts/g - *Rhizopus*) descrito por BECKER (1978), adaptado por ROCHA-LEÃO et alii (1984) e determinado como glicose, pelo método colorimétrico de Somogyi e Nelson (AMORIM et alii, 1982).

3.2.1.3. Determinação da Trealose

A análise da trealose foi feita através de extração com ácido tricloroacético (TCA) a frio (TREVELYAN & HARRISON, 1956) e determinação pelo método da antrona (BRIN, 1966).

3.2.2. Determinação dos Elementos Minerais no Fermento

O fermento a ser analisado, após lavagem com água destilada (suspensão e centrifugação), foi mantido em estufa a 60°C até peso constante, sendo posteriormente triturado.

As amostras de fermento seco, assim obtidas, foram submetidas às digestões sulfúricas e nitroperclóricas, segundo o item 3.1.2.

3.3. Fermentação Alcoólica e Tratamento do Fermento

3.3.1. Condução do Experimento

Foram realizados dois ciclos fermentativos, intercalados por tratamento do fermento, conforme esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1. Esquema dos ensaios realizados.

3.3.2. Primeiro Ciclo Fermentativo

O primeiro ciclo fermentativo foi conduzido utilizando-se 150g de fermento de panificação Fleischman e 1350 ml de mosto a 15% de ART, preparado conforme o item 3.1.

Após 14 horas de fermentação em banho a 32°C, o material foi centrifugado a 19000 rpm (686xg). O fermento obtido foi transferido para erlenmeyer (1000 ml), onde recebeu os tratamentos descritos no item 3.3.3. (Fig. 1).

3.3.3. Tratamentos do Fermento

Os tratamentos aos quais foram submetidos o fermento proveniente do primeiro ciclo fermentativo, foram aplicados em esquema fatorial, cujos fatores são relacionados abaixo:

- diluições com água destilada às concentrações de 30 a 40% de massa celular (g de fermento úmido/100 g de suspensão).
- valores de pH (2,0; 2,5; 3,0), corrigidos com ácido sulfúrico.
- temperaturas ambientes (em torno de 25°C), 30 e 40°C (em banho).
- tempos de tratamento de 0, 1,5, 3 e 6 horas, contados a partir da correção do pH.

Uma vez que foram mantidas idênticas condições de laboratório, os fatoriais foram divididos de maneira a possibilitar a execução de todas as análises requeridas pelo experimento. Assim, foram realizados ensaios semanais, cujos tratamentos correspondentes constaram de uma temperatura, uma porcentagem de diluição do fermento, um valor de pH e fixando-se os tempos de tratamento (0; 1,5; 3 e 6h).

Os fatoriais aplicados, correspondentes a cada ensaio, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Tratamentos do fermento após o primeiro ciclo fermentativo.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tratamentos		
		pH	Concentração de células (g/100g)	Tempo (h)
1	ambiente (25°C)	2,0	30	0;1,5;3,6
2	ambiente (±25°C)	2,0	40	0;1,5;3,6
3	ambiente (±25°C)	2,5	30	0;1,5;3,6
4	ambiente (±25°C)	2,5	40	0;1,5;3,6
5	ambiente (±25°C)	3,0	30	0;1,5;3,6
6	ambiente (±25°C)	3,0	40	0;1,5;3,6
7	30°C	2,0	30	0;1,5;3,6
8	30°C	2,0	40	0;1,5;3,6
9	30°C	2,5	30	0;1,5;3,6
10	30°C	2,5	40	0;1,5;3,6
11	30°C	3,0	30	0;1,5;3,6
12	30°C	3,0	40	0;1,5;3,6
13	40°C	2,0	30	0;1,5;3,6
14	40°C	2,0	40	0;1,5;3,6
15	40°C	2,5	30	0;1,5;3,6
16	40°C	2,5	40	0;1,5;3,6
17	40°C	3,0	30	0;1,5;3,6
18	40°C	3,0	40	0;1,5;3,6

3.3.3.1. Análises do Fermento Durante o Tratamento

A cada tempo de tratamento (0; 1,5; 3 e 6h) foram tomadas amostras da suspensão de células para determinação dos teores de reserva de carboidratos (glicogênio e trealose), elementos minerais (nas células e água da suspensão) e número de células viáveis por mililitro de suspensão.

Da mesma forma, foram retirados volumes de suspensão equivalentes a 10 ml de fermento, o qual era utilizado numa segunda fermentação (Fig. 1).

3.3.3.1.1. Determinação dos Carboidratos de reserva

A determinação de glicogênio e trealose seguiu o mesmo procedimento descrito no item 3.2.1. Foram determinadas retas de matéria seca para as suspensões a 30 e 40% de fermento proveniente de uma primeira fermentação, simulando as mesmas condições dos ensaios.

3.3.3.1.2. Elementos Minerais do Fermento

As amostras de fermento e água ácida para as análises de minerais foram obtidas pela centrifugação de 45g de suspensão de fermento a 1900 rpm (686 x g).

Os teores de elementos minerais das amostras foram determinados conforme o item 3.2.2.

3.3.3.1.3. Determinação do Número de Células Viáveis

O número de células viáveis por mililitro de suspensão foi determinado pelo método da diluição em série, plaqueando-se as diluições equivalentes a 10^{-7} a 10^{-9} , em duplicatas (PELCZAR, 1981).

Foi utilizado o meio YEPD (Extrato de levedura - Peptona - Dextrose - Agar).

As placas foram incubadas em estufa a 30°C , por 36 horas e a contagem feita em contador de colônias EC. 550 - Phoenix.

3.3.4. Segundo Ciclo Fermentativo

Um segundo ciclo fermentativo foi realizado visando detectar influências dos tratamentos aplicados ao fermento sobre o desempenho do mesmo em fermentação ulterior.

A cada intervalo de tratamento, um volume de suspensão equivalente a 10 ml de fermento foi transferido para tubo de centrífuga, sendo submetido à centrifugação a $686 \times g$ por 15 minutos. O fermento remanescente, foi realimentado com 90 ml de mosto a 15% de ART e pH 4,5 (item 3.1).

Após 23 horas de fermentação, em banho a 32°C , foi feita a centrifugação do material fermentado, separando-se o vinho no qual foram determinados: teor alcólico, pH, açúcares residuais (AR) e glicerol.

3.3.4.1. Determinação do AR no vinho

As análises das concentrações de açúcares residuais (g/100 ml) foram realizadas pelo método de Somogyi e Nelson, adaptado por AMORIM *et alii* (1982).

3.3.4.2. pH do Vinho

O pH do vinho delevurado foi medido em pH metro digital.

3.3.4.3. Teor Alcoólico do Vinho e Rendimento da Fermentação

A determinação do teor alcoólico do vinho delevurado foi realizada utilizando-se microdestilador Kjeldahl adaptado para álcool e densímetro digital da ANTON-PAAR.

A leitura da solução hidroalcoólica, resultante da destilação do vinho, foi convertida em valores de porcentagem de álcool (v/v) através da tabela apropriada.

Uma vez conhecidos os parâmetros: teor de ART do mosto; teor alcoólico do vinho; volume total do material fermentado (fermento + vinho); teor alcoólico no fermento no início da fermentação, e considerado o rendimento teórico (100 kg de ART produzem no máximo 64,75 l de álcool 100% puro, a 20°C), foram calculados os rendimentos das fermentações em função dos tratamentos prévios do fermento.

3.3.4.4. Determinação do Glicerol

Segundo BASSO (1987)* a metodologia consiste na oxidação do glicerol com metaperiodato, liberando formaldeído, o qual é subsequentemente condensado com acetil acetona e amônia, formando um complexo colorido com pico de absorção em 420 nm.

3.4. Delineamento Estatístico

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios foi realizada segundo o modelo matemático para experimentos fatoriais descrito por GOMES (1985).

O esquema utilizado para a análise de variância é mostrado na Tabela 5.

A comparação entre médias foi feita através do teste de Tukey ao nível de significância correspondente aos valores de $\alpha = 0,01$ e $\alpha = 0,05$.

As regressões foram avaliadas tendo como limite as equações polinomiais do 3º grau.

As análises de variância e comparações entre médias foram realizadas pelo "Sistema de Análise Estatística (SANEST)" pertencente ao Centro de Informática na Agricultura, ESALQ-Piracicaba, S.P. As análises de regressão e

* BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Depto. de Química, Setor Bioquímica, Piracicaba, SP).

confeção dos gráficos foram feitas em microcomputador MICRO TEC XT 2002, pertencente à Fermentec Ltda., Assessoria em Fermentação Alcoólica, Piracicaba, S.P.

Tabela 5. Esquema de análise de variância para o delineamento fatorial.

Causa de Variação	GL	SQ	QM	F
Temperatura (Temp.)	2			
pH (pH)	2			
Concentração da suspensão de células (% Cel.)	1			
Tempo de tratamento (I.T.)	2			
Temp. x pH	4			
Temp. x %Cel.	2			
Temp. x I.T.	4			
pH x %Cel.	2			
pH x I.T.	4			
%Cel. x I.T.	2			
Temp. x pH x %Cel.	4			
Temp. x pH x I.T.	3			
pH x %Cel. x I.T.	4			
Temp. x pH x %Cel. x I.T.	8			
Resíduo	58			

- Todos os resultados analisados foram obtidos em ensaios em duplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos dos tratamentos sobre a elevação do pH da suspensão de células

Na Tabela 35 (Apêndice) são mostrados os valores de pH da suspensão de células, medidos ao longo do período de tratamento.

A análise de variância (Tabela 16 - Apêndice) indicou influência significativa do fator "temperatura" sobre a elevação do pH da suspensão de células ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F. A influência do fator "tempo de tratamento" sobre o pH da suspensão mostrou-se significativa ao nível de 1% de probabilidade.

As interações fatoriais não exerceram efeito estatisticamente significativo sobre o pH da suspensão de leguminosas, conforme mostrado na Tabela 16 (Apêndice).

A comparação entre médias feitas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, revelou que a elevação do pH da suspensão é significativamente mais acentuada quando esta é mantida à temperatura de 40°C do que quando mantida à temperatura ambiente (em torno de 25°C) (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação entre os valores médios de pH da suspensão de células medidos durante o tratamento.

Fatores	Níveis	Médias
Temperatura (° C)	ambiente (± 25°C)	2,95 a ₁
	30	3,03 a ₁ b ₁
	40	3,28 b ₁
% Células	30	3,05 a ₂
	40	3,12 a ₂
Tempo de tratamento	0	2,52 A ₃
	1,5	3,11 B ₃
	3	3,24 B ₃
	6	3,47 B ₃
DMS 5%:	Temperatura:	0,32
	% Células:	0,22
DMS 1%:	I.T.:	0,50

- Médias seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si ao nível de significância de 5%.
- Médias seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si ao nível de significância de 1%.

Foi constatado também pelo mesmo teste, ao nível de significância de 1%, que o valor do pH no tempo zero de tratamento foi significativamente menor em relação àqueles medidos nos demais tempos de tratamento (1,5; 3 e 6 horas), os quais não diferiram entre si (Tabela 6).

4.2. Efeito dos tratamentos sobre o número de células vivas por mililitro de suspensão

Os números de células vivas ($\times 10^8$) por mililitro de suspensão, em função dos tratamentos, estão expostos na Tabela 36 (Apêndice).

A análise de variância, através do teste F, ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 17), revelou influência significativa dos fatores "temperatura, pH e concentração da suspensão de células (%Cel) e tempo de tratamento (I.T.)" sobre o número de células vivas por ml de suspensão.

As interações fatoriais "temperatura x pH" e "temperatura x pH x células" foram significativas ao nível de 1% de probabilidade, de acordo com o teste F conforme mostrado na Tabela 17 (Apêndice).

O teste de Tukey ao nível de significância de 1%, aplicado para a comparação entre médias (Tabela 7), evidenciou maior número de células vivas por ml, nas suspensões mantidas a 40°C em relação àquelas mantidas à temperatura am-

Tabela 7. Comparação entre médias dos números de células vivas (10^8) por mililitro de suspensão, dentro de cada fator aplicado no tratamento.

Fatores	Níveis	Médias (10^8)
Temperatura	ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$)	30,92 A_1
	30	31,46 A_1B_1
	40	33,83 B_1
pH	2,0	31,67 A_2B_2
	2,5	30,79 A_2
	3,0	33,76 B_2
% Células	30	27,79 A_3
	40	36,44 B_3
Tempo de tratamento	0	34,44 A_4
	1,5	32,11 A_4B_4
	3	31,61 A_4B_4
	6	30,11 B_4
DMS 1%: temp. e pH = 2,35		
%Cel. = 1,59		
I.T. = 3,02		

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 1% de significância.

biente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os números médios de células vivas entre as suspensões mantidas a 30°C e aquelas mantidas a 40 e $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Conforme mostrado na Tabela 7, o teste de Tukey ao nível de significância de 1%, detectou diferença significativa entre as médias dos números de células vivas das suspensões tratadas a pH 3,0 e 2,5, sendo a menor média referente a este último valor de pH.

O teste de Tukey ao nível de significância de 1%, aplicado para comparar as médias de células vivas/ml dentro do fator "concentração da suspensão de células", acusou maior número médio de células vivas, quando a concentração de células da suspensão (g massa celular úmida/100g suspensão) foi de 40% (Tabela 7).

Sob esse último aspecto, deve ser considerada que sendo mais concentrada, a suspensão de 40% consequentemente apresentaria maior número de células vivas ou mortas por mililitro. Quando o número médio de células vivas a 40%, é corrigido para 30% (multiplicando-se o valor médio por 0,75), não se obtém diferença significativa entre os números médios de células vivas das duas concentrações.

As médias dos números de células vivas, dentro do fator tempo de tratamento, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, evidenciaram maiores números de células vivas no tempo zero de tratamento em relação ao tempo 6 horas. Tal resultado indicou que houve de-

crêscimo significativo no número de células vivas da suspensão, durante o período de 6 horas de tratamento (Tabela 7).

4.3. Influência dos tratamentos sobre os elementos minerais na levedura e na água da suspensão

Nas Tabelas de 37 a 42 (Apêndice), encontram-se os teores de elementos minerais (P, K, N, Mg, Ca, Zn) determinados na matéria seca da levedura e na água de suspensão, em função dos tratamentos aplicados.

Em razão dos valores obtidos para os teores minerais, apresentarem-se bastante variados durante os ensaios, foi realizada a transformação dos mesmos em porcentagem em função dos teores de minerais obtidos no tempo zero de cada tratamento aos quais estes dados se referiram.

As análises de variância para os elementos minerais são apresentados considerando os níveis de significância para os valores de F, de 5% e 1%. Para o teste de Tukey, utilizado na comparação entre médias, foram considerados apenas as significâncias correspondentes a valor de $\alpha = 0,01$, em virtude da grande variabilidade dos dados.

4.3.1. Fósforo

A influência dos tratamentos sobre o teor de

fósforo da levedura foi demonstrada pela análise de variância da Tabela 18. Os efeitos da temperatura e pH mostraram-se significativos ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

O efeito da concentração da suspensão de células (%Cel.) sobre a proporção de fósforo na levedura, através da mesma análise, foi significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A interação dupla "pH x células" foi significativa ao nível de 1% de probabilidade, enquanto que a interação tripla "temperatura x pH x células" foi significativa ao nível de 5%, conforme indicado pela análise de variância pelo teste F (Tabela 18 - Apêndice).

Os efeitos dos fatores temperatura, tempo de tratamento e concentração da suspensão de células, sobre o teor de fósforo na água da suspensão, mostraram-se altamente significativos, segundo a análise de variância (Tabela 19 - Apêndice). Pode ser observado ainda, por esta análise, que as interações fatoriais foram altamente significativas.

A comparação entre médias feita através do teste de Tukey ao nível de 1% de significância, indicou que maiores teores de fósforo são detectados na água da suspensão quanto mais elevados forem as temperaturas dos tratamentos. Assim, foi obtida a seguinte ordem para as temperaturas, em função dos teores de fósforo na água das suspensões: $40^{\circ}\text{C} > 30^{\circ}\text{C} > \pm 25^{\circ}\text{C}$ (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação entre médias para a variável fósforo na levedura e para a variável fósforo na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos. Os dados correspondem as porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		P na levedura	P na água
Ambiente			
Temperatura (°C)	(± 25°C)	108,81 a ₁	59,02 A ₅
	30	94,43 b ₁	94,14 B ₅
	40	95,71 a ₁ b ₁	106,58 C ₅
pH	2,0	91,89 a ₂	79,72 A ₆
	2,5	99,84 a ₂ b ₂	85,31 B ₆
	3,0	104,16 b ₂	94,71 C ₆
Concentração de células(%)	30	103,64 A ₃	67,96 A ₇
	40	93,66 B ₃	105,20 B ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	97,35 A ₄	76,65 A ₈
	0 - 3,0	98,36 A ₄	84,79 B ₈
	0 - 6,0	100,25 A ₄	98,30 C ₈

DMS 1% para fatores com 3 níveis:
 variável P na levedura = 13,22
 variável P na água = 4,14

DMS 1% para fatores com 2 níveis:
 variável P na levedura = 9,47
 variável P na água = 2,97

DMS 5% para fatores com 3 níveis:
 variável P na levedura = 10,49

- Médias seguidas por letras maiúsculas distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.
- Médias seguidas por letras minúsculas distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

O mesmo teste revelou que os teores médios de fósforo na água, em função do pH, encontram-se na seqüência $\text{pH } 3,0 > \text{pH } 2,5 > \text{pH } 2,0$.

Embora não tenham sido obtidas diferenças significativas entre as médias das proporções de fósforo na levedura, em função do pH do tratamento, ao nível de 1% de significância pelo teste de Tukey, a aplicação da equação de regressão do primeiro grau levou à obtenção da reta que representa o comportamento do fósforo na levedura, em função da elevação do pH do meio (ΔpH) a qual é mostrada na Figura 2.

As proporções médias de fósforo detectadas na levedura, em função do efeito das concentrações das suspensões de células pertinentes aos tratamentos, foram comparados pela aplicação do teste de Tukey ao nível de significância de 1% (Tabela 8). Estatisticamente, o teor de fósforo nas células, cujos tratamentos corresponderam à concentração de 30% de células, foi significativamente maior do que naquelas testadas à concentração de 40%.

Na água da suspensão, o teste de Tukey, ao nível de 1% de significância, constatou maior teor de fósforo a 40% do que a 30%.

4.3.2. Nitrogênio

A Tabela 20 (Apêndice) mostra a análise de va

Figura 2. Relação entre as porcentagens de fósforo nas leveduras e a elevação do pH (Δ pH) da suspensão durante os tratamentos.

riância para os teores de nitrogênio na levedura, feita através do teste F. Como pode ser observado, os fatores temperatura, pH e concentração da suspensão de células, exerceram influência significativa ao nível de 1% de probabilidade sobre o teor de nitrogênio das células.

Todas as interações fatoriais, exceto a interação "%Células x Intervalo de Tempo", mostraram-se significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O fator "Intervalo de tempo de tratamento" não apresentou efeito estatisticamente significativo quando analisado isoladamente, porém, seu efeito torna-se significativo quando combinado a outros fatores, conforme revelado pela análise de variância para as interações (Tabela 20 - Apêndice).

A análise de variância, através do teste F, ao nível de 1% de probabilidade, indicou que as quantidades de nitrogênio determinadas na água das suspensões de células foram influenciadas pela temperatura, pH, concentração da suspensão de células (%) e intervalo de tempo dos tratamentos (I.T.). Da mesma forma, todas as interações fatoriais foram significativas ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 21 - Apêndice).

As médias dos teores de nitrogênio na levedura, comparados pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância, evidenciaram maiores teores médios desse elemento nas células tratadas à temperaturas de 30° e 40°C, em re-

lação àquelas tratadas à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) (Tabela 9).

Os teores médios de nitrogênio na água, também comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, apresentaram a seguinte ordem decrescente em função da temperatura do tratamento: teor de N a $40^{\circ} >$ teor N a $\pm 25^{\circ} >$ teor de N a 30° (Tabela 9).

O teste de Tukey ao nível de 1% de significância, aplicado para a comparação entre as médias das quantidades de nitrogênio na levedura, em função do pH do tratamento, indicou que maiores quantidades desse elemento são observadas nas células tratadas a pH 3,0 do que naquelas tratadas a pH 2,0. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os teores de nitrogênio nas células tratadas a pH 3,0 e 2,5 e entre aquelas tratadas a pH 2,5 e 2,0.

Na água da suspensão, o teste de Tukey ao nível de 1% de significância, dispôs os teores médios de nitrogênio na seguinte ordem decrescente em função do pH dos tratamentos: pH 2,5 $>$ pH 2,0 $>$ pH 3,0.

Ainda pelo teste de Tukey, ao mesmo nível de significância, foram comparadas as médias dos teores de nitrogênio das leveduras tratadas em concentrações de 30 e 40% (g massa celular úmida/100g de solução). O resultado obtido evidenciou maior teor de nitrogênio nas células tratadas em concentração de 30%.

O mesmo teste indicou o inverso para o teor

Tabela 9. Comparação entre médias para a variável nitrogênio na levedura para a variável nitrogênio na água, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		N na levedura	N na água
Temperatura (°C)	Ambiente (± 25°C)	98,01 A ₁	160,16 A ₅
	30	101,45 B ₁	152,08 B ₅
	40	100,50 B ₁	171,94 C ₅
pH	2,0	98,92 A ₂	162,84 A ₆
	2,5	100,19 A ₂ B ₂	176,28 B ₆
	3,0	100,86 B ₂	145,08 C ₆
Concentração da suspensão(%)	30	101,64 A ₃	130,54 A ₇
	40	98,34 B ₃	192,26 B ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	99,81 A ₄	140,71 A ₈
	0 - 3,0	100,04 A ₄	159,99 B ₈
	0 - 6,0	100,11 A ₄	183,49 C ₈

DMS 1% para fatores com 3 níveis:
 variável N na levedura = 1,82
 variável N na água = 5,44

DMS 1% para fatores com 2 níveis:
 variável N na levedura = 1,31
 variável N na água = 3,90

- Médias seguidas por letras distintas diferem ao nível de significância de 1%.

de nitrogênio na água da suspensão ou seja, maior teor médio ocorreu na água das suspensões à concentração de 40% (Tabela 9).

Com relação ao efeito do tempo de tratamento sobre o teor de nitrogênio na água da suspensão, o teste de Tukey ao nível de 1% de significância, revelou que maior quantidade de nitrogênio é detectada na água, quanto maior for o tempo de tratamento (Tabela 9).

4.3.3. Potássio

De acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 22 (Apêndice), os efeitos dos fatores temperatura, pH, concentração da suspensão de células (%Cel.) e intervalo de tempo de tratamento (I.T.), sobre o teor de potássio na levedura, foram significativos ao nível de 1% de probabilidade de pelo teste F.

Foi obtida também, através da análise de variância, significância ao nível de 1% de probabilidade para todas as interações fatoriais, exceto para as interações "temperatura x Intervalo de tempo" e "pH x %células x Intervalo de tempo".

A Tabela 23 mostra a análise de variância para os teores de potássio na água da suspensão, os quais mostram-se altamente influenciados pela temperatura, pH e intervalos de tempo, aplicados nos tratamentos.

Como pode ser observado, a concentração da suspensão não mostrou efeito significativo sobre o conteúdo de potássio na água da suspensão, quando analisado isoladamente, porém seu efeito demonstrou ser altamente significativo quando interado a outros fatores.

O teste de Tukey, aplicado para comparação entre as médias dos teores de potássio na levedura, em função da temperatura dos tratamentos, constatou, ao nível de 1% de significância, que a maior média desse elemento correspondeu às células tratadas à temperatura ambiente (em torno de 25°C). As leveduras tratadas a 30°C e 40°C não diferiram entre si quanto ao teor de potássio (Tabela 10).

A proporção média de potássio determinado na água das suspensões, em função da temperatura, foi significativamente superior à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) em relação a 30°C. conforme revelado pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1% (Tabela 10).

As médias dos teores de potássio nas leveduras, em função do pH, foram comparados pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 1%, o qual determinou que as proporções desse elemento nas células são menores quanto mais baixo for o pH inicial do tratamento (Tabela 10).

O mesmo teste, aplicado para comparar as médias das proporções de potássio na água da suspensão em função do pH, detectou maior teor médio do elemento na água das suspensões tratadas a pH 2,5. Os teores médios de potássio

Tabela 10. Comparação entre médias para a variável potássio na levedura e para a variável potássio na água, dentro de cada fator aplicado no tratamento. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		K na levedura	K na água
Temperatura (°C)	Ambiente (± 25°C)	98,71 A ₁	196,71 A ₅
	30	89,09 B ₁	185,97 B ₅
	40	86,21 B ₁	190,33 A ₅ B ₅
pH	2,0	86,69 A ₂	190,80 A ₆
	2,5	90,51 B ₂	198,09 B ₆
	3,0	96,81 C ₂	184,12 A ₆
Concentração da suspensão (%Cel)	30	89,91 A ₃	190,30 A ₇
	40	92,77 B ₃	191,70 A ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	92,59 A ₄	179,29 A ₈
	0 - 3,0	93,10 A ₄	192,80 B ₈
	0 - 6,0	88,32 B ₄	200,91 C ₈

DMS 1% para os fatores com 3 níveis:
 variável K na levedura = 3,70
 variável K na água = 7,15

DMS 1% para o fator com 2 níveis:
 variável N na levedura = 2,65
 variável K na água = 5,13

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

na água das suspensões tratadas a pH 2,0 e 3,0 não diferiram entre si (Tabela 10).

A comparação entre os teores médios de potássio na levedura, em função da concentração em que estas foram mantidas durante os tratamentos, permitiu constatar que quando em maior concentração na suspensão (40%), as células apresentaram maior quantidade de potássio do que quando mantidas em menor concentração (30%) (Tabela 10).

O teste de Tukey, ao nível de significância de 1%, evidenciou maior quantidade de potássio nas leveduras tratadas por 1,5 e 3 horas, em relação àquelas tratadas por 6 horas, enquanto que na água da suspensão, o mesmo teste indicou aumento crescente no teor do elemento, ao longo das 6 horas de tratamento (Tabela 10).

4.3.4. Magnésio

Na Tabela 24 (Apêndice) é apresentada a análise de variância para o teor de magnésio na levedura, feita através do teste F. De acordo com os resultados obtidos, os fatores "temperatura e concentração da suspensão de células (%Cel.)" exerceram influência significativa ao nível de 1% de probabilidade sobre o conteúdo de magnésio das células. Os fatores "pH e tempo de tratamento", segundo a mesma análise, não atuaram significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, sobre o magnésio das leveduras.

Das interações fatoriais obtidas, apenas as interações "temperatura x pH" e "pH x % células, mostraram-se significativas ao nível de 1% de probabilidade. A interação "temperatura x %Células" foi significativa ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 25 - Apêndice).

Note-se que o efeito do pH sobre o teor de magnésio da levedura, apesar de não ter se apresentado significativo quando analisado isoladamente, torna-se estatisticamente significativo quando combinado à temperatura ou à concentração de células.

Entretanto, quando se analisou o teor magnésio na água da suspensão de células, pelo teste F, detectou-se efeito significativo dos fatores "temperatura" e "pH", ao nível de 1% de probabilidade. Não foram detectados influências dos fatores "concentração da suspensão de células" e "tempo de tratamento" sobre o conteúdo de magnésio da água ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 25 - Apêndice).

Na Tabela 26 (Apêndice) pode ser observado ainda, que todas as interações fatoriais (exceto as interações duplas envolvendo o fator "tempo de tratamento" - e a interação quádrupla) foram significativas ao nível de 1% de probabilidade, pelo teste F, sobre o teor de magnésio na água da suspensão.

As médias mostradas na Tabela 11 e comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, evidenciaram que o teor médio de magnésio nas células foi

Tabela 11. Comparação entre médias para as variáveis magnésio na levedura e na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		Mg na levedura	Mg na água
	Ambiente		
Temperatura (°C)	(± 25°C)	108,30 A ₁ B ₁	138,06 A ₅ B ₅
	30	99,01 A ₁	143,66 A ₅
	40	121,32 B ₁	130,30 B ₅
pH	2,0	102,32 A ₂	155,00 A ₆
	2,5	113,57 A ₂	127,87 B ₆
	3,0	112,74 A ₂	129,15 B ₆
Concentração da suspensão(%Cel)	30	102,31 A ₃	134,85 A ₇
	40	116,74 B ₃	139,83 A ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	108,10 A ₄	136,42 A ₈
	0 - 3,0	111,25 A ₄	137,21 A ₈
	0 - 6,0	109,28 A ₄	138,39 A ₈

DMS 1% para os fatores com 3 níveis:
 variável Mg na levedura = 18,68
 variável Mg na água = 12,12

DMS 1% para o fator com 2 níveis:
 variável Mg na levedura = 13,39
 variável Mg na água = 8,69

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

significativamente maior quando a temperatura do tratamento foi 40°C do que quando essa temperatura foi 30°C. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os teores médios de magnésio das leveduras tratadas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e aquelas tratadas a 40°C ou 30°C.

O mesmo teste aplicado para comparar as médias dos teores de magnésio na água da suspensão revelou maior proporção do elemento na água a 30°C do que a 40°C, não sendo observadas diferenças significativas entre os conteúdos de magnésio na água das suspensões à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e aquelas tratadas a 30°C e 40°C.

Comparando-se as médias dos teores de magnésio na água da suspensão de células, em função dos valores de pH aplicados no tratamento, através do teste de Tukey ao nível de significância de 1%, constatou-se que o maior teor médio do elemento na água correspondeu aos tratamentos a pH 2,0. Os teores de magnésio na água das suspensões tratadas a pH 2,5 e 3,0 não diferiram entre si (Tabela 11).

Leveduras tratadas em suspensões a 40% de células (g massa celular úmida/100g suspensão), segundo o teste de Tukey ao nível de 1% de significância, apresentam maior quantidade de magnésio em relação às aquelas tratadas à concentração de 30% (Tabela 11).

4.3.5. Cálcio

A análise de variância feita através do teste F (Tabela 26 - Apêndice) indicou efeito significativo da temperatura e do pH sobre o teor de cálcio das células, ao nível de 1% de probabilidade. Não foram observadas influências estatisticamente significativas dos fatores "concentração da suspensão de células (%Cel.)" e "Intervalo de tempo de tratamento (I.T.)", sobre o conteúdo de cálcio das células, pela aplicação do teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Entre as interações fatoriais, apenas as interações "temperatura x %Células", "pH x %Células" e "temperatura x pH x %Células" foram significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. A interação "temperatura x pH" foi significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo mesmo teste (Tabela 27 - Apêndice).

Através desses resultados pode-se inferir que o efeito da concentração da suspensão sobre o teor de cálcio das células só se manifesta quando combinado com outros fatores do tratamento.

O teor de cálcio na água da suspensão mostrou-se influenciado pela temperatura, pH e concentração da suspensão de células (%Cel), segundo a análise de variância realizada através do teste F ao nível de 1% de probabilidade. O fator "Intervalo de tempo do tratamento (I.T.)" não se mostrou

significativo quanto à influência sobre o conteúdo de cálcio na água da suspensão, ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 27 - Apêndice).

As interações fatoriais significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F de acordo com a análise de variância para teor de cálcio na água (Tabela 28 - Apêndice), foram: "temperatura x pH", "temperatura x %Células", "pH x %Células", "%Células x Intervalo de Tempo" e "temperatura x pH x %Células".

A comparação entre as médias das proporções do elemento cálcio nas leveduras tratadas sob diferentes temperaturas, realizada pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância é mostrada na Tabela 12. Conforme pode ser visto pelos resultados obtidos, o teor médio de cálcio nas células foi decrescente na seguinte ordem, de acordo com a temperatura do tratamento: teor de Ca a 40°C > teor de Ca a $\pm 25^\circ\text{C}$ > teor de Ca a 30°C.

Os teores médios de cálcio na água da suspensão de células, segundo o mesmo teste, foram significativamente maiores quando as suspensões foram mantidas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) ou a 30°C, do que a 40°C.

O teste de Tukey, ao nível de 1% de significância, revelou que o conteúdo de cálcio das leveduras foi significativamente maior quando estas foram submetidas a tratamentos a pH 2,0 em relação às aquelas tratadas a pH 3,0, conforme pode ser observado pelas médias apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12. Comparação entre médias para a variável cálcio na levedura e para a variável cálcio na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		Ca na levedura	Ca na água
	Ambiente		
Temperatura (°C)	(± 25°C)	90,94 A ₁	157,60 A ₅
	30	60,12 B ₁	147,95 A ₅
	40	110,99 C ₁	129,80 B ₅
pH	2,0	96,53 A ₂	155,41 A ₆
	2,5	84,84 A ₂ B ₂	152,10 A ₆
	3,0	80,68 B ₂	127,85 B ₆
Concentração da suspensão (%Cel)	30	85,84 A ₃	139,34 A ₇
	40	88,87 A ₃	150,90 B ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	89,18 A ₄	139,30 A ₈
	0 - 3,0	89,58 A ₄	144,89 A ₈
	0 - 6,0	83,29 A ₄	151,16 A ₈

DMS 1% para fatores com 3 níveis:
 variável Ca na levedura = 12,85
 variável Ca na água = 15,12

DMS 1% para o fator com 2 níveis:
 variável Ca na levedura = 9,21
 variável Ca na água = 10,84

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

A variação do teor de cálcio das leveduras em função da elevação do pH da suspensão (ΔpH), durante o tratamento, encontra-se representada pela equação de regressão de primeiro grau e respectiva reta, apresentados na Figura 3. Note-se que o teor de cálcio nas células aumenta a medida que se eleva o pH da suspensão.

A aplicação do teste de Tukey para as médias de cálcio na água da suspensão, evidenciou que maiores quantidades desse elemento foram detectadas na água, quando os valores do pH dos tratamentos foram 2,0 e 2,5, conforme pode ser observado pelas médias apresentadas na Tabela 12.

Com relação ao efeito da concentração de células na suspensão sobre as proporções de cálcio determinadas na água, foi indicado pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância, que água proveniente de suspensões com maior concentração de células (40%), apresentaram maior teor desse elemento em relação àquelas provenientes de suspensões menos concentradas (30%) (Tabela 12).

4.3.6. Zinco

Na Tabela 28 (Apêndice) é apresentada a análise de variância para o teor de zinco na levedura. Como pode ser observado pelos resultados obtidos, as influências da temperatura e da concentração da suspensão de células (%Cel) foram significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo tes-

Figura 3. Relação entre os teores de cálcio das leveduras e a elevação do pH da suspensão durante os tratamentos.

te F, enquanto que o pH e Intervalo de tempo de tratamento não se apresentaram estatisticamente significativos pelo mesmo teste, ao nível de 5% de probabilidade.

Foi constatado também pela análise de variância (Tabela 28 - Apêndice), que as interações fatoriais "pH x %Células" e "temperatura x pH x %Células" exerceram influência altamente significativas sobre o conteúdo de zinco das leveduras.

A análise da variância para as proporções de zinco na água da suspensão, indicou efeitos altamente significativos da temperatura, pH e Intervalo de tempo de tratamento (I.T.) sobre esta variável, através do teste F (Tabela 29 - Apêndice).

A comparação entre médias das quantidades de zinco na levedura em função das temperaturas pertinentes aos tratamentos, feita através do teste de Tukey ao nível de significância de 1%, permitiu constatar que a aplicação dos tratamentos correspondentes às temperaturas ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) ou de 40°C , resultaram em maiores teores de zinco nas células do que os tratamentos a 30°C (Tabela 13).

Na água da suspensão, o teste de Tukey, ao nível de 1% de significância, detectou maiores teores médios de zinco referentes às temperaturas ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e 30°C em relação àqueles referentes a 40°C , conforme mostrado na Tabela 13.

São mostradas também na Tabela 13, as médias dos teores de zinco na água da suspensão, comparados entre si

Tabela 13. Comparação entre médias para a variável zinco na levedura e para a variável zinco na água da suspensão, dentro de cada fator aplicado nos tratamentos. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fatores	Níveis	Médias	
		Zn na levedura	Zn na água
	Ambiente		
Temperatura (°C)	(± 25°C)	96,37 A ₁	108,33 A ₅
	30	87,29 B ₁	111,79 A ₅
	40	99,78 A ₁	88,53 B ₅
pH	2,0	93,89 A ₂	122,08 A ₆
	2,5	94,19 A ₂	120,17 A ₆
	3,0	95,26 A ₂	66,40 B ₆
Concentração da suspensão (%Cel)	30	96,90 A ₃	103,36 A ₇
	40	92,06 B ₃	102,40 A ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	93,33 A ₄	96,85 A ₈
	0 - 3,0	95,22 A ₄	105,73 B ₈
	0 - 6,0	94,89 A ₄	106,07 B ₈

DMS 1% para os fatores com 3 níveis:

variável Zn na levedura = 5,95

variável Zn na água = 6,63

DMS 1% para o fator com 2 níveis:

variável Zn na levedura = 4,27

variável Zn na água = 4,77

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância, em função dos valores de pH do tratamento. De acordo com as diferenças obtidas entre as médias, constatou-se que os tratamentos a pH 2,0 e pH 2,5, corresponderam a maiores teores de zinco na água da suspensão do que os tratamentos a pH 3,0.

O teste de Tukey, aplicado ao nível de significância de 1%, para comparar os teores médios de zinco nas leveduras tratadas em suspensão de diferentes concentrações de células (30% a 40%), indicou maior teor do elemento nas células provenientes de suspensões cuja concentração foi 30% (Tabela 13).

Os teores médios de zinco detectados nas águas das suspensões em diferentes tempos de tratamento, comparados pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de significância, revelaram que ao tempo de tratamento de 1,5 h, estes teores são significativamente menores do que aqueles determinados após 3 e 6 horas de tratamento. Não foi obtida diferença estatisticamente significativas entre os teores de zinco determinados na água das suspensões após 3 e 6 horas de tratamento.

4.4. Influência dos tratamentos sobre os carboidratos de reserva (glicogênio e trealose) da levedura

Os teores de carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, determinados na levedura, em função dos

tratamentos aplicados às mesmas, são mostrados na Tabela 43 (Apêndice).

As análises de variância foram realizadas a partir dos dados transformados em porcentagem em relação àqueles valores obtidos no tempo zero dos tratamentos aos quais estes dados se referiram.

4.4.1. Trealose

A análise de variância mostrada na Tabela 30 (Apêndice) indicou influência altamente significativa dos fatores "temperatura", "pH" e "concentração da suspensão de células", sobre o conteúdo de trealose da levedura, através do teste F, ao nível de 1% de probabilidade.

O tempo de tratamento das leveduras não afetou significativamente o teor de trealose das mesmas, segundo o teste F ao nível de 5% de probabilidade.

Todas as interações fatoriais analisadas, exceto as interações "temperatura x %Células" e "%Células x Intervalo de Tempo" mostraram-se altamente significativas pelo teste F.

A comparação entre os teores médios de trealose das leveduras tratadas sob diferentes temperaturas, feita pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, revelou que o conteúdo do glicídeo foi significativamente maior nas células mantidas a 30°C do que naquelas mantidas a 40°C e $\pm 25^\circ\text{C}$, as quais não diferiram entre si (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação entre médias para a variável trealose e para a variável glicogênio na levedura, dentro de cada fator aplicado no tratamento. Os dados correspondem às porcentagens em relação aos valores obtidos no tempo zero de cada tratamento.

Fator	Níveis	Médias	
		Trealose	Glicogênio
Temperatura (°C)	Ambiente ($\pm$ 25°C)	75,80 A ₁	94,46 A ₅
	30	155,49 B ₁	88,64 A ₅
	40	79,52 A ₁	109,80 B ₅
pH	2,0	101,66 A ₂	98,52 a ₆ b ₆
	2,5	87,27 B ₂	101,69 a ₆
	3,0	121,88 C ₂	92,69 b ₆
Concentração da suspensão (%Cel)	30	95,74 A ₃	94,02 A ₇
	40	111,46 B ₃	101,25 B ₇
Intervalo de tempo (h)	0 - 1,5	104,97 A ₄	92,98 A ₈
	0 - 3,0	103,34 A ₄	98,52 A ₈
	0 - 6,0	102,50 A ₄	101,41 A ₈

DMS 1% para os fatores com 3 níveis:

variável trealose = 12,96

variável glicogênio = 9,44

DMS 5% para os fatores com 3 níveis:

variável glicogênio = 7,51

DMS 1% para o fator com 2 níveis:

variável trealose = 9,29

variável glicogênio = 6,79

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

Em função dos valores de pH do tratamento, o teste de Tukey aplicado ao nível de significância de 1%, constatou a seguinte disposição dos teores médios de trealose das leveduras: teor de trealose de células tratadas a pH 3,0 > teores de trealose tratadas a pH 2,0 > teor de trealose das células tratadas a pH 2,5.

Os teores médios de trealose, segundo o teste de Tukey ao nível de 1% de significância, foram superiores nas leveduras mantidas em maior concentração na suspensão (40%) durante os tratamentos, conforme pode ser observado pelas médias expostas na Tabela 14.

4.4.2. Glicogênio

Conforme revelado pela análise de variância pelo teste F (Tabela 31 - Apêndice), os efeitos da temperatura e concentração da suspensão de células (%Cel), sobre o conteúdo de glicogênio das leveduras, foram significativos ao nível de 1% de probabilidade. Os efeitos do tempo de tratamento e do pH mostraram-se significativos ao nível de 5% pelo mesmo teste.

Todas as interações fatoriais mostraram-se altamente significativas através do teste F, exceto a interação "%Células x Intervalo de Tempo", a qual foi significativa ao nível de 5% de probabilidade.

O teste de Tukey aplicado ao nível de 1% de

significância para comparação entre médias dos teores de glicogênio de leveduras submetidos a diferentes temperaturas, evidenciou maior conteúdo dessa reserva nas células tratadas a 40°C em relação às aquelas tratadas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e a 30°C, as quais não diferiram entre si (Tabela 14).

De acordo com a Tabela 14, o teste de Tukey ao nível de significância de 5%, detectou maior proporção de glicogênio nas leveduras tratadas a pH 2,5 em relação às aquelas tratadas a pH 3,0. Não foram obtidas diferenças significativas entre as médias referentes ao pH 2,0 e aquelas referentes ao pH 2,5 e ao pH 3,0.

A aplicação da análise de regressão até equações polinomiais de terceiro grau, determinou que o comportamento do glicogênio das células, em função da elevação do pH da suspensão durante o tratamento, pode ser representado pela equação de primeiro grau e respectiva reta apresentados na Figura 4.

Note-se que a elevação do pH da suspensão (ΔpH) é acompanhada pela redução do conteúdo de glicogênio das células.

A comparação entre o teor médio de glicogênio das leveduras em função da concentração de células em suspensão durante o tratamento, realizada pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, constatou que em concentração de 40%, as células apresentam maior conteúdo de glicogênio do que em concentrações de 30% (Tabela 14).

Figura 4. Relação entre os teores de glicogênio das leveduras e a elevação do pH da suspensão (ΔpH) durante os tratamentos.

4.5. Influências dos tratamentos aplicados às leveduras sobre a capacidade fermentativa das mesmas

A capacidade fermentativa das leveduras tratadas foi avaliada através do rendimento das fermentações, das porcentagens (g/100 ml) de açúcar residual dos vinhos após o término do ciclo fermentativo e pela produção de glicerol.

Os dados experimentais correspondentes a esses parâmetros são apresentados nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

As análises estatísticas destes dados foram realizadas através dos valores originais.

4.5.1. Açúcar redutor (AR) residual dos vinhos

A análise de variância pelo teste F evidenciou influências altamente significativas das temperaturas, dos valores de pH, das concentrações da suspensão de células (% Cel) e dos tempos de tratamento (T), aplicados nos tratamentos do fermento, sobre a porcentagem (g/100 ml) de AR dos vinhos das fermentações nos quais foram utilizados esse fermento tratado (Tabela 32).

A mesma análise mostrou que as interações fatoriais "temperatura x pH", "temperatura x %Células", "pH x %Células", "pH x tempo", "temperatura x pH x %Células" apresentaram influências altamente significativas sobre as porcentagens de AR do vinho.

As interações "temperatura x tempo" e "pH x %Células x tempo" apresentaram-se significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F (Tabela 32 - Apêndice).

As porcentagens médias de AR mostradas na Tabela 15 e comparados entre si pelo teste de Tukey ao nível de 1% de significância, evidenciaram que as proporções de AR obtidas nos vinhos após o término das fermentações, são maiores quanto mais altas forem as temperaturas aplicadas no tratamento prévio do fermento.

O teste de Tukey ao nível de 1% de significância, revelou também, que quanto mais alto o valor do pH aplicado no tratamento das leveduras, maiores porcentagens médias de AR são obtidas nos vinhos das fermentações realizadas a partir dessas células. Dessa forma, tem-se a seguinte ordem para as médias de AR dos vinhos em função do pH do tratamento do fermento: pH 3,0 > 2,5 > 2,0.

Ainda com relação ao pH do tratamento, a utilização da equação de regressão de primeiro grau levou à obtenção da reta que melhor representa o comportamento das porcentagens de AR dos vinhos, em função do valor de Δ pH (elevação do pH em relação ao valor inicial) no momento da tomada da amostra do fermento para a fermentação (Figura 5).

A comparação entre porcentagens médias de AR, em função da concentração de leveduras na suspensão durante o tratamento, através do teste de Tukey ao nível de 1% de significância, revelou que leveduras tratadas em concentrações

Figura 5. Relação entre as porcentagens de AR dos vinhos no final das fermentações e o ΔpH da suspensão, no momento da tomada das amostras de leveduras após o início das fermentações.

Tabela 15. Comparação entre médias para as variáveis AR, glicérol e rendimento das fermentações, dentro de cada fator aplicado no tratamento do fermento, antes do início do ciclo fermentativo.

Fatores	Níveis	AR (%)	Médias Glicérol (%)	Rend. (%)
Temperatura (°C)	Ambiente (± 25°C)	0,3545 A ₁	0,7484 A ₅	85,84 A ₉
	30	0,3719 B ₁	0,6773 B ₅	88,08 B ₉
	40	0,4434 C ₁	0,7738 A ₅	85,86 A ₉
pH	2,0	0,3670 A ₂	0,7194 A ₆	86,92 A ₁₀
	2,5	0,3939 B ₂	0,7452 B ₆	87,57 B ₁₀
	3,0	0,4089 C ₂	0,7348 C ₆	85,30 C ₁₀
Concentração da suspensão (%Cel)	30	0,3824 A ₃	0,7237 A ₇	86,48 A ₁₁
	40	0,3975 B ₃	0,7426 B ₇	86,71 A ₁₁
Tempo de tratamento (h)	0	0,3999 A ₄	0,7930 A ₈	85,40 A ₁₂
	1,5	0,3851 B ₄	0,7184 B ₈	87,10 B ₁₂
	3	0,3871 B ₄	0,7107 B ₈	87,07 B ₁₂
	6	0,3876 B ₄	0,7105 B ₈	86,61 B ₁₂

DMS 1% para os fatores com 3 níveis: AR = 5,5127
glicérol = 8,0677
Rend. = 0,32

DMS 1% para o fator com 2 níveis: AR = 3,9519
glicérol = 5,7914
Rend. = 0,23

DMS 1% para o fator com 4 níveis: AR = 6,8321
glicérol = 9,9984
Rend. = 0,4006

- Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 1%.

de 40% (g de massa celular úmida/100g de suspensão), proporcionam o término da fermentação com maior teor de açúcar redutor no vinho do que aquelas tratadas em concentração de 30% (Tabela 15).

As médias de AR comparadas dentro do fator "tempo de tratamento", através do teste de Tukey ao nível de 1% de significância, mostraram que as fermentações realizadas a partir de fermento obtido no tempo zero de tratamento, apresentam vinhos com maiores porcentagens de AR do que aquelas realizadas com fermentos tratados por 1,5, 3 ou 6 horas, os quais não diferiram entre si (Tabela 15).

4.5.2. Glicerol

De acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 33 (Apêndice), os fatores temperatura, pH, concentração da suspensão de células (%Cel) e tempo de tratamento (T) aplicados no tratamento das leveduras, influenciaram de maneira altamente significativa, a produção de glicerol por estas células, durante a fermentação subsequente ao tratamento.

Pela mesma análise, pode ser observada que todas as interações fatoriais, exceto a interação "%Células x Tempo", exerceram influências significativas, ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, sobre a produção de glicerol (Tabela 33 - Apêndice).

As porcentagens médias de glicerol dos vinhos resultantes das fermentações realizadas com fermentos tratados sob diferentes temperaturas, segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 1%, apresentaram-se na seguinte ordem decrescente, considerando as temperaturas dos tratamentos: $40^{\circ}\text{C} > \text{temperatura ambiente } (\pm 25^{\circ}\text{C}) > 30^{\circ}\text{C}$ (Tabela 15).

São apresentadas também na Tabela 15, as porcentagens médias de glicerol nos vinhos, comparados entre si através do teste de Tukey ao nível de significância de 1%, dentro do fator pH. A maior porcentagem média de glicerol foi determinada nos vinhos das fermentações realizados a partir de leveduras tratadas a pH 2,5, enquanto que a menor porcentagem foi atribuída às fermentações realizadas com leveduras tratadas a pH 2,0.

As médias de glicerol produzido durante a fermentação, pelas leveduras tratadas por diferentes intervalos de tempo, foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, o qual acusou maior produção de glicerol pelas células obtidas no tempo zero de tratamento. As produções médias de glicerol pelas leveduras tratadas por 1,5, 3 e 6 horas não diferiram entre si (Tabela 15).

4.5.3. Rendimento da fermentação

A análise de variância, pelo teste F (Tabela 34 - Apêndice) constatou influência significativa dos fato-

res temperatura, pH e tempo de tratamento, aplicados no tratamento das leveduras, sobre o rendimento das fermentações nas quais foram utilizadas estas células tratadas. A influência da concentração da suspensão de células (%Cel) foi significativa ao nível de 5% pelo mesmo teste.

As interações fatoriais duplas que não envolveram o fator tempo de tratamento (T), foram altamente significativas pelo teste F (Tabela 34 - Apêndice). Entre as demais interações (triplas e quádrupla), apenas a interação "pH x %Células x Tempo" não se mostraram significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

O teste de Tukey aplicado ao nível de significância de 1% evidenciou maior rendimento médio para as fermentações realizadas com leveduras tratadas a 30°C. As médias dos rendimentos referentes às fermentações realizadas com leveduras tratadas a 40°C e à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) não diferiram entre si (Tabela 15).

Os rendimentos médios apresentados na Tabela 15 e comparados entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 1%, dentro do fator pH, indicaram que maior rendimento médio foi obtido quando as leveduras utilizadas para a fermentação foram tratadas a pH 2,5. O menor rendimento médio foi obtido quando os tratamentos das leveduras corresponderam ao pH 3,0.

Na Tabela 15 encontram-se também os rendimentos médios comparados entre si em função do tempo de trata-

mento da levedura, através do teste de Tukey ao nível de significância de 1%. Pelo resultado obtido nota-se que as fermentações realizadas com fermentos obtidos no tempo zero apresentaram o menor rendimento médio. Os rendimentos médios correspondentes às fermentações nas quais foram utilizados fermentos tratados por 1,5, 3 e 6 horas não diferiram entre si.

4.6. Correlação entre as variáveis analisadas nos ensaios

Através da aplicação da análise de regressão obteve-se as equações e respectivas retas, as quais expressam a correlação entre as variáveis estudadas nos ensaios.

As análises de regressão foram realizadas utilizando-se todos os dados obtidos nos diversos ensaios, sendo mostradas apenas as correlações significativas ao nível de significância de 1%.

4.6.1. Relação entre elementos minerais e o conteúdo de carboidratos de reserva das leveduras

A correlação entre teores de fósforo e glicogênio das leveduras durante os ensaios está representado pela equação de regressão de primeiro e respectiva reta mostradas na Figura 6.

Figura 6. Relação entre as porcentagens de fósforo e teores de glicogênio das leveduras durante os tratamentos.

Uma correlação linear positiva foi observada também entre as proporções de fósforo e trealose da levedura, segundo a Figura 7.

A análise de regressão polinomial de primeiro grau para as variáveis cálcio e trealose das leveduras, resultou na reta referente à Figura 8, a qual evidencia uma correlação negativa entre estas variáveis.

4.6.3. Relação entre elementos minerais, carboidratos de reserva, glicerol e rendimento das fermentações

A Figura 9 mostra a reta obtida através da equação de regressão de primeiro grau utilizada para correlacionar as porcentagens (g/100 ml) de AR dos vinhos no final da fermentação, com o teor de fósforo do fermento no início da mesma.

Como pode ser constatado através da observação da reta, houve uma correlação positiva entre aqueles 2 parâmetros, indicando que leveduras com maiores teores de fósforo utilizam mais eficientemente o açúcar do mosto.

O comportamento do AR dos vinhos em função dos teores de glicogênio das leveduras no início da fermentação está representado pela equação de regressão de primeiro grau e respectiva ^{*}reta mostrados na Figura 10.

Figura 7. Relação entre as porcentagens de fósforo e os teores de trealose das leveduras durante os tratamentos.

Figura 8. Relação entre os teores de cálcio e trealose das leveduras durante os tratamentos.

Figura 9. Relação entre as porcentagens de AR dos vinhos no final das fermentações e as porcentagens de fósforo das leveduras no início das mesmas.

Através desta análise, pôde-se observar que maiores porcentagens de AR foram obtidas nos vinhos quando as fermentações foram realizadas a partir de fermento com baixo teor de glicogênio.

A variação da produção de glicerol pelas leveduras em função do teor de fósforo contido nas mesmas no início do ciclo fermentativo encontra-se representada pela equação de primeiro grau e pela reta obtida, apresentadas na Figura 11. Pela correlação negativa observada, pode-se inferir que maiores teores de fósforo nas células levam a menor produção de glicerol pelas mesmas.

A aplicação da análise de regressão permitiu ainda evidenciar a correlação positiva entre a porcentagem de glicerol no vinho e a porcentagem de potássio nas leveduras no início da fermentação (Figura 12).

Foi obtida uma correlação positiva entre as porcentagens de AR e glicerol dos vinhos, através da equação de regressão de primeiro grau, mostrada na Figura 13. Pela observação da reta obtida, torna possível a suposição de que as condições as quais levam à obtenção de maior quantidade de AR nos vinhos, também resultam em maior porcentagem de glicerol nos mesmos.

Os rendimentos das fermentações, segundo a equação de regressão de primeiro grau (Figura 14), aumenta linearmente em função do aumento das porcentagens de fósforo das leveduras no início da fermentação.

Figura 11. Relação entre as porcentagens de glicerol dos vinhos no final das fermentações e as porcentagens de fósforo das leveduras no início das mesmas.

Figura 12. Relação entre as porcentagens de glicerol dos vinhos no final das fermentações e as porcentagens de potássio das leveduras no início das mesmas.

Figura 13. Relação entre as porcentagens de glicerol e AR dos vinhos no final das fermentações.

As Figuras 15 e 16, mostram o comportamento dos rendimentos das fermentações em função das porcentagens de AR e glicerol dos vinhos. Note-se que o rendimento cai linearmente com o aumento dos teores de AR e glicerol dos vinhos.

Figura 15. Relação entre os rendimentos das fermentações e as porcentagens de AR dos vinhos.

Figura 16. Relação entre os rendimentos das fermentações e as porcentagens de glicerol dos vinhos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Número de células vivas por mililitro de suspensão

Através dos resultados obtidos (Tabela 7) observou-se que maior número médios de células vivas por mililitro foi obtido quando a suspensão foi mantida a 40°C.

A princípio, por ser esta a temperatura mais elevada, poder-se-ia supor uma possível evaporação da água ao longo do período de tratamento (6 horas) com conseqüente aumento da concentração da suspensão. Esta dúvida, no entanto foi sanada com a contagem dos números de células totais (vivas e mortas) por ml de suspensão, nos diferentes tempos referentes aos tratamentos. Os números obtidos não apresentaram variação significativa (dados não mostrados).

Embora a literatura classifique a temperatura de 40°C como a temperatura máxima de crescimento para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, seu efeito parece ser exercido principalmente em células sob condições de crescimento.

Em nossos ensaios, as leveduras foram mantidas em condições não proliferantes (jejum), fato que possivelmente reduziria o efeito danoso da alta temperatura sobre as células. Tal suposição é apoiada nos dados de LEWIS SKUIPER (1972) e de PARIS & PRINGLE (1983), os quais demonstram que leveduras mantidas sob jejum são mais resistentes ao calor do que aquelas em meio rico em nutrientes, sendo, portanto, a resistência ao calor, uma característica de células em repouso.

É considerado que leveduras crescidas sob anaerobiose ou semi-anaerobiose apresentam o fenômeno de adaptação respiratória quando transferidas para condições não proliferantes em presença de oxigênio (PANEK & MATOON, 1977, LILLIE & PRINGLE, 1980) às custas de consumo endógeno do glicogênio. Outros autores afirmam ainda, que o mecanismo de adaptação respiratória e o consumo de reserva através de metabolismo endógeno levam à queda mais rápida da viabilidade celular (WILSON & McLEOD (1976).

Considerando que temperatura de 40°C altera atividade enzimática e diminui atividade respiratória das leveduras (POURTER & OUGH, 1982), o maior teor de glicogênio obtido para as leveduras mantidas sob esta temperatura, e as

afirmações anteriores, pode-ser-ia admitir que os maiores números de células vivas obtidas a 40°C estaria possivelmente ligado ao menor consumo de reservas e menor requerimento de ATP apresentados pelas células cujo mecanismo de adaptação res-piratória fosse inibido.

A confirmação dessa suposição requer ensaios melhor elaborados com controle de aeração, medidas de metabolismo endógeno e atividade enzimática, parâmetros estes que fogem do objetivo de nosso experimento, no qual procuramos condições semelhantes às encontradas nos tratamentos dos fermentos nas indústrias.

Foi constatado também, pela análise estatística, que após 6 horas de tratamento ocorre redução significativa do número de células vivas por ml de suspensão. Essa queda na viabilidade ocorreu aquêm do tempo determinado por PÁCA (1981) para leveduras em jejum, o qual consistiu de 10 horas. No entanto, em nossos ensaios temos diferentes combinações de temperaturas e valores de pH que provavelmente acarretariam maiores danos nas células do que aquelas estudadas pelo autor.

Cabe ressaltar no entanto, que a análise estatatística foi realizada a partir das médias dos números de células vivas referentes à cada tratamento (Tabela 36 - Apêndice), fato que pode ter influenciado o resultado estatístico obtido.

5.2. Influência dos tratamentos sobre os teores de minerais das leveduras

Com relação aos dados experimentis obtidos deve ser salientado a grande variabilidade observada quanto os teores de elementos minerais na levedura (Tabelas 37 a 42 - Apêndice). Possivelmente tal variação é decorrente do método analítico empregado na determinação dos elementos, o qual permite variabilidade nos resultados acima de 10%, conforme evidenciado por ensaios realizados em nosso laboratório.

Apesar dos ensaios terem sido realizados semanalmente com fermentos comerciais provenientes de diferentes lotes e apresentando variação quanto a composição de minerais (Tabela 3), estes foram submetidos a uma primeira fermentação, com mostos de igual concentração de minerais, o que deveria proporcionar uma homogeneização quanto aos teores de minerais das células no final do ciclo fermentativo.

Os intervalos relativos às proporções dos elementos minerais determinados para as leveduras durante os ensaios, foram coerentes com os apresentados por HARRISON (1971) (Tabela 1), exceto para os elementos fósforo e nitrogênio, cujos valores obtidos estiveram um pouco abaixo dos determinados por aquele autor (Tabelas 37 a 42 - Apêndice).

Com relação aos elementos minerais da água da suspensão, considerou-se que o fermento, proveniente de mos-

to preparado de forma idêntica e centrifugado sempre a 686 x g, carregassem o mesmo teor de elementos minerais (resíduos do mosto). Desta forma, foi determinado um só resíduo de minerais, equivalente ao tempo zero de tratamento, para todos os ensaios, o qual foi considerado no momento das transformações dos dados para as análises estatísticas.

Porém, os resultados obtidos nas análises de minerais nas amostras de água, realizada no final dos experimentos, acusou certas incoerências entre valores dos resíduos e os valores referentes aos tempos de tratamentos. Em alguns casos, os valores determinados para os resíduos (tempo zero) foram maiores que os determinados para os tempos de tratamentos (1,5; 3 e 6 h).

Em decorrência desse fato, é com certa restrição que discutiremos os teores de minerais na água da suspensão e acreditamos que em alguns casos justifique as inconsistências observadas entre os teores de minerais na levedura e na água da suspensão, em função dos tratamentos.

Os dados experimentais submetidos à análise de variância pelo teste F e teste de Tukey, revelaram que as temperaturas aplicadas nos tratamentos das leveduras em suspensão afetaram todos os elementos minerais estudados nas células.

Embora as quantidades médias de fósforo na levedura em função da temperatura do tratamento, não tenham diferido entre si ao nível de significância de 1% pelo teste

de Tukey, do mesmo modo que os teores médios desse elemento na água da suspensão, é interessante observar que, os teores de fósforo nas leveduras e na água decrescem em sentidos opostos (Tabela 8) indicando provável liberação de fósforo pelas células.

Deve ser considerado que os dados foram expressos em porcentagem em relação aos teores obtidos no tempo zero de tratamento e que sendo a célula rica em fosfatos (1 a 2% do peso seco (HARRISON, 1971)) uma pequena quantidade de fosfato lixiviada durante os tratamentos não acarretaria variação significativa na proporção desse elemento na célula. O contrário seria observado na água da suspensão, a qual sendo pobre em fósforo no tempo zero, apresentaria variação significativa nas proporções do elemento nos demais tempos, mesmo que as quantidades liberadas pelas células fossem pequenas.

Por outro lado, cabe ressaltar que a determinação dos elementos minerais foi feita a partir de amostras de matéria seca de leveduras. Assim, uma possível lixiviação de outros elementos minerais pelas células durante os tratamentos em proporções maiores que as do fósforo, acarretaria um aumento proporcional desse elemento na matéria seca analisada.

Estas suposições parecem válidas se considerarmos os resultados obtidos para os teores de fósforo em função do tempo de tratamento (Tabela 8). Observe-se que os

teores de fósforo na levedura parecem aumentar com o aumento do tempo de tratamento, no entanto o teor desse elemento na água da suspensão aumenta significativamente ao longo das 6 horas de tratamento.

Através dos resultados da Tabela 8 e considerando as suposições anteriores, podemos inferir que as células liberam maiores quantidades de fósforo ao meio quanto mais altas forem as temperaturas do tratamento (maior liberação ocorreu a 40°C), sendo esta liberação, contínua ao longo do período de tratamento.

De acordo com o exposto por SUUMALAINEN & OURA (1971) a despeito da alta concentração de fosfatos das leveduras, apenas traços desses compostos são liberados ao meio quando estas são mantidas em suspensão em água. Esta afirmação argumenta a favor da nossa suposição anterior, com relação ao resultado não significativo obtido para as variações dos teores de fósforo das células em função dos tratamentos ao nível de 1%.

Uma análise da Figura 2, mostra que a elevação do pH da suspensão de células (ΔpH) é acompanhada da redução do teor de fósforo das células. Este resultado concorda com aqueles apresentados na Tabela 8, os quais apesar de não se apresentarem estatisticamente significativos, possivelmente pelas razões já discutidas, indicam maior quantidade de fósforo nas células tratadas a valores mais alto de pH. Note-se porém a discrepância entre estes resultados e aqueles obtidos para a água da suspensão.

Segundo SUOMALAINEN & OURA (1971), a presença de potássio nas células de levedura aumenta a capacidade tampão das mesmas, enquanto que o aumento do teor de fosfato leva à diminuição do pH intracelular. Desta forma, a presença de maior quantidade de potássio nas células permite maior absorção de fosfatos pelas mesmas.

Em nossos experimentos são aplicadas condições que levam à lixiviação de potássio celular e à provável redução do pH interno, por absorção de íons H^+ do meio. De acordo com SEASTON *et alii* (1956), o pH interno de leveduras mantidas a pH 4,5, cai de 6,2 para 5,7. Tais condições poderiam desencadear a perda de fosfato celular como um mecanismo para a manutenção do pH interno.

A análise estatística dos teores de potássio, indicou que os teores desse elemento na célula diminuem à medida que se eleva a temperatura do tratamento (menor teor a 40°C). Entretanto, este resultado não é coerente com o observado para os teores de potássio na água da suspensão, ou seja, as condições que levam à redução do teor de intracelular de potássio deveriam também provocar aumento do teor do elemento na água na suspensão, fato não observado pelos resultados obtidos.

A liberação de potássio pelas leveduras em suspensão, sob condições não proliferantes e a pH 3,5, segundo ROTHSTEIN & BRUCE (1958) é afetada pela temperatura, sendo menor em temperaturas mais baixas (5 ou 10°C) do que em temperaturas mais elevadas (25 ou 35°C).

Nossos resultados, mostrando que o teor de K nas células após os tratamentos à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) foi significativamente superior àqueles referentes às células tratados a 30 ou 40°C , parecem consistentes com a citação anterior. Porém, a discordância entre os teores de potássio nas leveduras e na água da suspensão, deixam em aberto esta questão.

Com relação ao efeito do pH do tratamento obteve-se concordância entre os teores de potássio nas leveduras na água da suspensão (exceto para o pH 2,0) conforme mostrado na Tabela 9.

Os dados experimentais analisados estatisticamente, mostraram que a pH 3, correspondendo ao maior valor de pH aplicado no tratamento, houve maior proporção de potássio nas células e menor proporção na água da suspensão, sugerindo que menor concentração de hidrogênio iônico no meio provoca menor perda de potássio pelas células.

A liberação de potássio pelas leveduras mantidas em condições não proliferantes e a pH baixo (menor que 6,0) tem sido observada por diversos pesquisadores, os quais afirmam que a liberação de K^+ celular é acompanhada pela absorção de H^+ do meio externo (CONWAY & DOWNEY, 1950; ROTHSTEIN & BRUCE, 1958; SEASTON, 1976).

A comparação entre os resultados apresentados nas Tabelas 6 e 10, revela uma concordância entre nossos experimentos e os dados de literatura. A elevação do pH da

suspensão de células e redução da porcentagem de K na levedura são mais intensas a 40°C sugerindo maior troca de K^+/H^+ . Por outro lado, maior redução do teor de potássio celular foi observado a valores mais baixos de pH (maior concentração de H^+).

Constatamos ainda, baseados nos resultados mostrados na Tabela 6, que a elevação do pH da suspensão foi mais intensa nos primeiros 90 minutos de tratamento, embora tenha havido elevação contínua do pH durante as 6 horas de tratamento (Tabela 35 - Apêndice). Esses dados podem ser indicativa de que a absorção de prótons pelas células após 90 minutos comece a ser diminuída, provavelmente em decorrência da diminuição do pH intracelular.

No entanto, conforme pode-se observar da Tabela 10, a lixiviação de potássio celular foi constante até 6 horas de tratamento, sugerindo uma possível perda de potássio independente do mecanismo de troca K^+/H^+ .

Outro aspecto a ser considerado é a liberação de potássio pelas leveduras em função da concentração da suspensão durante os tratamentos. A análise estatística indicou menor teor de potássio nas células em suspensão em concentração de 30% (g massa celular úmida/100 g suspensão) do que naquelas em concentrações de 40%. Entretanto os teores de potássio na água da suspensão não diferiram nas duas concentrações.

É interessante observar ainda, que o pH da suspensão não se mostrou influenciado pela concentração de células da mesma (Tabela 16 - Apêndice).

Estas observações sugerem possivelmente que, quando em menor concentração ocorra maior liberação de K^+ e maior absorção de H^+ por unidade celular. Desta forma, a maior redução do pH interno destas células, decorrentes da maior absorção de H^+ , poderia estar relacionado com os menores teores de fósforo e reservas de carboidratos (glicogênio e trealose) observadas nas leveduras tratadas em concentrações de 30% (Tabela 14).

Quando o tratamento das leveduras foi realizado à temperatura de 30°C, houve menor perda de nitrogênio pelas mesmas, conforme pode ser observado pelo maior teor de nitrogênio na levedura e menor teor na água da suspensão evidenciados pela análise estatística (Tabela 9). Entretanto, houve discordância entre os teores de nitrogênio na levedura e na água da suspensão à temperatura de 40°C.

Células tratadas a 40°C não diferiram, quanto ao teor de nitrogênio, daquelas tratadas à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) enquanto que o teor de nitrogênio na água da suspensão foi significativamente maior a 40°C do que a 25°C.

A divergência nos resultados pode ser explicada se considerarmos que a perda de nitrogênio pelas células é muito pequena em relação ao conteúdo do elemento na célula (Tabela 38 - Apêndice) e ainda, conforme visto anteriormente, a 40°C há maior perda de outros elementos minerais e provavelmente, de outras substâncias não determinadas, provocando assim, um aumento proporcional de nitrogênio na matéria seca, conforme já discutido para o elemento fósforo.

Esta hipótese nos parece provável quando analisamos os teores médios de nitrogênio em função do tempo de tratamento (Tabela 9). Observe-se que o teor de nitrogênio na célula não se altera durante as 6 horas de tratamento, embora haja aumento crescente do elemento na água da suspensão ao longo do período de tratamento.

Assim, podemos supor que as leveduras tendem a maior perda de nitrogênio quando mantidas em temperaturas acima (40°C) ou abaixo ($\pm 25^\circ\text{C}$) daquela considerada ótima para o crescimento da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Tem sido observado por alguns pesquisadores, que quando as células de leveduras são mantidas sob temperatura acima da ótima, estas liberam aminoácidos hidrofóbicos que atuam como "termoprotetores", estabilizando a membrana e aumentando a resistência das células ao calor. Em consequência desse fato, quando as células encontram-se em maior concentração, há aumento dos níveis desses aminoácidos no meio, conferindo maior termotolerância às células (SLAPACK, 1987).

É provável que o maior teor de nitrogênio observado em nossos ensaios, na água da suspensão de leveduras tratadas a 40°C seja proveniente desses aminoácidos. Porém, a razão pela qual há maior liberação também a $\pm 25^\circ\text{C}$ do que a 30°C nos parece obscura.

A análise da Tabela 9 permite evidenciar ainda, que as leveduras lixiviam mais nitrogênio quando mantidos a pH mais baixo e quando em maior concentração (a 40% g massa celular úmida/100g suspensão).

Deve ser considerado no entanto, que a quantidade de nitrogênio liberada, apesar de ter sido indicada como significativa em função dos tratamentos pela análise estatística, foi muito pequena, o que nos parece irrelevante se considerarmos o teor total de nitrogênio celular (Tabela 38-Apêndice).

Através da observação da Tabela 11, concluiu-se que o tratamento das leveduras não provocou perda significativa de magnésio pelas mesmas. Uma vez sendo o tempo zero de tratamento considerado 100%, as médias para os demais intervalos de tempo (1,5 h; 3 e 6 horas) apresentaram-se acima desse valor. Este resultado pode ser interpretado com o aumento na proporção de magnésio na matéria seca da levedura, em virtude da liberação de outras substâncias, conforme já discutido anteriormente.

As médias determinadas para os teores de magnésio na água na suspensão em função dos tratamentos (Tabela 11) indicaram que, embora em pequena quantidade, houve maior liberação desse elemento a 30°C e a pH 2,0.

As médias dos teores de cálcio comparadas pelo teste de Tukey (Tabela 12) indicaram que este elemento é liberado pelas leveduras em maior quantidade, à temperatura de 30°C e a pH 3,0. Não houve diferença entre as médias dos teores de cálcio nos diferentes intervalos de tempo, indicando que os efeitos dos tratamentos sobre o cálcio das células é exercido nos primeiros 90 minutos.

Segundo ROTHSTEIN & HAYES (1956) a membrana de células de leveduras em condições não proliferantes são impermeáveis aos cátions Ca^{+2} e Mn^{+2} . Porém, apesar de não haver troca de cátions bivalentes entre o citoplasma e o meio, o Ca^{+2} e o Mn^{+2} do meio externo tendem rapidamente a se equilibrar com a superfície da célula, aderindo-se aos grupos aniônicos aí existentes.

No entanto, segundo EILAM (1982), leveduras crescidas em meio rico em cálcio quando transferidos para meio com tampão e glicose, lixiviam cerca de 20% de cálcio celular em 2 horas a pH 5,0 enquanto que a pH 7,5 essa lixiviação foi menor. Foi sugerido que a liberação de cálcio nessas condições ocorre por mecanismo de troca $\text{Ca}^{+2}/\text{H}^{+}$.

Os nossos resultados não parecem consistentes com os apresentados pelos dois autores, uma vez que ocorre liberação de cálcio pelas células em suspensão em água e esta é mais intensa em meio com menor concentração de hidrogênio iônico (pH 3,0).

Cabe considerar no entanto, que nossos experimentos foram realizados na ausência de glicose exógena e os valores de pH estudados (2,0; 2,5 e 3,0) foram muito mais baixos do que os estudados por EILAM (1982).

Estas variações nas condições de experimento provavelmente são responsáveis por estas divergências observadas. Considerando que quanto mais baixo o valor do pH do meio, maior a perda de K^+ e maior a absorção de H^+ , com conseqüente redução do pH intracelular, a maior retenção de cálcio observada a pH mais baixo, pode estar relacionada com a intensidade de variação no pH intracelular.

Esta suposição pode ser argumentada pelo resultado da análise de regressão aplicada para os teores de cálcio das células em função da elevação do pH da suspensão de células (ΔpH), mostrada na Figura 3. Note-se que o teor de cálcio nas leveduras é maior quando o ΔpH da suspensão foi maior, ou seja, quanto mais íons H^+ as células tenham absorvido do meio.

Os nossos resultados (Tabela 12) não indicam absorção de cálcio pelas células, uma vez que as médias mostradas encontram-se todas abaixo de 100% o que, segundo a nossa linha de raciocínio, indicam lixiviação do elemento. Note-se ainda que as porcentagens médias de cálcio na água encontram-se todos acima de 100% e aumentaram em função dos mesmos tratamentos que provocaram a redução dos teores de cálcio nas leveduras.

5.3. Influência dos tratamentos sobre os carboidratos de reserva

5.3.1. Trealose

Através dos dados experimentais relativos aos teores de trealose na levedura, mostrados na Tabela 43 (Apêndice) pode-se observar que esta reserva apresentou acentuadas oscilações durante os tratamentos.

Este comportamento da trealose concorda com os trabalhos apresentados por PANEK (1975), os quais demonstraram ser a trealose uma reserva bastante mobilizável, cuja síntese e degradação, em condições de carência de fonte de carbono exógeno, ocorre em ciclos.

Quando se analisou os dados experimentais em função apenas do tempo de tratamento, através do teste de Tukey, não foram obtidas variações significativas dos teores de trealose em função dos intervalos de tempo dos tratamentos.

Estes resultados corroboram os de PÁCA (1981), os quais mostraram que o início da mobilização acentuada de trealose ocorre após 10 horas de jejum.

Quando os dados foram analisados em função da temperatura, observou-se que as menores porcentagens de

trealose corresponderam às leveduras que foram mantidas sob temperaturas ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e 40°C (Tabela 14), sugerindo consumo desta reserva sob estas temperaturas.

No entanto, em células mantidas a 30°C , constatou-se que as porcentagens de trealose superaram os valores iniciais, indicando acúmulo do glicídeo.

A síntese de trealose em condição não proliferantes a 30°C foi demonstrada por PANEK (1963). Porém, a biossíntese desse glicídeo requer liberação da repressão catabólica e mitocôndria operante (PANEK, 1975).

Conforme descrito por CHESTER (1963) leveduras crescidas em condições de anaerobiose ou semi-anaerobiose apresentam o mecanismo de adaptação respiratória quando transferidas para condições de jejum.

Em nossos experimentos, as células foram transferidas para condições não proliferantes após o término da fermentação, quando os níveis de glicose estavam baixos. Por outro lado, a suspensão de células, apesar de não aeradas, estiveram em contato com o oxigênio através das agitações regulares das mesmas. Assim, acreditamos que as células tinham as condições exigidas para desencadear o processo de adaptação respiratória e conseqüentemente, de acumular trealose.

Conforme descrito por HEICK (1972) durante as primeiras horas de cultivo em anaerobiose, em presença de glicose, as leveduras sintetizam uma álcool desidrogenase citosólica.

lica, responsável pela formação do etanol. Ao baixarem os níveis de glicose externa e ao aumentar a concentração de etanol, a síntese de uma segunda álcool desidrogenase é induzida, esta isoenzima permite uma oxidação extramitocondrial do etanol, fato que segundo PANEK (1975), facilitaria a adaptação das células às condições não proliferantes aeróbicas, e à síntese de trealose. Após o processo de derrepressão mitocondrial (adaptação respiratória) deve aparecer uma terceira forma de álcool desidrogenase, agora já mitocondrial (PANEK, 1975). Em nossos ensaios, os teores de álcool na água das suspensões estiveram entre 1 e 2,5% (dados não mostrados).

Entretanto, as médias dos teores de trealose mostradas na Tabela 14, indicam mobilização dessa reserva a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e a 40°C . É provável que sendo tais temperaturas consideradas aquém e além da faixa ótima para a espécie *S. cerevisiae*, influíssem no processo de adaptação respiratória afetando a síntese de trealose.

Com relação ao efeito do pH do meio, sobre os teores de trealose das células, de acordo com a Tabela 14, houve acúmulo de trealose a pH 3,0 e consumo a pH 2,5. No entanto, a pH 2,0 não ocorreu alteração no teor de trealose (média = 101% do valor do tempo zero).

Estes resultados impedem que correlacione diretamente a mobilização ou síntese de trealose com a concentração de H^{+} do meio externo. Segundo os resultados obtidos por BARWELL &

BRUNT (1969), a síntese de trealose em leveduras foi inibida quando o pH do meio esteve abaixo de 4,0 em presença de glicose.

Nossos dados divergem dos apresentados por esses autores, uma vez que foram observados acúmulos nos tratamentos a pH 3,0 e naqueles a 30°C. Deve ser lembrado, que os ensaios, sendo aplicados em combinações fatoriais, mesmo a 30°C o pH do meio foi baixo.

Por outro lado, sob temperaturas de 40°C houve maior elevação do pH da suspensão (Tabelas 6 e 35 - Apêndice) e conseqüentemente, maior redução do pH interno das cêlulas por absorção de H^+ , podendo causar maior prejuízo à atividade da enzima trealose sintase, envolvida na síntese de trealose, a qual exibe atividade máxima a pH 6,6 (CABID & LELOIR, 1958).

A análise da Figura 9 permite concluir que o teor de trealose das células está diretamente ligado ao teor de fósforo das mesmas, durante os tratamentos. Note-se que a pH 3,0 há maior teor de fósforo nas células (Tabela 8).

Na Figura 8 é mostrada a correlação negativa entre os teores de trealose e cálcio das leveduras durante os tratamentos. A observação dos resultados obtidos pela comparação entre médias, em função dos fatores aplicados no tratamento das leveduras, permite concluir que as mesmas condições que levam à obtenção de menores teores médios de cálcio nas células (30°C e pH 3,0), levam também ao acúmulo de trealose.

Cabe considerar aqui, que a trealose é caracterizada como uma reserva altamente mobilizável, a qual, em condições proliferantes apresenta os mecanismos de biossíntese e mobilização operando simultaneamente (CHESTER, 1963). Sendo enzima trealose-6-fosfato-sintase, responsável pela síntese de trealose, dependente de magnésio (OESTREICHER & PANEK, 1982) e o cálcio um conhecido competidor do magnésio, poder-se-ia supor que este elemento estaria atuando na inibição ou redução da atividade da enzima sintase. Desta forma, as condições de tratamento que permitissem maior teor de cálcio nas células, proporcionaria menor síntese de trealose, prevalecendo, assim, a via de mobilização, diminuindo o teor dessa reserva nas células.

5.3.2. Glicogênio

Embora os teores de glicogênio das leveduras determinado nos ensaios, tenham oscilado durante os tratamentos, tais oscilações foram menos acentuadas que aquelas observadas para os teores de trealose (Tabela 43).

Pela comparação entre médias dos teores de glicogênio (Tabela 14) constatou-se que estes variaram significativamente apenas em função das temperaturas aplicadas nos tratamentos. Esta análise revelou que os menores teores de glicogênio foram obtidos a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e a 30°C , sendo o maior teor determinado a 40°C . Observe-se que a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e 30°C hou-

ve redução do conteúdo de glicogênio, enquanto que a 40°C, parece ter ocorrido acúmulo do glicídio.

Os comportamentos distintos observados para as duas reservas (trealose e glicogênio) em função da temperatura, corroboram os dados de literatura, os quais sugerem uma diversidade no controle das duas reservas.

Através a observação da Figura 4 podemos inferir que a elevação do pH do meio externo (absorção de H^+ pelas células) e provável redução do pH interno, leva à redução do conteúdo de glicogênio das leveduras. Este resultado é inconsistente com aquele obtido para essa reserva, através de comparação entre médias, pelo teste de Tukey, a qual não revelou influência do pH sobre o conteúdo de glicogênio das células.

Uma vez que a redução do pH interno de células de leveduras reflete na síntese de ATP (RIEMERMA & ALSBACH, 1974 citado por PÁCA, 1981), e em adição, a liberação de K^+ em troca por H^+ , provocando consumo substancial de energia para a manutenção do gradiente transmembrânico de K^+ nas células (PÁCA, 1981), levariam estas à deficiência energética. Assim poderíamos supor que o consumo de glicogênio em função do pH, sugerido pela análise de regressão (Figura 4), ocorreria em consequência da ativação do metabolismo endógeno para fornecimento da energia requerida para a manutenção das células nessas circunstâncias.

A Figura 6, mostrando a correlação positiva entre os teores de fósforo e glicogênio das células durante os

tratamentos, poderia também ser uma indicativa do consumo de glicogênio em função da carga energética das células, considerando que o teor de fosfatos intracelular afeta o sistema ATP/ADP (LEGGET, 1961).

5.4. Efeitos dos tratamentos das leveduras sobre as porcentagens de AR, glicerol dos vinhos e rendimentos das fermentações

As porcentagens (g/100ml) de açúcar redutor (AR) dos vinhos resultantes das fermentações em mosto de me-laço, foram determinadas pelo método colorimétrico de Somogy & Nelson (AMORIM *et alii*, 1982), o qual consiste na redução de íons Cu^{+3} pela glicose. Entretanto, sabe-se que o me-laço apresenta substâncias redutoras não fermentecíveis, as quais podem interferir nos resultados das análises.

Do mesmo modo, o método empregado para a determinação do glicerol (BASSO, 1987) é influenciado pelo teor de açúcar do meio. Assim, em condições nas quais são observadas maiores porcentagens de AR, é provável que se determine maiores teores de glicerol. Esta relação pode ser observada pela Figura 13.

É com estas restrições que discutiremos os efeitos dos tratamentos do fermento sobre os teores de AR e glicerol dos vinhos no final das fermentações, quando foram utilizadas essas células tratadas.

Através da comparação entre médias (Tabela 15) observou-se que quanto mais elevada a temperatura do tratamento das leveduras, maior a porcentagem de AR obtida no vinho da fermentação subsequente ao tratamento. Este resultado pode estar relacionado à alteração da permeabilidade da membrana das células tratadas ao álcool, a qual sabe-se ser altamente influenciada pela temperatura.

Células de leveduras quanto mantidas em temperaturas acima da faixa ótima (acima de 35°C) apresentam aumento nos seus conteúdos de ácidos graxos saturados, afim de promover aumento na rigidez de membrana e dessa forma adquirir maior termotolerância (SLAPACK et alii, 1987).

Baseados na afirmação anterior, podemos inferir que as células de leveduras mantidas a 40°C sofreriam adaptação das membranas à esta temperatura, aumentando a rigidez de suas membranas. Quando tais células foram transferidas para meio de fermentação, com elevada concentração de açúcar (15% de ART), a difusão do etanol das células seria mais lenta em virtude da rigidez de suas membranas. Desta forma, estas células acumulariam maior quantidade de etanol, resultando na inibição mais rápida da via fermentativa.

A intolerância das leveduras ao etanol é diminuída com a adição de ácidos graxos insaturados ao meio, os quais segundo SLAPACK et alii (1987) promovem maior fluidez da membrana, permitindo uma difusão mais rápida do álcool das células para o meio. Quando em temperaturas mais

baixas (25°C), segundo o mesmo autor, células de leveduras apresentam maior proporção de ácidos graxos insaturados, como ácido oleico e linoleico, resultando em maior fluidez de membrana. Assim, segundo nossa linha de raciocínio, a difusão do álcool seria mais rápida permitindo às células prosse-
guirem o processo fermentativo até concentrações mais elevadas de etanol no meio e conseqüentemente, consumiriam maior teor de açúcar.

As médias de AR em função dos valores de pH dos tratamentos das leveduras, mostradas na Tabela 15, indicaram que as células tratadas a pH mais baixos proporcionam o término da fermentação com teores de açúcar redutor mais bai-
xos.

Entretanto, a Figura 5 mostra que quanto mais já tenha se elevado o pH da suspensão (mais H^+ absorvido pelas células) no momento da tomada do fermento dessa suspensão para se iniciar a fermentação, maior porcentagem de AR é obtida nos vinhos. Esse resultado pode ser interpretado como sendo conseqüência da redução do pH intracelular ou possíveis conseqüências desse fenômeno, tais como liberação de fósforo, potássio, consumo de glicogênio (Figuras 9 e 10), ou ainda, devido a efeitos não determinados em nossos en-
saios.

É interessante observar que os teores de fósforo e glicogênio dos fermentos no início da fermentação, in-
ferem nos teores de AR dos vinhos no final das mesmas. Uma

vez que os mostos utilizados apresentaram 133 ppm de fósforo, quantidade considerada ótima para a fermentação (125 a 150 ppm de fósforo, segundo STUPIELLO & HORI, 1981), esperar-se-ia que as células suprissem suas deficiências em fósforo (caso isso acontecesse durante os tratamentos), de maneira que a fermentação ocorresse normalmente.

Apesar das restrições quanto à metodologia utilizada na determinação do glicerol, as porcentagens médias de AR e glicerol, apresentadas na Tabela 15, indicam que os menores e maiores valores determinados em função dos tratamentos não são sempre coincidentes, o que permite maior segurança na discussão destes resultados.

Leveduras tratadas à temperaturas de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e 40°C , quando transferidas para meio de fermentação, produzem maior quantidade de glicerol do que aquelas tratadas a 30°C (Tabela 15). Considerando que estas temperaturas encontram-se fora da faixa ótima (28 a 30°C) determinada para as leveduras utilizadas nos ensaios, pode-se supor um possível mecanismo protetor do glicerol para as células em fermentação, as quais provavelmente sofreram alterações em função dos tratamentos sob estas temperaturas.

Com relação ao efeito do pH do tratamento das leveduras, sobre a produção de glicerol pelas mesmas em fermentação subsequente, observou-se que as células tratadas a pH 2,0 produzem a menor quantidade de glicerol.

Esse efeito do pH sobre a produção de glicerol, pode estar envolvido com a liberação de potássio pelas células, conforme indicado pela correlação positiva entre porcentagens de glicerol dos vinhos e teores de potássio das células, mostrada na Figura 12.

Ensaio realizado por BASSO (1986)* mostram que elevadas concentrações de potássio no mosto levam a maior produção de glicerol durante a fermentação. Portanto, nos parece claro que maiores teores de potássio dentro das células provocam maior produção de glicerol.

A formação do glicerol durante a fermentação da glicose, ocorre na primeira fase da via glicolítica, através da redução da dihidroxiacetona-fosfato a glicerol-fosfato, com a regeneração de um NAD^+ . O glicerol fosfato é transformado posteriormente em glicerol, pela remoção do grupo fosfato (OURA, 1978).

Tal produção de glicerol por *Saccharomyces cerevisiae*, apesar de não ser ainda devidamente entendida, deve exercer algum papel importante no metabolismo destas células, uma vez que nestas, ao constituírem um sistema biológico

* BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Depto. de Química, Setor Bioquímica.

co altamente eficiente, não caberia a produção de glicerol como um simples desvio metabólico, o qual consome, juntamente com o succinato, 4 a 5% do substrato, durante o processo fermentativo.

Tem sido sugerido que o glicerol exerce controle da osmolaridade entre a célula e o meio, em condições de estresse de sais (ONISHI, 1963). No entanto, segundo LARSON & GUSTAFSSON (1987), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não mostrou ser capaz de regular o metabolismo do glicerol quando exposta a elevada pressão osmótica, embora aumentasse a produção desse poliálcool.

A regulação da osmolaridade, segundo os nossos resultados não parece a razão da produção de glicerol, uma vez que esta foi menor em condições de maior diferença de concentração de K entre a célula e o meio.

Uma outra função atribuída ao glicerol durante a fermentação de glicose por *S. cerevisiae* é o balanço redox das células. A redução da dihidroxiacetona fosfato a glicerol fosfato regenera um NAD^+ de NADH_2 , permitindo o prosseguimento normal da via glicolítica, em condições de excesso de NADH_2 (OURA, 1977).

Em nossos experimentos, as leveduras foram transferidas de condições de alta atividade metabólica (fermentação) para uma condição de jejum, sob temperaturas e valores de pH estressantes, condições estas que, segundo DAWES (1976) levam à redução da carga energética das células.

A fosfofrutoquinase, enzima chave da via glicolítica, é regulada por nucleotídeos de adenina. Uma carga energética alta (alto nível de ATP em relação ao nível de ADP) leva a inibição desta enzima, enquanto que sua ativação é observada quando a carga energética é baixa.

Desse modo, as leveduras transferidas da suspensão em água, novamente para meio contendo alta concentração de açúcar (15% de ART), para realizarem o segundo ciclo fermentativo, apresentariam uma via glicolítica estimulada, com elevado requerimento de NAD^+ , o que resultaria na produção de glicerol afim de manter o balanço redox.

A presença de K^+ nas células, segundo PEÑA *et alii* (1969) diminui o nível de ATP e aumenta o nível de ADP das mesmas, estimulando a via glicolítica.

Este dado, parece coerente com a nossa suposição anterior, na qual a produção de glicerol seria decorrente da necessidade de equilibrar o balanço redox das células em condições que provoquem estímulo da via glicolítica, uma vez que maior produção de glicerol foi observada quando as células apresentaram maiores teores de potássio (Figura 12).

Por outro lado, a correlação negativa entre teores de fósforo das células e porcentagens de glicerol dos vinhos, apresentada na Figura 11, indica que a produção de glicerol é afetada pelo teor de fosfatos das células no início da fermentação.

Deve ser lembrado que, segundo OURA (1976), a maior produção de glicerol ocorre durante a fermentação do

primeiro terço do açúcar, possivelmente antes que as células equilibrassem seus teores de fosfatos.

Os teores de fósforo das células influem na atividade da gliceraldeído desidrogenase, a qual atua na oxidação do grupo aldeído do gliceraldeído-3-fosfato a fosfoglicerol fosfato. Assim, a deficiência de fósforo na célula poderia acarretar acúmulo desse intermediário fosforilado, proporcionando aumento na síntese de glicerol.

Devemos, esclarecer no entanto, que estas hipóteses são meramente teóricas, uma vez que resultados mais conclusivos exigiam as determinações do pool de ATP e intermediário fosforilados das células, não realizadas em nosso experimento.

De acordo com as médias apresentadas na Tabela 15, maiores rendimentos foram obtidos nas fermentações nas quais foram utilizados os fermentos tratados a 30°C, do que naquelas cujos fermentos foram tratados a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e 40°C.

Na mesma tabela, observa-se que as porcentagens de AR e glicerol foram maiores nos vinhos das fermentações que apresentaram os menores rendimentos, ou seja, nas fermentações nas quais foram utilizados os fermentos tratados a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e 40°C.

Pela análise de regressão (Figuras 15 e 16) podemos observar que a queda no rendimento das fermentações é linear ao aumento das porcentagens de AR e glicerol nos seus respectivos vinhos.

Em vista desses resultados é provável que os efeitos das temperaturas referentes aos tratamentos das leveduras sobre o rendimento da fermentação ulterior, estejam relacionadas à capacidade de absorção de açúcar do meio e à produção de glicerol por estas células, afetadas pelos tratamentos.

O efeito do pH do tratamento das leveduras sobre os rendimentos das fermentações parece não estar ligado somente às porcentagens de AR e glicerol dos vinhos, conforme pode ser observado pelas inconsistências entre os resultados obtidos para estes 3 parâmetros (Tabela 15). Possivelmente, o efeito do pH esteja relacionado também à variação nos teores de elementos minerais das células.

O resultado da Figura 14, no qual observa-se a correlação negativa entre os rendimentos das fermentações e os teores de fósforo das células, corroboram com esta nossa suposição.

Os fosfatos, além de atuarem como carregador fosforilado para o transporte ativo da glicose (STEVENINCK & ROTHSTEIN, 1965), exercem funções importantes na fermentação, como participantes nas reações gerais da glicose e ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (LEGGETT, 1961). Estas funções atribuídas ao elemento fósforo na levedura, durante a fermentação, justificaria o resultado observado, no qual, a redução de fosfatos na célula resultou em prejuízo no rendimento das fermentações (Figura 14).

Entretanto nos parece ainda obscura, a razão pela qual o teor de fósforo no início da fermentação afeta o rendimento da mesma, uma vez o mosto apresentou teor de fosfatos suficiente para sanar uma possível deficiência de fósforo das células.

Deve ser lembrado no entanto, que pela nossa hipótese anterior, o teor de fosfato das células levariam a uma maior produção de glicerol no início da fermentação, dessa forma, desviando intermediários da via glicolítica, em detrimento da produção de etanol.

É possível ainda, que todos estes aspectos abordados estejam envolvidos a mecanismos distintos daqueles considerados nesta discussão, a qual constou de suposições teóricas baseadas em dados de literatura.

Cabe ressaltar porém, que objetivo de nossos experimentos consistiu na observação do comportamento das células de levedura, em face às diferentes condições às quais foram submetidas durante os tratamentos, de modo que se pudesse justificar o método semelhante adotado nas indústrias.

Pelos nossos resultados, podemos concluir que o tratamento ácido aplicado, com até 6 horas de duração, não afetou drasticamente as leveduras. Uma vez que esse tratamento é eficiente na eliminação de infecções bacterianas, as quais prejudicam as fermentações, nos parece um procedimento sem dúvida aceitável.

No que se refere ao rendimento das fermenta-

ções, podemos inferir que o tratamento do fermento atua como fator favorável, tendo em vista que fermentos não tratados (tempo zero) levaram a menores rendimentos das fermentações. Esse efeito pode estar relacionado aos diversos aspectos discutidos, porém devemos considerar que o menor rendimento pode ser consequência também de outros fatores não abordados nos ensaios.

Com relação aos valores de temperatura, pH e tempo de tratamento, pode-se inferir com base nos rendimentos por nós obtidos, que as condições de tratamento do fermento, as quais proporcionaram maiores rendimentos nas fermentações ulteriores, foram o pH 2,5 e temperatura de 30°C. O tempo de tratamento (1,5; 3 e 6 h) não diferiram entre si, sugerindo que se adote um período de tratamento em função da eficiência na eliminação da infecção bacteriana.

Devemos lembrar no entanto, que em nossos ensaios foram realizados apenas 2 ciclos fermentativos, intercalados pelo tratamento ácido do leite de levedura, enquanto que nas indústrias o mesmo leite é tratado várias vezes durante o período de safra. Não se pode portanto, afirmar que as mesmas condições as quais não afetaram acentuadamente as células no primeiro tratamento, não seriam danosas quando aplicadas consecutivamente, tendo em vista, que a renovação das células de leveduras nos processos fermentativos é bastante lenta.

Um outro aspecto a ser considerado, é quanto

à importância da nutrição mineral das leveduras utilizadas nas fermentações. Pelos nossos resultados, observamos que os elementos P, Ca e K, quando em proporções desequilibradas nas células, afetam o processo metabólico normal, quer em relação às reservas, quer em relação à produção de glicerol e etanol.

6. CONCLUSÕES

As discussões dos resultados obtidos em nossos experimentos nos levam às seguintes conclusões:

- O tratamento ácido do "leite" de leveduras, após o primeiro ciclo fermentativo, é favorável ao rendimento do segundo ciclo;

- Ocorre liberação de elementos minerais (P, N, K, Ca e Zn) pelas leveduras e aumento no pH do meio, em função dos tratamentos aplicados;

- Durante os tratamentos, não ocorreu consumo substancial de reservas, entretanto, quando os tratamentos corresponderam à temperatura de 30°C, houve acúmulo de trealose pelas leveduras;

- Tratamentos realizados à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) proporcionam menores perdas de fósforo e potássio pelas células. As maiores perdas desses elementos foram observadas nos tratamentos a 40°C;

- Quanto mais baixo o valor do pH do meio (pH da suspensão de células) maior a perda de potássio e nitrogênio e menor a perda de cálcio pelas células;

- O tratamento das leveduras a 40°C refletiu em maiores porcentagens de AR e glicerol nos vinhos resultantes das fermentações realizadas a partir destas células tratadas;

- As fermentações realizadas a partir de leveduras tratadas a 40°C, apresentaram os menores rendimentos médios, possivelmente como consequência da maior produção de glicerol e menor eficiência na utilização do açúcar do mosto representado pela maior porcentagem de açúcar redutor residual dos vinhos;

- A produção de glicerol pelas leveduras é influenciada por seus teores de fósforo e potássio no início do ciclo fermentativo;

- Os rendimentos das fermentações foram correlacionado diretamente com os teores de fósforo das leveduras no início do ciclo fermentativo;

- Houve uma correlação negativa entre os rendimentos das fermentações e a produção de glicerol e AR residual dos vinhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica e aparelhos de destilação. Piracicaba, ESALQ-FERMENTEC, 1986. 71p.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- ALGRANATI, I.D. & CABID, E. Uridine diphosphate D-glucose-glycogen glucosyl-transferase from yeast. Journal Biological Chemistry, Baltimore, 237: 1007-13, 1962.
- ALMEIDA, J.R. Curso sobre fermentação alcoólica. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, ESALQ, 1960. v.2. p.254-60.
- ARMSTRONG, W. McD. & ROTHSTEIN, A. Discrimination between alkali metal cations by yeast. I. Effect of pH on uptake. Journal of General Physiology, Baltimore, 48(1): 61-71, 1964.
- AVIGAD, G. Accumulation of trehalose and sucrose in relation to the metabolism of α -glucosides in yeasts of defined genotype. Biochemica and Biophysica Acta, Amsterdam, 40: 124-34, 1960.

- BACK, J.F.; DAKENFULL, D.; SMITH, M.B. Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyals. Biochemistry, New York, 18: 5191, 1979.
- BALL, W.J. & ATKINSON, D.E. Adenylate energy change in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. Journal of Bacteriology, Baltimore, 121(3): 975, 1975.
- BARTLEY, W. & TUSTANOFF, E.R. The effect of metabolic inhibitors on the development of respiration in anaerobically grown yeast. Biochemical Journal, Cambridge, 99(3): 599-603, 1966.
- BARWELL, C.J. & BRUNT, R.V. The effect of H-ion concentration upon aerobic polysaccharide synthesis by resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Archiv fur Mikrobiologie, Berlin, 64: 315-8, 1969.
- BECKER, V.J. A method for glycogen determination in whole yeast cells. Analytical Biochemistry, New York, 86(1): 56-64, 1978.
- BERCK, H.L. & ROTHSTEIN, A. The metabolism of storage carbohydrates in yeasts. Studied with glucose-1-¹⁴C and dinitrophenol. Archives of Biochemistry, New York, 72(2): 380-95, 1957.
- BERGELIN, R.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. Changes in cytochrome levels during the storage of baker's yeast at different temperatures. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 82: 286-7, 1976.

- BOCHAROVA, N.N. & CHERNYSH, V.G. The effect of cellular reserve carbohydrate on the preservation of baker's yeasts. Mikrobiologia, Moscow, 45(2): 153-6, 1979. Apud Microbiology Abstract, Cambridge, 14(9): 148, sept. 1979.
- BORBOLLA, M. Characteristics of calcium transport in yeasts. FEMS Symposium, 23: 359-67, 1985. Apud Chemical Abstracts., Columbus, 103(5): 268, aug/1985.
- BORST-PAUWEL, G.W. Regulation and energization of potassium and rubidium transport in yeasts. FEMS Symposium, 23: 269-76, 1985. Apud Chemical Abstract, Columbus, 103(5): 268, aug., 1985.
- BRANDT, K.M. Über die Reserve kohlehydrate der prebhefe. Dasverhalten der trehalose beinr wachstum und bei der warmes. Biochemische Zeitschrift, Berlin, 309: 190-201, 1941.
- BRIN, M. Transketalose: clinical aspects. In: Methods in Enzymology, COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., eds. New York, Academic Press, 1966. v.9., p.506-14.
- BUDD, J.A. Uptake and turnover of ^{14}C -glucose by yeast during wort fermentations. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 80: 333-41, 1974.
- CABID, E. & LELOIR, L.F. The biosynthesis of trehalose phosphate. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 231(1): 259-75, 1958.
- CALAHORRA, M.; RAMIREZ, J.; CLEMENTE, S.M.; PEÑA, A. Electrochemical potential and ion transport in vesicles of yeasts plasma membrane. Biochemical Biophysical Acta, Amsterdam, 899(2): 229-38, 1987.

- CARTWRIGHT, C. P. Ethanol dissipates the proton motive force the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal General Microbiology, New York, 132(2): 369-77, 1986.
- CHARLAB, R. Síntese de trealose em *Saccharomyces*: sistemas I e II. Rio de Janeiro, 1983. 70p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- CATANI, R.A. & JACINTJO, A.O. Avaliação da fertilidade do solo: Métodos de análises. Piracicaba, Livroceres, 1974. 6lp.
- CHEN, S.L. Carbohydrate assimilation in activity growing yeast *Saccharomyces cerevisiae*: II. Synthesis of polysaccharides from [1-¹⁴C] glucose. Biochemical et Biophysical Acta, Amsterdam, 32: 480-4, 1959.
- CHESTER, V.E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Journal, London, 86(1): 153-60, 1963.
- CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a Brewer's yeast. Nature, London, 183(4665): 902 - 3, 1959a.
- CHESTER, V.E. Effect on oxygen on endogenous metabolism of a respiratory-deficient Brewer's yeast. Nature, London. 184(4703): 1956-7, 1959b.
- CHVOJKA, A.; PADRÃO, G.R.C.B.; PANEK, A.D.; MATOON, J.R. A regulatory mutation in yeast with affects catalase T formation and metabolism of carbohydrate reserves. Current Genetics, New York, 4: 47-50, 1981.

- COLONNA, W.J. & MAGEE, P.T. Glycogenolytic enzymes in sporulating yeast. Journal Bacteriology, Baltimore, 134(3): 844-53, 1978.
- CONWAY, E.J. & DUGGAN, F. A cation carrier in the yeast cell wall. Biochemical Journal, Cambridge, 69(2): 265 - 74, 1958.
- CONWAY, E.J. & DOWNEY, M. pH values of the yeast cell. Biochemical Journal, Cambridge, 47(2): 355-60, 1950.
- CONWAY, E.J. & KERNAN, R.P. The effect of redox dyes on the active transport of hydrogen, potassium and sodium ions across the yeast cell membrane. Biochemical Journal, Cambridge, 61(1): 32-6, 1955.
- COONEY, C.L. Growth of microorganisms in REHMS & REED, I.G. Biotechnology: Microbial Fundamentals, Weinheim, Verlag Chemie, 1981. v.1, cap. 2.
- CROWE, J.H.; O'DEIL, S.J.; ARMSTRONG, D.A. Anhydrobiosis in nematodes: permeability during rehydration. Journal of Experimental Zoology, New York, 297: 431, 1979.
- DAWES, E.A. Endogenous metabolism of starved microbes. In: The Survival of Vegetative Microbes, ed. GRAY, T.R.G. & POSTGATE, J.R., Symposium of Society General Microbiology, 26: 19-53, 1976.
- DIVJAK, S. & MOR, J.R. On the activity of carbon dioxide fixation in growing yeasts. Archiv Mikrobiologie, Berlin, 94: 191-9, 1973.

DEAK, T. On the existence of H^+ symport in yeasts: a comparative study. Archives Mycobiology, New York, 116: 205-11, 1978.

EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast. I. The endogenous substrate. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 88(1): 17-25, 1960.

EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast. II. The relationship of molecular structure to glycogen metabolism. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 95(3): 464-9, 1961.

EDDY, A.A. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. Advances in Microbial Physiology, London, 23: 1-78, 1982.

EDDY, A.A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A.H., ed. The chemistry and biology of yeasts. New York, Academic Press, 1958. cap. 5, p.157-240.

EILAM, Y. Studies on calcium efflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbios, 35(140): 99-109, 1982. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 98(14): 277-8, 1983.

EILAM, Y.; CHERNICHOVSKY, O. Uptake of calcium driven by the membrane potential in energy-depleted yeast cells. Journal General Microbiology, Baltimore, 133(6): 1641-9, 1987.

ELANDER, M. Trehalose-6-phosphosynthetase aus Bäckerhefe. Arkive far Kemi, Stockhon, 31: 17-30, 1969.

- ELBEIN, A. The metabolism of α - α -trehalose. Advances Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. New York, 30: 227-56, 1974.
- FALES, F.W. The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Journal Biological Chemistry, Baltimore, 193(1): 113-24, 1951.
- FONZI, N.A.; SHANLEY, M.; OPHEIM, D.J. Relationship of glycolytic intermediates, glycolytic enzymes, and ammonia to glycogen metabolism during sporulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Bacteriology, Baltimore, 137(1): 285-94, 1979.
- FRENCH, D. Control of glycogen metabolism. A Ciba Foundation Symposium, 1964.
- FOULKES, E.C. Cation transport in yeast. Journal General Physiology, Baltimore, 39(5): 687-705, 1956.
- GAMBIRASIO, A. Fermentos auxiliares indústria. Química & Derivados, São Paulo, 2(16): 43-6, 1967.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 11 ed. Piracicaba, Nobel, 1985. 466p.
- GRBA, S.; OURA, E.; SUOMALAINEN, H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. European Journal Applied Microbiology, New York, 2: 29-37, 1975.
- GOLD, M. & OSBER, M.P. On the mechanism of glycogen phosphorylase. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 153: 784-7, 1972.

- HOEFELER, R.; JENSEN, D.; PIKE, M.M. Sodium transport and phosphorus metabolism in sodium-loaded yeast: simultaneous observation with sodium-23 and phosphorus-31 NMR spectroscopy in vivo. Biochemistry, Easton, 26: 4958-62, 1987.
- HARRISON, J.S. Yeast production. Progress in Industrial Microbiology, London, 10: 129-77, 1971.
- HARRIS, S.D. & COTTER, D.A. Vacuolar (lysosomal) trehalose of *Saccharomyces cerevisiae*. Current Microbiology, 15 (5): 247-9, 1987. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 107 (5): 395, oct., 1987.
- HENLE, K.J. & WARTERS, R.L. Heat protection by glycerol in vitro. Cancer Research, New York, 42: 2171, 1982.
- HORI, J. Condução de processos fermentativos. In: Seminário sobre Tecnologia e Economia do Alcool, 1., Piracicaba, 1980. Anais. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1980. p.37-41.
- JANACEK, K. Experimental pH change and constant buffering capacity in algal and yeasts suspension. Dev. Plant Biology, New York, 4: 577-8, 1980.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. Process Biochemistry, London, 16: 42-9, 1981.
- JORGENSEN, S.S. Laboratory manual. Some methods used for routine chemical analyses. Dursion of basic science. Piracicaba, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 1977. 15p.

- KANE, S.M. & ROTH, R.J. Carbohydrate metabolism during ascospores development in yeast. Journal Bacteriology, Baltimore, 118(1): 8-14, 1974.
- KELLER, F.; SCHELLENBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalose in vacuole and of trehalose in cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives Microbiology, New York, 131(1): 298, 1982.
- KELLY, P.I. & CATLEY, B.J. A purification of trehalose from *Saccharomyces cerevisiae*. Analytical Biochemistry, New York, 72: 353-8, 1976.
- KOTYK, A. & SIGLER, K. Trans-membrane movements of protons in sample eukaryotic cells. Study Biophysics, 84(1): 55-6, 1980. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 95(11): 388, nov. 1981.
- KOVAC, L.; SUBIK, J.; RUSS, G.; KOLLAR, K. On the relationship between respiratory activity and lipid composition of the yeast cell. Biochemical Biophysical Acta, Amsterdam, 144: 94-101, 1967.
- KUENZI, M.T. & FIECHTER, A. Regulation of carbohydrate composition of *Saccharomyces cerevisiae* under growth limitation. Archiv Mikrobiologie, Berlin, 84: 254-65, 1972.
- KUENZI, M.T. & FIECHTER, A. Changes in carbohydrate composition and trehalose - activity during the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. Archiv fur Mikrobiologie, Berlin, 64: 396-407, 1969.
- KRETZSCHMAR, H. Levaduras y Alcoholes. Barcelona, Reverté, 1961. 602p.

- LABBE-BOIS, R.; VOLLAND, C.; FORESTIER, J.P.; LABBLE, P. Pro^otohaem synthesis by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during respiratory adaptation. Relationship with glycogen metabolism. Enzyme, Snitzerland, 16: 9-20, 1973.
- LARSSON, C. & GUSTAFSSON, L. Glycerol production in relation to the ATP pool and heat production rate of the yeasts *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* during salt stress. Achives Microbiology, Berlin, 147: 358-63, 1987.
- LEÃO, M.H.M.R. Metabolismo de trealose e glicogênio em levedura de cerveja. Rio de Janeiro, 1972. 58p. (Mestrado-Universidade Federal do Rio de Janeiro).
- LEÃO, R.H.M.R. & PANEK, A.D. Trehalose synthesis in cells of *Saccharomyces carlsbergensis*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 44(3/4): 571-6, 1972.
- LEÃO, M.H.M.R.; PANEK, A.D.; CARVALHO, C.V.L.A. Glicogen accumulation during growth of *Saccharomyces cerevisiae* catabolite repressão effects. IR Medical Science, Lancaster, 12: 411-2, 1984.
- LEGGETT, J.E. Entry of phosphate into yeast cell. Plant Physiology, Lancaster, 36(3): 277-84, 1961.
- LILLIE, S.H. & PRINGLE, J.R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. Journal of Bacteriology, Baltimore, 143(6): 1384-94, 1980.
- LELOIR & CABID. The enzymic synthesis of trehalose - phosphate. Journal American Chemistry Society. New York, 75: 5445-6, 1953.

- LEWIS, M.T. & KUIPER, H.A. Effect of growth temperature and glucose on thermal injury of *Saccharomyces calsbengensis*. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 78(5): 465, 1972.
- LIMA, V.A. Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o desenvolvimento e atividade da *Saccharomyces cerevisiae*, Hansen. Piracicaba, Instituto Zimotécnico - ESALQ/USP (Tese de Doutorado).
- LINDEGREN, C.C. The induction of dormancy in vegetative yeast cells by fact and carbohydrate storage and the conditions for reactivation. Archives Biochemistry, New York, 8 (1): 119-34, 1945.
- LONDESBOROUGH, J. & VARIMO, K. Characterization of two trehalosis in baker's yeast. Biochemical Journal, London, 219(2): 511-8, 1984.
- MERDINGER, E. & KOHN, P. Isolation and identification of trehalose from *Pullularia pullulans*. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 13(4): 1126-8, 1967.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, London, 191: 144-8, 1961.
- MANDL, R.H. & PIENDL, A. Technical effects of the glycogen metabolism of bottom fermentation yeasts. Proceedings of the European Brewery Convention, Salzburg, 317-30, 1973. Apud Journal Institute Brewing, Cambridge, 80: 311, 1974.
- NAUMAN, R.V.; WEST, P.N.; TRON, F. A spectrophotometric study of schiff reaction as applied to the quantitative determination of sulfur dioxide. Analytical Chemistry, Washington, 32(10): 1307-11, 1980.
- NORTHCOTE, D.H. & HORNE, R.W. The chemical composition and structure, of the yeast cell wall. Biochemical Journal, London, 51:232-6, 1952.

- OESTREICHER, E.G. & PANEK, A.D. Effect of Mg^{2+} on the activity of yeast trehalose-6-phosphate synthase. IRCS Medical Science, Lancaster, 10: 418-9, 1982.
- ONISHI, H. Osmophilic yeasts. Advances Food Research, New York, 12: 53-94, 1963.
- OPERTI, M.S. & PANEK, A.D. Trehalose phosphate and trehalose metabolism in brewer's yeast. Ciência e Cultura, São Paulo, 20(4): 747-54, 1968.
- ORTIZ, C.H.; MAIA, J.C.C.; TENAN, M.N.; PADRÃO, B.G.R.; MOTOON, J.R.; PANEK, A.D. Regulation of yeast trehalose by a monocycle, cyclic AMP-dependent phosphorylation - dephosphorylation cascade system. Journal of Bacteriology, Baltimore, 153(2): 644-51, 1983.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentation. Process Biochemistry, London, 12(3): 19-35, 1977.
- OURA, E. & TANNER, R. Cellular material and water pools in baker's yeasts during storage, in Current Developments of Yeasts Research, STEWART, G.G. & RUSSELL, I., Eds. Pergamon Press, Toronto, 1971. pg. 47.
- OURA, E. Aeration and the biochemical composition of baker's yeast. Antonie Van Leeuwenhoek, Yeast Symposium. Amsterdam, 35: 25, supplement, 1969.
- PÁÇA, J. Metabolic responses of baker's yeast to glucose addition during aerobic starvation. Journal Institute Brewing, Cambridge, 87: 163-8, 1981.

PÁCA, J. Reserve carbohydrate metabolism and cell survival in aerobically starving baker's yeast. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 87: 147-50, 1981.

PANEK, A.D. Trehalose synthesis during starving of baker's yeast. European Journal Applied Microbiology, New York, 2(1): 39-46, 1975.

PANEK, A. Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives Biochemistry and Biophysics, New York, 98(3): 348-55, 1962.

PANEK, A.D. Function of trehalose in baker's (*Saccharomyces cerevisiae*). Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 100(3): 422-5, 1963.

PANEK, A.D. & BERNARDES, E.J. Trehalose: Its role in germination of *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, New York, 7: 393-7, 1983.

PANEK, A.D.; BERNARDES, E.; ORTIZ, C.H.; BAKER, S.; MATOON, J.R. Biochemical genetics, of trehalose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 53: 165-72, 1981.

PANEK, A.D. Metabolismo de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*. Rio de Janeiro, 1975. 115p. (Tese Professor Titular - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

PEÑA, A. Studies on the mechanism of K^+ transport in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics, London, 167: 397-409, 1975.

- PEÑA, A.; CINCO, G.; PUYOU, A.G.; TUENA, M. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Acta, Amsterdam, 180: 1-8, 1969.
- PEPPLER, H.J. Food Yeasts. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. ed. The Yeasts. London, Academic Press, 1970. cap. 8, p.421-57.
- PARIS, S. & PRINGLE, J.R. *Saccharomyces cerevisiae*: heat and glucose sensitivities of starved cells. Annals Microbiology Institute Pasteur, Paris, 134B: 379, 1983.
- PLAAT, J.B. Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate stimulates trehalose degradation in baker's yeast. Biochemical Biophysical Research Communication, New York, 66(3): 580-7, 1974.
- PLESSET, J.; PALMC, Mc LAUGHLIN, C.S. Induction of heat shock protein and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Biophysical Research Communications, New York, 108(3): 1340-6, 1982.
- PORTER, L.J. & OUGH, C.S. The effects of ethanol, temperature, and dimethyl dicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Montrochet n° 522 in wine. American Journal Enology Viticulture, Davis, 33(4): 222-8, 1982.
- PRINGLE, J.R. Induction, selection and experimental use of temperature - sensitive and other conditional mutants of yeast. Methods Cell Biology, New York, 11: 131 - 64, 1975.

- QUAIN, D.E. & HAWLAM, J.M. Changes in glucose-6-phosphate and storage carbohydrates during catabolite derepression in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal General Microbiology, London, 113: 195-8, 1979.
- RAMOS, S. Coupling of protons and K^+ gradient in yeasts. FEMS Symposium, 23: 351-7, 1985. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 103(5): 267, aug, 1985.
- RITOSSA, F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia, Switzerland, 18: 571, 1962.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, A. & RAMOS, J. Dual system of potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 59(3): 940-5, 1984.
- ROMAY, C. & PASCUAL, C. Extrusion de protons en mutants de la via glicolítica en *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Latinoamericana de Microbiología, México, 27(3): 243-7, 1985.
- ROTH, R. Carbohydrate accumulation during the sporulation of yeast. Journal of Bacteriology, Baltimore, 101 (1): 53-7, 1970.
- ROTHMAN, L.B. & CABID, E. Regulation of glycogen synthesis in the intact yeast cell. Biochemistry, Washington, 8 (8): 3332-41, 1969.
- ROTHMAN, L.B. & CABID, E. Two forms of yeast glycogen synthase and their role in glycogen accumulation. Proc. Natl. Academic Science, U.S.A., Chicago, 66: 967 - 74, 1970.

- ROTHSTEIN, A. & BRUCE, M. The efflux of potassium from yeast cells into a potassium free medium. Journal Cellular Comparative Physiology, New York, 51(3): 439-55, 1958.
- ROTHSTEIN, A. & HAYES, A.D. The relationship of the cell surface to metabolism. XIV. The cation - binding properties of the yeast cell surface. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 63(4): 87-99, 1956.
- ROUSSEAU, P.; HALVORSON, H.O.; BULLA, L.A.; JULIAN, G.S. Germination and autgrowth of single spores of *Saccharomyces cerevisiae* viewvid. Journal Bacteriology, Baltimore, 109(3): 1232-8, 1972.
- RYAN, J.P. & RYAN, H. The role of intracellular ph in the regulation of cation exchanges in yeasts. Biochemical Journal, London, 128(1): 139-46, 1972.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análise química em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
- SATOSHI, T.; MIKIHICO, K.; KAZUO, M. Yeast glycogen phosphorylase: characterization of the dimeric form and its activation. Agricultural Biol. Chemistry, Tokyo, 51(9): 2465-2471, 1987.
- SCOTT, G.; JACOBSON, M.A.; RICE, M.E. The influence of glycolitic factors on the potassium and sodium content of *Saccharomyces cerevisiae*. Archives Biochemistry, New York, 30(2): 282-91, 1951.

SEASTON, A.; CARR, G.; EDDY, A.A. The concentration of glycine by preparations of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* depleted of adenosine triphosphate: Effects of proton gradients and uncoupling agents. Biochemical Journal, Cambridge, 154(3): 669-76, 1976.

SIGLER, K.; KOTYK, A. KNOTKOVA, A.; OPEKAROVA, M. Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate induced proton extrusion in the yeast. *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical Biophysical Acta, Amsterdam, 643(3): 583-92, 1981.

SLAPACK, G.E.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Thermophilic microbes in ethanol production. CRC Press, Boca Raton, 1987, pag. 99-107.

SLAVIK, J. & KOTIK, A. Intracellular pH distribution and transmembrane pH profile of yeasts cells. Biochemical Biophysical Acta, Amsterdam, 766(3): 679-84, 1984.

SMEDLEY, MacLEAN & HOFFERT, D. Carbohydrate and fat metabolism in yeast. Biochemical Journal, Cambridge, 17(6): 720-41, 1923.

SMITH, E.E.; TAYLOR, P.M.; WHELAN, W.J. Carbohydrate metabolism and its disorders, 1: 97, 1968.

SMITH, Z.G. & SMITH, E.E. Evidence for the peroplasmic location of glycogen in *Saccharomyces*. Biochemical Biophysical Research Communication, New York, 56(3): 588 - 92, 1974.

SOLINGEN, P.V. & PLAAT, J.B. Partial purification of the protein system controlling the breakdown of trehalose in baker's yeast. Biochemical Biophysical Research Communication, New York, 62(3): 553-60, 1975.

- SOUZA, N.O. & PANEK, A.D. Location of trehalose and trehalose in yeast cells. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 125(1): 22-8, 1968.
- SPIEGELMAN, S. & NOZAWA, M. On the inability of intact yeast cell to ferment their carbohydrate reserves. Archives Biochemistry, New York, 6(2): 303-22, 1945.
- STEPHANOPOULOS, D. & LEWIS, M.J. Release of phosphat by fermenting brewer's yeast. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 74: 378-83, 1968.
- STEVENINK, J. van & ROTHSTEIN, A. Sugar transport and metal binding in yeast. Journal of General Physiology, Baltimore, 49: 235-246, 1965.
- STICKLAND, L.H. Endogenous respiration and polysaccharide reserves in baker's yeast. Biochemical Journal, Cambridge, 64(3): 498-503, 1956.
- STIER, T.J.B. & STANNARD, J.N. A kinetic analysis of the endogenous respiration of baker's yeast. Journal General Physiology, New York, 19: 461-77, 1936a.
- STIER, J.S.B. & STANNARD, J.N. The metabolic systems involved in dissimilation of carbohydrate reserves yeast. Journal General Physiology, New York, 19: 479-94, 1936b.
- SUOMALAINEN, H. & PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. Journal of Institute Brewing, Cambridge, 67: 249-54, 1961.
- SUOMALAINEN, H. & OURA, E. Yeast nutrition and solute uptake. In: ROSE, A.A. & HARRISON, J.S. The Yeast. 3a. ed. London, Academic Press, v.2, cap. 2, 1971.

- TENAN, M.N.; ORTIZ, C.H.; ORTIZ, D.G.M.; MATTON, J.R. & PANEK, A.D. Relationships between mutations affecting protein kinase and accumulation of energy reserves in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, New York, 26: 217-20, 1985.
- TREVELYAN, W. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. III. The intracellular level of piruvate during yeast fermentations. Biochemical Journal, Cambridge, 57(4): 556-61, 1954.
- TREVELYAN, W.E. & HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. V. The trehalose content of baker's yeast during a anaerobic fermentation. Biochemical Journal, Cambridge, 62(2): 177-83, 1956.
- TREVELYAN, W.E.; GAMMON, J.N.; WIGGINS, HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. II. Synthesis of cell carbohydrates during glucose fermentation, and its inhibition by azide. Biochemical Journal, Cambridge, 50(3): 303-9, 1952.
- VASCONCELLOS, A.M.H. & PANEK, A.D. Trehalose metabolism during the "lag" phase of growth of *Saccharomyces cerevisiae*. IRCS Medical Science, Lancaster, 6: 57, 1978.
- VILLALOBO, A. Energy dependent and potassium translocations by the reconstitute yeast plasma membrane ATPase. Canadian Journal Celullary Biology, New York, 62(9): 865 - 77, 1984. Apud Chemical Abstracts, Columbus, 101(17): 282, dec., 1984.
- VON MEYENBURG, H.K. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces serevisiae* during glucose limited aerobic growth. Archiv fur Mikrobiologie, Berlin, 66: 289-303, 1969.

WATSON, K. & CAVICCHIOLI, R. Acquisition of ethanol tolerance in yeast cells by heat shock. Biotechnology Letters, Kew, 30: 793, 1984.

WEST, I.C. & MITCHELL. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*. Biochemical Journal, Cambridge, 144 (1): 87-90, 1974.

WHITE, J. & MUNNS, D.J. Influence of temperature on yeast growth and fermentation. Journal of Institute of Brewing, Cambridge, 57: 280-4, 1951.

WIENKEN, A. & SCHLLENBERG, M. Does a cyclic AMP -dependent phosphorylation initiate the transfer of trehalose from the cytosol into the vacuoles in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letters, Amsterdam, 150: 329-331, 1982.

WILLIAM, J.B. & ATKINSON, D.E. Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. Journal of Bacteriology, 121(3): 975-82, 1975.

WILSON, N.L.; McLEOD, B.J.; COOPER, R. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: effect on respiratory activity. Antonie van Leeuwenhoek, Wageningen, 43(3/4): 233-44, 1977.

WILSON, K. & McLEOD, B.J. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: effect on protein, carbohydrate, sterol and fatty acid content and on viability. Antonie van Leeuwenhoek, Wageningen, 42(4): 397-410, 1976.

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

ZIKMANIS, P.B.; LAIVENIEKS, M.G.; AUZINYA, L.P.; KULAEV, I. S.; BEKER, M.E. Relationship between the content of high molecular-weight polyphosphate and trehalose and viability of populations following dehydration of the yeast *Saccharomyces*. Mikrobiologia, Pushchino, 23(3): 406-9, 1982.

A P E N D I C E

Tabela 16. Análise de variância para os valores de pH da suspensão de células.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob.>F
Temper.	2	1,4278349	0,7139174	3,3746	0,04133
% Cel.	1	0,0903111	0,0903111	0,4269	0,52360
Tem.	3	8,9284361	2,9761454	14,0679	0,00002
Tem. x %C	2	0,0808098	0,0404049	0,1910	0,82821
Tem. x Tempo	6	0,5915766	0,0985961	0,4661	0,83085
%C x Tempo	3	0,0673723	0,0224574	0,1062	0,95527
Tem. x %Cel.	6	0,1150902	0,0191817	0,0907	0,99575
Resíduo	48	10,1546694	0,2115556		
TOTAL	71	21,4561004			

Média geral = 3,087639

Coeficiente de Variação = 14,897

Tabela 17. Análise de variância para o número de células vivas por mililitro de suspensão.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	115,5277778	57,7638889	17,4017	0,00390
pH	2	110,8611111	55,4305556	16,6987	0,00426
% Cel.	1	1378,1250000	1378,1250000	415,1674	0,00005
Tempo	3	174,3750000	58,1250000	17,5101	0,00305
Tem. x pH	4	100,8888889	25,2222222	7,5983	0,01654
Tem. x %Cel.	2	11,0833333	5,5416667	1,6695	0,26506
Tem. x Tempo	6	51,9166667	8,6527778	2,6067	0,13445
pH x %C	2	25,0833333	12,5416667	3,7782	0,08652
pH x Tempo	6	44,9166667	7,4861111	2,2552	0,17258
%C x Tem.	3	25,0416667	8,3472222	2,5146	0,15507
Tem x pH x %Cel.	4	163,3333333	40,8333333	12,3013	0,00566
Tem. x pH x Tempo	12	44,6666667	3,7222222	1,1213	0,46899
pH x %C x Tempo	6	57,5822222	9,5972222	2,8912	0,11129
Tem x pH x %Cel.	12	71,3333333	5,9444444	1,7908	0,24351
Resíduo	6	19,9166667	3,3194444		
TOTAL	71	2394,6527778			

Média geral = 32,069440

Coeficiente de Variação = 5,681%

Tabela 18. Análise de variância para os teores de fósforo na levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prov. >F
Temper.	2	2800,3842626	1400,1921313	4,0957	0,02115
pH	2	2794,8494961	1397,4247481	4,0876	0,02129
% Cel.	1	2694,2107754	2694,2107754	7,8809	0,00683
I.Tempo	2	156,1061577	78,0530788	0,2283	0,79911
Tem x pH	4	2855,1409836	713,7852459	2,0879	0,09312
Tem x %Cel.	2	1882,8966462	941,4483231	2,7538	0,07030
Tem. x I.Tempo	4	619,3502351	154,8375588	0,4529	0,77224
pH x %Cel.	2	4988,7026915	2494,3513457	7,2963	0,00185
pH x I.Tempo	4	226,6270816	56,6567704	0,1657	0,95256
%C x I.Tempo	2	88,9245339	44,4622669	0,1301	0,87826
Tem x pH x %Cel.	4	3437,0977058	859,2744265	2,5135	0,05052
Tem x pH x I.Tempo	8	1003,7059859	125,4632482	0,3670	0,93351
pH x %C x I.Tempo	4	535,5746135	133,8936534	0,3917	0,81533
Tem x pH x %C x I.Tempo	8	441,8866410	55,2358301	0,1616	0,99410
Resíduo	58	19828,2818012	341,8669276		
TOTAL	107	44353,7396112			

Média geral = 98,650920

Coeficiente de Variação = 18,742%

Tabela 19. Análise de variância para os teores de fósforo na água da suspensão de leveduras.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	43808,0774142	21904,0387071	652,7949	0,00001
pH	2	4131,4493295	2065,7246647	61,5637	0,00001
% Cel.	1	37439,9863202	37439,9863202	1115,8048	0,00001
I.Tempo	2	8609,9231683	4304,9615841	128,2986	0,00001
Tem. x pH	4	8942,7928043	2235,6982011	66,6294	0,00001
Tem. x %Cel.	2	11495,9792715	5347,9896357	171,3044	0,00001
Tem. x I.Tempo	4	2111,9462004	527,9865501	15,7353	0,00001
pH x %Cel.	2	54421,1757321	27210,5878660	810,9432	0,00001
pH x I.Tempo	4	1017,5161907	254,3790477	7,5811	0,00015
%C x I.Tempo	2	461,1365459	230,5682730	6,8715	0,00246
Tem. x pH x %Cel.	4	30308,4986754	7577,1246689	225,8172	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	1331,0593348	166,3824169	4,9586	0,00022
pH x %Cel. x I.Tempo	4	1191,7447150	297,9361788	8,8792	0,00006
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	1686,0630063	210,7578758	6,2811	0,00004
Resíduo	58	1946,1461756	33,5542444		
TOTAL	107	208903,4948843			

Média geral = 86,581390

Coeficiente de Variação = 6,690%

Tabela 20. Análise de variância para os teores de nitrogênio na levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	227,1377568	113,5688784	17,4641	0,00002
pH	2	69,7834555	34,8917277	5,3655	0,00745
% Cel.	1	293,6026057	293,6026057	45,1488	0,00001
I.Tempo	2	1,7471223	0,8735611	0,1343	0,87461
Tem. x pH	4	941,6813388	235,4203347	36,2018	0,00001
Tem. x %Cel.	2	227,6144309	113,8072154	17,5007	0,00002
Tem. x I.Tempo	4	101,1241232	25,2810308	3,8876	0,00746
pH x %Cel.	2	222,0596575	111,0298287	17,0736	0,00002
pH x I.Tempo	4	127,0846598	31,7711650	4,8856	0,00216
%C x I.Tempo	2	3,0761100	1,5380550	0,2365	0,79288
Tem. x pH x %Cel.	4	311,9543992	77,9885998	11,9927	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	164,1731582	20,5216448	3,1557	0,00516
pH x %C x I.Tempo	4	95,0235898	23,7558975	3,6531	0,01020
Tem. x pH x %C x I.Tem.	8	134,0732894	16,7591612	2,5771	0,01755
Resíduo	58	377,1739947	6,5029999		
TOTAL	107	3297,3096915			

Média geral = 997870

Coeficiente de Variação = 2,550%

Tabela 21. Análise de variância para os teores de nitrogênio na água da suspensão de leveduras.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	7181,7222197	3590,8611099	62,0883	0,00001
pH	2	17634,9289454	8817,4644727	152,4597	0,00001
% Cel.	1	102854,5250133	102854,5250133	1778,4220	0,00001
I.Tempo	2	33058,5558597	16529,2779299	285,8020	0,00001
Tem. x pH	4	88533,1673867	22133,2918467	382,6991	0,00001
Tem. x %Cel.	2	13480,8185871	6740,4092986	116,5461	0,00001
Tem. x I.Tempo	4	4951,3987350	1237,8496838	21,4032	0,00001
pH x %Cel.	2	14544,2410958	7272,1205479	125,7397	0,00001
pH x I.Tempo	4	1088,9524982	272,2381246	4,7072	0,00266
% x I.Tempo	2	1255,3422590	627,6711295	10,8528	0,00024
Tem. x pH x %Cel.	4	66462,3698942	16615,5924736	287,2945	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	6783,8511217	847,9813902	14,6622	0,00001
pH x %C x I.Tempo	4	4018,2260519	1004,5565130	17,3694	0,00001
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	1633,5129436	204,1891179	3,5306	0,00245
Resíduo	58	3354,4134125	57,8847140		
TOTAL	107	366836,0260340			

Média geral = 161,397700

Coefficiente de Variação = 4,712%

Tabela 22. Análise de variância para os teores de potássio na levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	3085,7220487	1542,8610243	57,5089	0,00001
pH	2	1879,8546965	939,9273482	35,0350	0,00001
% Cel.	1	221,0297615	221,0297615	8,2387	0,00584
I.Tempo	2	496,3938827	248,1969413	9,2513	0,00056
Tem. x pH	4	1578,0485579	394,5121395	14,7051	0,00001
Tem. x %Cel.	2	260,3854467	130,1927233	4,8528	0,01121
Tem. x I.Tempo	4	137,5048744	34,3762186	1,2813	0,28714
pH x %Cel.	2	1481,0200343	740,5100172	27,6019	0,00001
pH x I.Tempo	4	522,2287788	130,5571947	4,8664	0,00220
%C x I.Tempo	2	546,5355215	273,2677607	10,1858	0,00334
Tem. x pH x %Cel.	4	2526,8914189	631,7228547	23,5470	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	724,3258201	90,5407275	3,3748	0,00332
pH x %C x I.Tempo	4	147,0381089	36,7595272	1,3702	0,25458
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	804,9089110	100,6136139	3,7503	0,00162
Resíduo	58	1556,0356390	26,8282007		
TOTAL	107	15967,9235009			

Média geral = 91,338710

Coeficiente de Variação = 5,671%

Tabela 23. Análise de variância para os teores de potássio na água da suspensão de leveduras.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	2100,0700506	1050,0350253	10,4936	0,00029
pH	2	3515,1570885	1757,5785443	17,5645	0,00002
% Cel.	1	52,5369976	52,5369976	0,5250	0,52157
I.Tempo	2	8588,8461620	4294,4230810	42,9167	0,00001
Tem. x pH	4	23348,6893686	5837,1723422	58,3343	0,00001
Tem. x %Cel.	2	4175,0723125	2087,5361573	20,8620	0,00001
Tem. x I.Tempo	4	698,8027966	174,7006992	1,7459	0,15131
pH x %Cel.	2	8196,1991685	4098,0995843	40,9547	0,00001
pH x I.Tempo	4	435,5874740	108,8968685	1,0883	0,37115
%Cel x I.Tempo	2	1177,6707243	588,8353621	5,8846	0,00501
Tem. x pH x %Cel.	4	40814,8678857	10203,7169714	101,9718	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	1267,4928833	158,4366104	1,5834	0,14944
pH x %C x I.Tempo	4	2228,5130757	557,1282689	5,5677	0,00100
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	3339,3531649	417,4191456	4,1715	0,00077
Resíduo	58	5803,7185320	100,0641126		
Total	107	105742,5776850			

Média geral = 191,002300

Coefficiente de Variação = 5,237%

Tabela 24. Análise de variância para os teores de magnésio na levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	9043,0665527	4521,5332763	6,6200	0,00294
pH	2	2828,2485365	1414,1242682	2,0704	0,13339
% Cel.	1	5658,7898348	5658,7898348	8,2851	0,00572
I.Tempo	2	181,7646057	90,8823028	0,1331	0,87570
Tem. x pH	4	10269,9573348	2567,4893337	3,7591	0,00885
Tem x %Cel.	2	4187,3537280	2093,6768640	3,0654	0,05279
Tem. x I.Tempo	4	313,5424331	78,3856083	0,1148	0,97386
pH x %Cel.	2	6489,0995993	3244,5497997	4,7504	0,01219
pH x I.Tempo	4	226,5229270	56,6307317	0,0829	0,98432
%C x I.Tempo	2	368,2573447	184,1286724	0,2696	0,76823
Tem. x pH x %Cel.	4	4333,8672078	1083,4668019	1,5863	0,18911
Tem. x pH x I.Tempo	8	1462,3799224	182,7974903	0,2676	0,97323
pH x %C x I.Tempo	4	2776,0827526	694,0206882	1,0161	0,40755
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	2381,6456819	297,7057102	0,4359	0,89471
Resíduo	58	39614,6948110	683,0119795		
TOTAL	107	90135,2732722			

Média geral = 109,545600

Coeficiente de Variação = 23,857%

Tabela 25. Análise de variância para os teores de magnésio na água da suspensão de leveduras.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	3236,3070858	1618,1535429	5,6321	0,00606
pH	2	16865,5325088	8432,7662544	29,3508	0,00001
% Cel.	1	669,6557652	669,6557652	2,3308	0,12844
I.Tempo	2	71,2091789	35,6045895	0,1239	0,88353
Tem. x pH	4	10165,5229054	2541,3807264	8,8455	0,00006
Tem. x %Cel.	2	5425,8689117	2712,9344558	9,4426	0,00050
Tem. x I.Tempo	4	2383,7234397	595,9308599	2,0742	0,09496
pH x %Cel.	2	16117,7526767	8058,8763383	28,0495	0,00001
pH x I.Tempo	4	2150,2113208	537,5528302	1,8710	0,12682
%C x I.Tempo	2	1781,0187719	890,5093860	3,0995	0,05118
Tem. x pH x %Cel.	4	11675,4515092	2918,8628773	10,1593	0,00002
Tem. x pH x I.Tempo	8	5836,3879048	729,5484881	2,5392	0,01906
pH x %C x I.Tempo	4	3867,2414132	966,8103533	3,3651	0,01511
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	3690,3649252	461,2956156	1,6056	0,14281
Resíduo	58	16663,9281661	287,3091063		
TOTAL	107	100600,1764833			

Média geral = 137,342100

Coefficiente de Variação = 12,342%

Tabela 26. Análise de variância para os teores de cálcio na levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	47271,4744372	23635,7372186	73,1708	0,00001
pH	2	4858,0402191	2429,0201095	7,5197	0,00160
% Cel.	1	248,0684437	248,0684437	0,7680	0,61158
I.Tempo	2	893,6673327	446,8336664	1,3833	0,25790
Tem. x pH	4	3779,8371333	944,9592833	2,9254	0,02801
Tem. x %Cel.	2	6991,5178209	3495,7539104	10,8221	0,00024
Tem. x I.Tempo	4	857,1321549	214,2830387	0,6634	0,62288
pH x %Cel.	2	4828,8966952	2414,4483476	7,4746	0,00164
pH x I.Tempo	4	1280,5262671	320,1315668	0,9911	0,57916
%C x I.Tempo	2	755,5568569	377,7784284	1,1695	0,31787
Tem. x pH x %Cel.	4	7588,0008465	1897,0002116	5,8727	0,00073
Tem. x pH x I.Tempo	8	3470,0280721	433,7535090	1,3428	0,24066
pH %C x I.Tempo	4	643,5308752	160,8827188	0,4981	0,74003
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	1917,0264233	239,6283029	0,7418	0,65584
Resíduo	58	18735,2311184	323,0212262		
TOTAL	107	104118,5346966			

Média geral = 87,352970

Coeficiente de Variação = 20,575%

Tabela 27. Análise de variância para os teores de cálcio na água da suspensão de leveduras.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	14342,1390701	7171,0695331	16,0201	0,00003
pH	2	16302,7232072	8151,3616036	18,2101	0,00001
% Cel.	1	3608,9287725	3608,9287725	8,0623	0,00630
I.Tempo	2	2526,1397817	1268,0698908	2,8329	0,06535
Tem. x pH	4	28501,7009931	5875,4252483	13,1257	0,00001
Tem. x %Cel.	2	10535,7438329	5267,8719164	11,7684	0,00016
Tem. x I.Tempo	4	2116,5183138	529,1295785	1,1821	0,32795
pH x %Cel.	2	110779,9137972	55389,9568986	123,7407	0,00001
pH x I.Tempo	4	3871,9986705	967,9996676	2,1625	0,08368
%C x I.Tempo	2	5355,8035961	2677,9017981	5,9824	0,00465
Tem. x pH x %Cel.	4	71461,5930834	17865,3982709	39,9112	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	6815,1036543	851,8879568	1,9031	0,07642
pH x %C x I.Tempo	4	3221,5087586	805,3771897	1,7992	0,14037
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	6776,0983438	847,0122930	1,8922	0,07823
Resíduo	58	25962,4895806	447,6201307		
TOTAL	107	307188,403459			

Média geral = 145,119700

Coefficiente de Variação = 14,579%

Tabela 28. Análise de variância para os teores de zinco da levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	2996,8250256	1498,4125128	21,6133	0,00001
pH	2	43,3496093	21,6748046	0,3126	0,73722
% Cel.	1	631,3716570	631,3716570	9,1070	0,00405
I.Tempo	2	73,6384179	36,8192089	0,5311	0,59625
Tem. x pH	4	485,8578233	121,4644558	1,7520	0,15001
Tem. x %Cel.	2	360,7892855	180,3946427	2,6020	0,08094
Tem. x I.Tempo	4	33,9642464	8,4910616	0,1225	0,97098
pH x %Cel.	2	2728,0182328	1364,0091164	19,6747	0,00001
pH x I.Tempo	4	141,5970484	35,3992621	0,5106	0,73105
%C x I.Tempo	2	42,6289025	21,3144513	0,3074	0,74091
Tem. x pH x %Cel.	4	4422,8806204	1105,7201551	15,9491	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	262,8068200	32,8507525	0,4738	0,86996
pH x %C x I.Tempo	4	305,8762672	76,4690668	1,1030	0,36406
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	317,1411273	39,6423409	0,5718	0,79766
Resíduo	58	4021,0311472	69,3281232		
TOTAL	107	16867,7762308			

Média geral = 94,480840

Coeficiente de Variação = 8,813%

Tabela 29. Análise de variância para os teores de zinco na água da suspensão de leve duros.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	11341,9916599	5670,9958200	65,5192	0,00001
pH	2	71947,2393197	35973,6196599	415,6172	0,00001
% Cel.	1	25,1218791	25,1218791	0,2902	0,59864
I.Tempo	2	1969,4626194	984,7313097	11,3770	0,00019
Tem. x pH	4	138872,5935059	34718,1483765	401,1122	0,00001
Tem. x %Cel.	2	75963,4194859	37981,7097430	438,8174	0,00001
Tem. x I.Tempo	4	2749,2317427	687,3079937	7,9407	0,00001
pH x %Cel.	2	68924,1917474	34462,0958737	398,1539	0,00001
pH x I.Tempo	4	2018,9712756	504,7428189	5,8315	0,00076
%C x I.Tempo	2	4942,1205678	2471,0602839	28,5491	0,00001
Tem. x pH x %Cel.	4	77741,4048439	19435,3512110	224,5441	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	4223,5603299	527,9450412	6,0996	0,00005
pH x %C x I.Tempo	4	3526,1124225	881,5281056	10,1846	0,00002
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	4332,0383365	541,5047921	6,2562	0,00004
Resíduo	58	5020,1727922	86,5547033		
TOTAL	107	473597,6325284			

Média geral = 102,882900

Coefficiente de Variação = 9,043%

Tabela 30. Análise de variância para os teores de trealose da levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	145610,2328686	72805,1164343	221,5025	0,00001
pH	2	21762,2518860	10881,1259430	33,1048	0,00001
% Cel.	1	6674,3804452	6674,3804452	20,3062	0,00013
I.Tempo	2	113,8721093	56,9360546	0,1732	0,84238
Tem. x pH	4	23295,9724581	6323,9931145	19,2401	0,00001
Tem. x %Cel.	2	26,3280435	13,1640218	0,0401	0,96101
Tem. x I.Tempo	4	34269,9318756	8567,4829689	26,0657	0,00001
pH x %Cel.	2	72344,6731665	36172,3365832	110,0508	0,00001
pH x I.Tempo	4	6279,8822785	1569,9705696	4,7765	0,00245
%C x I.Tempo	2	855,5963183	427,7981591	1,3015	0,27930
Tem. x pH x %Cel.	4	157035,9557511	39258,9893778	119,4417	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	37536,6438357	4692,0804785	14,2752	0,00001
pH x %C x I.Tempo	4	17721,9511233	4430,4877808	13,4792	0,00001
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	23825,2574326	2978,1571791	9,0608	0,00001
Resíduo	58	19063,8770644	328,6875356		
TOTAL	107	568416,8084167			

Média geral = 103,603900

Coefficiente de Variação = 17,499%

Tabela 31. Análise de variância para os teores de glicogênio da levedura.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	8603,3245704	4301,6622852	24,5250	0,00001
pH	2	1503,7765033	751,8882517	4,2867	0,01796
% Cel.	1	1414,6886455	1414,6886455	8,0655	0,00629
I.Tempo	2	1322,3558129	661,1979064	3,7697	0,02808
Tem. x pH	4	10971,2589569	2742,8147392	15,6376	0,00001
Tem. x %Cel.	2	7537,1699361	3768,5849680	21,4858	0,00001
Tem. x I.Tempo	4	4291,9829789	1072,9957447	6,1175	0,00057
pH x %Cel.	2	4462,1962257	2231,0981128	12,7201	0,00010
pH x I.Tempo	4	6703,2794986	1675,8198747	9,5543	0,00004
%C x I.Tempo	2	1458,6420079	729,3210039	4,1581	0,02004
Tem. x pH x %Cel.	4	9289,3413133	2322,3353283	13,2403	0,00001
Tem. x pH x I.Tempo	8	9835,0120642	1229,3765080	7,0090	0,00002
pH x %C x I.Tempo	4	3178,8472434	794,7118108	4,5309	0,00330
Tem. x pH x %C x I.Tempo	8	7423,1499443	927,8937430	5,2902	0,00014
Resíduo	58	10173,1435269	175,3990263		
TOTAL	107	88168,2092284			

Média geral = 97,666300

Coeficiente de Variação = 13,564%

Tabela 32. Análise de variância para as porcentagens de AR dos vinhos.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	0,2131831	0,1065916	1316,1105	0,00001
pH	2	0,0433043	0,0216521	267,3438	0,00001
% Cel.	1	0,0081903	0,0081903	101,1272	0,00001
Tempo	3	0,0049507	0,0016502	20,3760	0,00001
Tem x pH	4	0,1524148	0,0381037	470,4753	0,00001
Tem x %Cel.	2	0,0088418	0,0044209	54,5857	0,00001
Tem. x Tempo	6	0,0012685	0,0002114	2,6105	0,02308
pH x %Cel.	2	0,0121081	0,0060541	74,7510	0,00001
pH x Tempo	6	0,0015316	0,0002553	3,1518	0,00822
%C x Tempo	3	0,0003649	0,0001216	1,5018	0,21940
Tem. x pH x %Cel.	4	0,0165834	0,0041459	51,1899	0,00001
Tem. x pH x Tempo	12	0,0014445	0,0001204	1,4863	0,14719
pH x %C x Tempo	6	0,0011724	0,0001954	2,4126	0,03389
Tem. x pH x %C x Tempo	12	0,0004339	0,0000362	0,4464	0,93884
Resíduo	78	0,0063172	0,0000810		
TOTAL	143	0,4721096			

Média geral = 0,389944

Coefficiente de Variação = 2,308%

Tabela 33. Análise de variância para as porcentagens de glicerol dos vinhos.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	0,2401267	0,1200633	692,1828	0,00001
pH	2	0,0162199	0,0081100	46,7551	0,00001
% Cel.	1	0,0129579	0,0129579	74,7045	0,00001
Tempo	3	0,1732251	0,0577417	332,8894	0,00001
Tem. x pH	4	0,0436687	0,0109172	62,9391	0,00001
Tem. x %Cel.	2	0,0025320	0,0012660	7,2987	0,00160
Tem. x Tempo	6	0,0235964	0,0040994	23,6337	0,00001
pH x %Cel.	2	0,0021986	0,0010993	6,3376	0,00319
pH x Tempo	6	0,0072457	0,0012076	6,9621	0,00004
%C x Tempo	3	0,0006346	0,0002115	1,2196	0,30781
Tem. x pH x %Cel.	4	0,0717872	0,0179468	103,4569	0,00001
Tem. x pH x Tempo	12	0,0060035	0,0005003	2,8843	0,00271
pH x %C x Tempo	6	0,0067377	0,0011229	6,4740	0,00006
Tem. x pH x %C x Tempo	12	0,0088490	0,0007458	4,2994	0,00010
Resíduo	78	0,0135296	0,0001735		
TOTAL	143	0,6304126			

Média geral = 0,733153

Coefficiente de Variação = 1,796%

Tabela 34. Análise de variância para os rendimentos (%) das fermentações.

Causas da Variação	GL	SQ	QM	Valor F	Prob. >F
Temper.	2	159,092778	79,5461389	285,6513	0,00001
pH	2	130,7874427	65,3937214	234,8298	0,00001
% Cel.	1	1,7542956	1,7542956	6,2997	0,01353
Tempo	3	70,7885992	23,5961998	84,7343	0,00001
Tem. x pH	4	131,2654228	32,8163557	117,8440	0,00001
Tem. x %Cel.	2	7,7743522	3,8871761	13,9589	0,00005
Tem. x Tempo	6	4,3443950	0,7240658	2,6001	0,02355
pH x %Cel.	2	45,6997332	22,8498666	82,0542	0,00001
pH x Tempo	6	2,5790018	0,4298336	1,5435	0,17448
%C x Tempo	3	0,5219825	0,1739942	0,6248	0,60495
Tem. x pH x %Cel.	4	47,7451508	11,9362877	42,8634	0,00001
Tem. x pH x Tempo	12	11,2849287	0,9404107	3,3770	0,00075
pH x %C x Tempo	6	3,5876191	0,5979365	2,1472	0,05662
Tem. x pH x %C x Tempo	12	11,3122666	0,9426889	3,3852	0,00074
Resíduo	78	21,7208847	0,2784729		
TOTAL	143	650,2583529			

Média geral = 86,596250

Coeficiente de Variação = 0,609%

Tabela 35. Valores de pH da suspensão de células de levedura em função dos tratamentos.

Temperatura	% Células	Tempo (h)			
		0	1,5	3	6
± 25°C	30	2,00	2,29	2,50	2,60
	40	2,00	2,68	2,82	3,02
	30	2,52	2,88	2,98	3,13
	40	2,46	2,98	3,01	3,12
	30	3,06	3,43	3,63	3,76
	40	3,02	3,43	3,63	3,84
30°C	30	2,05	2,46	2,70	2,93
	40	2,07	2,40	2,73	3,07
	30	2,53	3,08	3,15	3,44
	40	2,54	3,07	3,23	3,41
	30	3,05	3,46	3,73	3,95
	40	3,01	3,44	3,56	3,73
40°C	30	2,05	3,04	3,22	3,40
	40	2,04	3,20	3,43	3,63
	30	2,50	3,40	3,61	3,73
	40	2,49	3,43	3,63	3,81
	30	2,95	3,76	3,93	3,99
	40	3,01	3,66	3,88	3,95

Tabela 36. Número de células viáveis ($\times 10^8$) por mililitro de suspensão, em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	%	Cel.	Tempo (h)									
				0	média	1,5	média	3	média	6	média	6	média
Ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$)	2,0	30	28	29	25	27	23	20	22	22	20	21	23
			26	27	25		24	20	22		19	22	24
		40	36	40	32	36	33	37	-	34	43	40	31
			32	44	31		33	34	-		41	35	-
	2,5	30	34	30	20	27	38	27	22	29	28	27	21
			32	21	21		32	24	-		32	25	18
		40	41	36	32	35	36	32	31	32	33	29	39
			37	35	21		36	31	28		34	29	-
	3,0	30	29	28	29	28	37	30	30	32	35	28	22
			29	25	28		35	32	29		32	28	24
		40	40	40	35	39	43	38	36	39	40	39	-
			40	40	38		40	37	-		42	36	-
30°C	2,0	30	30	28	27	28	25	25	28	25	27	25	24
			30	29	23		25	25	24		26	25	24
		40	41	38	-	39	37	39	-	38	40	38	-
			41	37	-		38	-	-		35	37	-
	2,5	30	37	28	31	31	28	32	30	29	23	24	37
			35	28	27		28	31	26		23	25	22
		40	36	35	38	36	40	34	28	34	40	34	29
			36	34	-		40	32	30		40	32	31
	3,0	30	30	32	34	31	34	36	32	31	37	30	28
			30	32	28		34	28	31		35	30	31
		40	40	34	39	37	38	33	-	36	40	33	30
			30	32	-		40	34	-		40	35	31

Tabela 36. Número de células viáveis ($\times 10^8$) por mililitro de suspensão, em função dos tratamentos (Condição).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)									
			0		1,5		média		3		6	
40°C	2,0	30	39	37	40	38	32	31	32	28	31	36
			39	36	-	-	33	-	32	28	28	34
		40	39	48	-	41	36	40	38	40	-	46
			36	-	-	-	35	30	39	-	-	40
	2,5	30	37	29	33	32	34	29	25	19	17	26
			35	29	30	30	35	27	24	17	13	22
		40	40	40	40	39	42	40	37	39	-	40
			40	40	34	34	41	40	-	39	40	40
	3,0	30	29	39	28	31	28	27	26	29	27	38
			29	32	30	30	28	27	25	30	-	37
		40	46	43	-	45	40	32	30	40	37	39
			46	45	-	-	34	32	-	40	36	37

Tabela 37. Teores de fósforo na matéria seca de levedura (%) e na água de suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca de fermento (%)			Água ácida da suspensão (ppm)			
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
Ambiente (±25°C)	2,0	30	0,9438	0,8380	0,9088	0,9321	30	27	30
			0,9554	0,9088	0,9088	0,9321	26	26	29
		40	0,8622	0,8389	0,8389	0,9088	27	27	30
			0,9088	0,9438	0,8622	0,8655	27	29	29
	2,5	30	1,0490	1,049	1,049	0,9787	18	20	24
			0,9554	1,049	0,9554	0,9088	17	20	24
		40	0,9887	0,9785	0,9872	0,9650	24	34	25
			0,9887	0,9860	0,9650	0,9760	23	35	24
	3,0	30	0,6069	0,6991	0,5127	0,6758	18	24	25
			-	0,6991	0,6728	0,6758	15	24	25
		40	0,6625	0,6991	0,5826	0,6875	33	23	30
			0,7457	0,6292	0,5593	0,7224	31	22	28
30°C	2,0	30	1,1852	1,0952	1,0137	1,0952	25	36	40
			1,1852	1,0020	1,0719	0,9787	25	36	40
		40	0,8772	0,7690	0,6059	0,7274	29	38	42
			0,8272	0,7690	0,7277	0,7923	29	38	43
	2,5	30	0,6525	0,5127	0,6525	0,6175	38	42	49
			0,5127	0,6758	0,6175	0,6175	38	42	49
		40	0,8272	0,6292	0,7457	0,9088	42	47	55
			0,8272	0,5626	0,7457	0,9088	42	47	50
	3,0	30	0,6991	0,7457	0,9321	0,7457	12	11	14
			0,7690	0,7223	0,7457	0,8389	10	13	14
		40	1,1884	1,1418	0,9787	1,0952	67	63	95
			1,1316	1,0253	1,2117	0,9787	67	63	88

Tabela 37. Teores de fósforo na matéria seca de levedura (%) e na água de suspensão (ppm) em função dos tratamentos (Continuação)

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca de fermento(%)				Água ácida da suspensão(ppm)		
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
40°C	2,0	30	0,7274	0,6758	0,7341	0,7341	26	28	34
			0,8156	0,5826	0,5826	0,5243	33	30	34
		40	0,6758	0,6059	0,7274	0,7441	46	48	59
			0,6758	0,6758	0,5860	0,6758	47	47	56
	2,5	30	0,9088	0,8321	0,8739	0,8622	46	50	52
			0,8156	0,8739	0,9088	0,9321	41	50	52
		40	0,6991	0,6175	0,8389	0,6758	32	36	42
			0,6991	0,6175	0,6758	0,6758	29	36	42
	3,0	30	0,6625	0,5942	0,6874	0,7274	21	20	30
			0,7927	0,7690	0,6874	0,7274	19	23	29
		40	0,8156	0,8855	0,8389	0,7223	75	88	105
			0,8156	0,7223	0,8389	0,7574	75	88	111

Tabela 38. Teores de nitrogênio na matéria seca de levedura (%) e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca de fermento(%)			Água ácida da suspensão(ppm)			
			0	1,5	3	6	1,5	3	6
Ambiente (±25°C)	2,0	30	6,23	6,12	6,40	6,23	14	21	25
			6,23	6,16	6,40	6,23	18	21	25
		40	6,51	6,80	7,21	6,65	41	46	48
			6,86	6,92	7,21	6,65	41	46	48
	2,5	30	7,07	6,72	6,72	6,66	27	33	34
			7,07	6,72	6,72	6,66	27	33	34
		40	6,37	6,16	5,95	6,44	40	43	48
			6,37	6,16	5,95	6,44	40	44	48
	3,0	30	6,30	6,44	6,44	6,86	18	18	17
			6,72	6,58	6,30	7,14	18	19	19
		40	7,00	6,58	6,30	6,30	17	18	23
			7,14	6,58	6,16	6,44	17	18	23
30°C	2,0	30	6,93	6,79	7,00	7,00	25	26	31
			6,93	6,79	7,00	7,00	25	26	31
		40	6,96	6,86	6,58	6,44	22	26	29
			6,96	6,86	6,30	6,58	22	29	29
	2,5	30	6,44	6,72	6,72	6,44	29	29	34
			6,44	6,72	6,86	6,30	24	30	34
		40	6,75	6,65	6,58	6,72	36	38	38
			6,75	6,65	6,58	6,72	36	38	38
	3,0	30	5,74	7,00	6,58	6,44	15	15	15
			6,02	6,86	6,0	6,44	13	16	16
		40	6,70	6,65	6,65	6,65	30	33	39
			6,60	6,65	6,65	6,65	30	33	37

Tabela 38. Teores de nitrogênio na matéria seca de levedura (%) e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos (Continuação).

Temperatura	pH	° Cel.	Tempo (h)						Água ácida da suspensão(ppm)
			Matéria seca de fermento(%)						
			0	1,5	3	6	1,5	3	
40°C	2,0	30	6,85	6,71	6,71	6,85	20	21	29
			6,71	6,58	6,85	6,17	21	22	29
		40	6,44	6,02	6,16	6,16	32	37	44
			6,30	6,16	6,30	6,16	32	38	45
	2,5	30	6,16	6,30	6,58	6,30	21	23	28
			6,16	6,44	6,72	6,44	21	25	27
		40	6,30	6,44	6,86	6,44	27	31	30
			6,44	6,44	6,58	6,58	24	30	32
	3,0	30	6,86	6,58	6,58	6,86	17	18	23
			6,72	6,72	6,58	7,14	17	18	23
		40	6,44	6,16	6,44	6,86	40	53	72
			6,30	6,16	6,44	6,58	43	55	72

Tabela 39. Teores de potássio na matéria seca de levedura (%) e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento(%)				Água ácida da suspensão(ppm)		
			0	1,5	3	6	1,5	3	6
Ambiente (+25oC)	2,0	30	1,87	1,87	1,75	1,37	937	1000	962
			2,00	1,87	1,75	1,37	939	1000	962
		40	2,50	2,37	2,37	2,37	2000	2375	1875
			2,50	2,37	2,37	2,37	1875	2125	2125
	2,5	30	2,19	2,00	2,12	2,18	1625	1750	1750
			2,12	2,12	2,12	2,18	1625	1750	1815
		40	2,19	2,00	2,00	1,96	1875	1875	1937
			2,19	2,00	2,00	1,96	1875	1875	1937
	3,0	30	1,81	1,97	1,81	1,34	1000	1375	1375
			1,86	2,00	2,21	1,81	750	1250	1375
		40	1,55	1,81	2,00	1,96	1625	1375	1625
			1,62	1,84	1,95	1,96	1750	1250	1375
30oC	2,0	30	2,04	1,75	1,62	1,50	1445	1450	1519
			2,04	1,75	1,69	1,62	1445	1450	1519
		40	2,16	2,12	2,12	1,96	1325	1475	1550
			2,15	2,15	2,05	1,89	1337	1475	1600
	2,5	30	1,84	1,62	1,60	1,55	1250	1375	1500
			1,80	1,56	1,60	1,54	1250	1375	1500
		40	1,75	1,37	1,75	1,75	1325	1412	1550
			1,75	1,37	1,87	1,75	1325	1500	1450
	3,0	30	2,17	2,10	2,14	2,04	1000	1000	1125
			2,11	2,07	2,05	2,00	1000	1250	1125
		40	2,14	1,75	1,75	1,50	1880	1880	1970
			2,10	1,87	1,75	1,62	1894	1898	1970

Tabela 39. Teores de potássio na matéria seca de levedura (%) e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento (%)			Água ácida da suspensão (ppm)			
			0	1,5	3	6	1,5	3	6
40°C	2,0	30	2,37	1,76	1,44	1,66	1239	1287	1425
			2,22	1,91	1,65	1,60	1237	1287	1425
		40	1,99	1,85	1,59	1,84	1681	1781	1800
			1,99	1,87	1,70	1,84	1681	1781	1925
	2,5	30	2,31	2,26	2,09	1,99	1025	1150	1262
			2,31	2,21	2,04	1,99	1025	1200	1250
		40	2,40	1,99	2,10	1,81	1625	1775	1762
			2,40	1,99	2,16	1,84	1587	1750	1787
	3,0	30	2,00	2,10	1,97	1,91	1250	1125	1500
			2,12	2,02	1,94	1,85	1125	1375	1375
		40	2,35	2,09	2,24	2,12	1612	1787	1925
			2,47	1,62	2,24	2,10	1600	1812	1925

Tabela 40. Teores de magnésio na matéria seca de levedura e na água de suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento(%)				Água ácida da suspensão (ppm)		
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
Ambiente (±25°C)	2,0	30	2053	1619	2167	2040	278	239	271
			1989	1976	1912	2053	191	266	257
		40	1300	1798	1836	1530	122	340	322
			1441	1696	1810	1632	322	301	298
	2,5	30	2167	2002	1951	1517	94	95	107
			1772	1900	2142	1517	96	106	124
		40	2005	1976	2005	1898	316	217	305
			1989	1898	1898	1898	316	250	300
	3,0	30	1346	1581	1417	1713	163	157	176
			1560	1785	2060	1713	110	168	167
		40	1377	1815	1897	2009	285	175	217
			1815	1734	1632	2060	259	174	191
30°C	2,0	30	1632	1469	1153	1703	265	265	174
			2009	1826	1255	1163	265	265	174
		40	1969	1877	1816	1856	235	202	203
			1969	1765	1969	1591	222	229	242
	2,5	30	1581	1499	1336	1071	196	181	205
			1364	1632	1407	1285	182	198	193
		40	1204	1214	1336	1591	236	235	261
			1204	1071	1550	1591	237	268	236
	3,0	30	1009	1234	1612	1224	189	170	160
			1082	836	1225	1448	132	225	141
		40	1765	1867	1979	1632	273	233	294
			2142	2071	1775	1295	273	233	294

Tabela 40. Teores de magnésio na matéria seca de levedura e na água de suspensão (ppm) em função dos tratamentos. (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento(%)				Água ácida da suspensão (ppm)		
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
40°C	2,0	30	1775	1785	1632	1785	182	186	176
			1918	1979	1907	1795	189	193	176
		40	1489	1856	1856	1867	225	270	248
			1489	1560	1856	1867	226	245	266
	2,5	30	1509	1938	1612	1510	136	160	145
			1489	1540	1550	1652	136	166	145
		40	1509	1163	1673	2020	267	229	226
			734	1734	1826	1653	235	236	226
3,0	30	1805	1520	2060	1785	182	131	177	
		1550	2091	1642	1867	138	157	179	
	40	1540	1774	1499	1663	221	216	271	
		1326	1622	1540	1958	257	238	268	

Tabela 41. Teores de cálcio na matéria seca de levedura e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento (%)			Água ácida da suspensão (ppm)			
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
Ambiente (± 25°C)	2,0	30	976	1244	1506	1849	259	349	301
			1581	1299	1217	1210	319	312	335
		40	1478	1286	1547	1443	220	211	223
			1659	1341	1512	1169	194	195	204
	2,5	30	907	839	653	584	139	94	93
			839	839	873	554	84	89	104
		40	995	950	730	728	37	421	370
			995	920	730	730	37	369	370
	3,0	30	1446	1573	1325	1232	168	99	184
			1628	1683	1644	1232	109	111	182
		40	1336	1331	1540	1083	137	218	256
			1716	1210	1395	1226	92	195	208
	2,0	30	1518	605	495	825	274	249	261
			1364	605	605	352	274	249	261
		40	1639	1539	1506	935	71	187	107
			1639	1435	1419	1061	61	166	281
	2,5	30	2205	1331	1501	1457	154	89	164
			2337	1397	1386	1985	145	127	112
		40	1716	880	1122	1078	252	292	310
			1716	836	1111	1078	252	321	277
	3,0	30	3102	1192	1358	1309	133	112	184
			3300	1166	1056	1144	155	171	145
		40	1199	1243	858	550	233	212	272
			1221	1408	825	539	233	212	296

Tabela 41. Teores de cálcio na matéria seca de levedura e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			Matéria seca do fermento (%)			Água ácida da suspensão (ppm)			
			0	1,50	3	6	1,50	3	6
40°C	2,0	30	1215	1281	1683	1397	130	105	118
			1204	1419	1342	1276	106	163	118
		40	1193	1727	1732	1815	151	201	237
			1193	1518	1732	1435	181	225	246
	2,5	30	1199	1628	1617	1507	161	143	132
			1281	1540	1430	1848	191	143	172
		40	1430	928	1392	1392	254	241	243
			1430	1287	1392	1392	254	264	218
	3,0	30	1226	1160	1281	1331	152	138	62
			1666	1430	1067	1259	82	82	135
		40	1496	1660	1540	1419	265	260	240
			1391	1287	1551	1397	250	263	212

Tabela 42. Teores de Zn na matéria seca da levedura e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)									
			Matéria seca do fermento(%)					Água ácida da suspensão (ppm)				
			0	1,50	3	6	6	1,50	3	6	6	6
Ambiente (± 25°C)	2,0	30	209	167	227	231	231	7	11	7	7	7
			215	194	194	226	226	7	12	7	7	7
		40	213	210	251	214	214	5	10	18	18	18
			240	225	205	200	200	8	8	18	18	18
	2,5	30	488	435	425	417	417	9	8	8	8	8
			421	460	451	416	416	8	8	8	8	8
		40	281	271	272	266	266	36	38	38	38	38
			284	271	268	270	270	36	38	36	36	36
	3,0	30	188	192	179	162	162	2	4	5	5	5
			187	193	179	188	188	3	4	5	5	5
		40	281	271	272	266	266	6	4	9	9	9
			284	271	268	270	270	6	6	7	7	7
30°C	2,0	30	244	192	176	211	211	24	29	21	21	21
			319	179	202	189	189	24	29	21	21	21
		40	329	320	321	312	312	11	11	10	10	10
			329	319	314	310	310	12	11	12	12	12
	2,5	30	237	227	227	217	217	10	9	8	8	8
			233	225	221	226	226	8	8	10	10	10
		40	151	112	129	120	120	7	7	10	10	10
			151	118	134	120	120	7	8	10	10	10
	3,0	30	254	275	311	292	292	7	5	4	4	4
			251	270	266	281	281	6	7	5	5	5
		40	484	267	374	451	451	9	10	13	13	13
			484	407	294	247	247	9	10	13	13	13

Tabela 42. Teores de Zn na matéria seca da levedura e na água da suspensão (ppm) em função dos tratamentos (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						Água ácida da suspensão (ppm)
			Matéria seca do fermento(%)						
			0	1,50	3	6	1,50	3	
40°C	2,0	30	320	315	333	331	9	9	9
			321	320	338	331	9	9	9
		40	272	274	277	286	11	12	12
			272	271	275	275	11	12	12
	2,5	30	349	362	346	355	7	8	9
			353	356	347	373	8	8	9
		40	284	237	285	274	10	10	14
			284	281	286	272	11	10	13
	3,0	30	324	316	325	329	5	5	5
			321	328	323	333	9	5	5
		40	305	312	287	293	12	12	13
			302	282	282	300	12	13	12

Tabela 43. Teores de trealose e glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matéria seca) da levedura em função dos tratamentos.

Temperatura	pH	% Cel.	Trealose ($\mu\text{g}/\text{mg}$ matéria seca)				Glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ matéria seca)			
			0	1,5	3	6	0	1,5	3	6
Ambiente (+ 25°C)	2,0	30	148,00	144,00	111,16	93,30	115,83	113,75	139,58	117,50
			147,82	143,77	97,92	102,00	115,83	113,75	139,58	117,50
		40	118,33	87,86	63,33	64,28	105,42	106,46	107,50	94,58
			117,80	86,20	64,00	63,97	100,83	106,46	94,58	94,58
	2,5	30	132,55	127,33	27,89	105,78	78,75	82,50	70,00	70,00
			126,02	115,29	24,70	105,78	78,75	75,00	91,50	90,42
		40	171,85	157,21	132,81	152,33	138,33	120,00	89,17	108,33
			168,36	149,30	124,44	150,94	138,33	119,52	89,17	99,85
	3,0	30	49,11	27,61	13,97	45,52	77,92	81,25	83,33	56,50
			56,58	37,26	12,64	47,58	83,33	81,25	93,33	73,50
		40	73,03	133,67	28,49	43,06	83,33	71,25	64,58	92,08
			60,63	138,49	34,49	48,92	78,33	72,82	68,75	75,42
30°C	2,0	30	174,60	125,60	131,95	124,19	65,00	71,67	70,83	79,16
			173,70	125,60	124,89	125,48	80,83	71,67	70,83	76,67
		40	37,40	80,45	127,72	100,20	93,33	82,50	90,83	76,67
			33,87	80,45	108,67	82,26	101,67	88,75	90,83	76,67
	2,5	30	24,19	21,57	15,24	32,42	134,17	87,50	89,17	92,08
			24,15	20,54	19,88	27,90	117,92	86,67	78,75	88,83
		40	51,92	61,56	45,98	96,79	109,59	107,50	107,50	124,17
			53,37	53,40	47,47	96,92	120,00	115,82	108,33	113,75
	3,0	30	23,14	32,18	96,18	55,32	98,33	74,17	65,83	64,58
			27,48	67,98	104,86	59,30	93,33	68,33	77,50	75,00
		40	132,25	84,16	134,92	138,94	133,33	121,67	130,42	121,67
			136,93	122,24	126,91	138,94	133,33	127,62	130,42	121,67

Tabela 43. Teores de trealose e glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de matéria seca) da levedura em função dos tratamentos (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Trealose ($\mu\text{g}/\text{mg}$ matéria seca)				Glicogênio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ matéria seca)			
			0	1,5	3	6	0	1,5	3	6
40°C	2,0	30	106,20	35,07	26,72	39,07	77,50	70,83	75,42	62,50
			123,96	56,11	28,05	37,74	78,75	75,00	76,25	62,08
		40	125,78	131,25	135,26	103,90	66,25	66,25	76,25	70,83
			136,82	135,26	125,78	99,80	66,26	66,26	67,50	63,33
	2,5	30	79,11	96,97	88,96	22,60	63,33	54,17	65,83	60,83
			101,00	96,97	96,98	20,42	59,17	46,67	65,83	68,33
		40	122,50	95,83	86,67	68,75	32,67	23,36	61,17	90,82
			111,67	94,58	86,67	81,67	37,83	38,19	43,75	96,02
	3,0	30	94,52	74,45	101,23	100,27	57,08	60,83	52,92	63,33
			81,75	97,72	80,47	98,35	57,08	60,83	52,92	57,08
		40	110,79	75,55	110,79	127,51	92,08	89,58	92,92	85,00
			117,96	91,68	117,36	126,32	89,58	92,92	92,92	78,33

Tabela 44. Teores de açúcar residual (AR) e glicérol (g/100ml) no vinho das fermentações nas quais foram utilizados os fermentos tratados.

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)							
			AR (%)				Glicerol (%)			
			0	1,5	3	6	0	1,5	3	6
Ambiente (± 25°C)	2,0	30	0,305	0,305	0,300	0,324	0,870	0,710	0,680	0,680
			0,295	0,305	0,324	0,285	0,885	0,691	0,720	0,662
		40	0,320	0,310	0,310	0,310	0,849	0,730	0,730	0,730
			0,320	0,320	0,310	0,310	0,849	0,730	0,730	0,730
	2,5	30	0,320	0,310	0,320	0,320	0,850	0,708	0,727	0,737
			0,310	0,310	0,310	0,320	0,809	0,708	0,719	0,719
		40	0,320	0,320	0,320	0,320	0,800	0,749	0,738	0,712
			5,320	0,320	0,320	0,320	0,800	0,749	0,738	0,712
	3,0	30	0,428	0,428	0,436	0,420	0,823	0,723	0,723	0,723
			0,456	0,440	0,436	0,430	0,833	0,723	0,723	0,723
		40	0,455	0,433	0,433	0,438	0,878	0,712	0,712	0,712
			0,455	0,433	0,433	0,438	0,878	0,712	0,712	0,712
30°C	2,0	30	0,320	0,320	0,320	0,310	0,680	0,600	0,573	0,600
			0,320	0,320	0,310	0,310	0,651	0,600	0,581	0,600
		40	0,425	0,408	0,425	0,408	0,728	0,687	0,681	0,699
			0,425	0,408	0,418	0,408	0,728	0,687	0,681	0,699
	2,5	30	0,397	0,357	0,357	0,393	0,728	0,699	0,696	0,699
			0,381	0,357	0,367	0,393	0,728	0,699	0,681	0,699
		40	0,416	0,396	0,400	0,406	0,788	0,694	0,707	0,757
			0,422	0,396	0,396	0,412	0,801	0,757	0,701	0,707
	3,0	30	0,372	0,368	0,368	0,364	0,699	0,687	0,670	0,606
			0,382	0,368	0,364	0,364	0,699	0,682	0,682	0,647
		40	0,380	0,330	0,367	0,348	0,720	0,601	0,620	0,620
			0,361	0,330	0,338	0,348	0,720	0,601	0,620	0,620

Tabela 44. Teores de açúcar residual (AR) e glicérol (g/100ml) no vinho das fermentações nas quais foram utilizados os fermentos tratados. (Continuação).

Temperatura	pH	% Cel.	Tempo (h)						
			AR (%)			Glicérol (%)			
			0	1,5	3	6	0	1,5	3 6
40°C	2,0	30	0,424	0,424	0,424	0,424	0,833	0,797	0,773 0,773
			0,424	0,424	0,424	0,424	0,833	0,797	0,773 0,773
		40	0,441	0,424	0,424	0,424	0,773	0,707	0,707 0,707
			0,441	0,424	0,424	0,424	0,772	0,707	0,707 0,707
	2,5	30	0,508	0,460	0,422	0,476	0,781	0,717	0,717 0,764
			0,488	0,460	0,422	0,460	0,717	0,717	0,717 0,764
		40	0,488	0,470	0,492	0,468	0,833	0,787	0,772 0,773
			0,504	0,468	0,468	0,468	0,833	0,787	0,773 0,773
	3,0	30	0,449	0,441	0,424	0,424	0,821	0,755	0,743 0,743
			0,449	0,441	0,424	0,424	0,821	0,755	0,743 0,743
		40	0,489	0,423	0,423	0,419	0,878	0,849	0,800 0,776
			0,489	0,423	0,423	0,419	0,878	0,849	0,816 0,776

Tabela 45. Grau alcoólico e rendimento da fermentação em função do tratamento prévio do fermento.

Temperatura	Tempo (h)					
	0		1,3		3	
	grau alcoól. (g/100ml)	rend. %	grau alcoól. (g/100ml)	rend. %	grau alcoól. (g/100ml)	rend. %
Ambiente (± 25°C)	30	7,13	81,82	87,82	7,47	86,82
		7,13	82,70	88,64	7,40	86,00
		7,54	87,69	89,07	7,63	88,98
		7,54	87,75	88,16	7,63	88,86
	40	7,40	85,98	87,79	7,54	87,75
		7,40	85,87	87,69	7,54	87,88
		7,38	86,58	87,72	7,49	87,70
		7,38	86,24	87,83	7,49	87,67
	30	7,30	82,25	84,55	7,26	82,83
		7,32	82,20	84,40	7,26	82,81
		7,78	82,29	83,46	7,88	84,06
		7,57	80,86	83,38	7,88	84,10
30°C	30	7,54	88,84	88,75	7,53	88,58
		7,54	88,83	88,85	7,53	88,74
		7,13	88,68	88,15	7,22	88,20
		7,13	88,68	87,33	7,22	87,95
	40	7,24	88,15	88,67	7,40	90,22
		7,24	88,12	88,66	7,40	90,18
		7,64	85,08	86,36	7,96	87,76
		7,64	84,36	87,73	7,96	88,11
	30	6,59	85,80	87,47	6,72	87,69
		6,59	85,66	87,47	6,72	87,06
		7,50	88,05	90,65	7,62	89,65
		7,50	88,22	91,22	7,62	89,63
3,0	40					