EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE N, P, MG, MN E ZN NA MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

EDVALDO ALBERTO ZAGO

Eng^o-Agrônomo - Mestre

Orientador: Prof. Dr. HENRIQUE VIANNA DE AMORIM

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Agronomia - Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
- 1982 -

À minha esposa

MARTA

O F E R E Ç O

Às minhas filhas

JULIANA

e

MARCELE

D E D I C O

Ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim

Ao Prof. Dr. Francisco Krugg

Ao Prof. Dr. Antonio Roque Dechen

À Prof.^a Dr.^a Clarice Demetrius

Aos Sr.^s Antonio Carlos Travaoli

Antonio Carlos Fernandes

Luiz Lucatti

As Sr.^{tas} Sueli Aparecida de Oliveira

Sandra Cecília Miano

Lourdes Aparecida Dário

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da E. S. A. "Luiz de Queiroz" - USP.

À Fermentec S/C Ltda. Assessoria em Fermentação Alcoólica

À Usina Santa Elisa , Usina da Pedra e a Companhia Açucareira Vale do Rosário

Ao Departamento de Química da E. S. A. "Luiz de Queiroz" - USP.

Ao Setor de Radioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA)

Ao Setor de Bioquímica do Departamento de Química da E. S. A. "Luiz de Queiroz" - USP

Ao Setor de Nutrição Mineral do Departamento de Química da E. S. A. "Luiz de Queiroz" - USP

Ao Departamento de Matemática e Estatística da E.S.A. "Luiz
de Queiroz" - USP

SINCEROS AGRADECIMENTOS

I N D I C E

	Pág.
RESUMO	vi
SUMMARY	ix
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	3
3 - MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 - Material	14
3.1.1 - Mosto	14
3.1.2 - Análises do xarope e do melaço	15
3.1.3 - Quantidade de sais nos mostos 2 e 4% de ART após a diluição do xarope e do melaço	15
3.1.4 - Sais utilizados	16
3.1.5 - Equipamentos para a condução do experimento	17
3.1.6 - Leveduras utilizadas	18
3.2 - Métodos	19
3.2.1 - Determinação de ART no mosto, melaço, xarope e vinho	19
3.2.2 - Determinação da quantidade de fermento produzido	22

	Pág.
3.2.3 - Determinação da porcentagem de viabilidade e brotamento das leveduras e carga microbiana	23
3.2.4 - Determinação dos elementos minerais	25
3.2.5 - Condução dos experimentos	25
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 - Efeito da Suplementação de Vários Elementos em Mosto de Xarope e Melaço na Multiplicação das Leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 7 e 22 horas, sob Arejamento Constante	32
4.2 - Efeito da Suplementação de Nitrogênio e Fósforo em Diferentes Níveis, em Mosto de Xarope, na Multiplicação das Leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A	54
4.3 - Relação entre Porcentagem de Brotamento e Matéria Seca Produzida	72
5 - CONCLUSÕES	76
6 - BIBLIOGRAFIA	79
7 - APÊNDICE	88

ÍNDICE DE TABELAS

TABELAS		Pág.
1	Efeito na suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação de levedura Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 07 horas sob arejamento constante	89
2	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação de levedura Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante	90
3	Porcentagem da viabilidade das células Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, multiplicados em mosto de xarope suplementado com vários elementos	91
4	Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, multiplicadas em mosto de xarope suplementados com vários elementos	92
5	Teor de ART no vinho obtido na multiplicação de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, em mosto de xarope suplementados com vários elementos, após 22 horas sob arejamento constante ..	93
6	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 07 horas sob arejamento constante	94
7	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante	95

TABELAS

8	Porcentagem de viabilidade das células Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos ..	96
9	Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos	97
10	Análise mineral da levedura Fleischmann, multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos	98
11	Análise mineral da levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos	99
12	Análise mineral da levedura M-300-A multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos	100
13	Análise mineral da levedura Fleischmann multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos	101
14	Análise mineral da levedura IZ-1904 multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos	102
15	Análise mineral da levedura M-300-A multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos	103

TABELA

Pág.

16	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope, na multiplicação da levedura Fleischmann, após 07 horas sob arejamento constante	104
17	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope, na multiplicação da levedura Fleischmann, após 22 horas sob arejamento constante	105
18	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura IZ-1904, após 07 horas sob arejamento constante	106
19	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura IZ-1904, após 22 horas sob arejamento constante	107
20	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura M-300-A, após 07 horas sob arejamento constante	108
21	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante	109
22	Teores de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura Fleischmann, em mosto de xarope <u>su</u> plementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	110

TABELAS

pág.

23	Teor de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura IZ-1904, em mosto de xárope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	111
24	Teor de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura M-300-A, em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante .	112
25	Porcentagem de viabilidade das células da levedura Fleischmann, multiplicadas em mosto de xarope suplementados com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	113
26	Porcentagem de viabilidade das células da levedura IZ-1904 , multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	114
27	Porcentagem de viabilidade das células da levedura M-300-A, multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	115
28	Porcentagem de brotamento em células de levedura Fleischmann multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante	116

TABELAS

Pág.

29	Porcentagem de brotamento em células de levedu <u>ra</u> s IZ-1904, multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogê <u>ni</u> o e fósforo sob arejamento constante, após 22 horas	117
30	Porcentagem de brotamento em células de levedu <u>ra</u> s M-300-A, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogê <u>ni</u> o e fósforo sob arejamento constnate, após 22 horas	118
31	Teores de minerais da levedura Fleischmann mul <u>ti</u> plicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	119
32	Teores de minerais da levedura IZ-1904 multi <u>pli</u> cada em mosto de xarope suplementado com di <u>fe</u> rentes níveis de nitrogênio e fósforo	120
33	Composição mineral da levedura M-300-A, multi <u>pli</u> cada em mosto de xarope suplementado com di <u>fe</u> rentes níveis de nitrogênio e fósforo	121
34	Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento em levedura Fleischmann	122
35	Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento em levedura IZ-1904	123
36	Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento em levedura M-300-A	124

TABELAS

Pág.

37	População bacteriana após a multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante	125
----	--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS		Pág.
1	Multiplicação do fermento em escala de laboratório	17
2	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 07 e 22 horas sob arejamento constante (1. ^a multiplicação)	34
3	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 07 e 22 horas sob arejamento constante (2. ^a multiplicação)	35
4	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 07 e 22 horas sob arejamento constante (1. ^a multiplicação)	36
5	Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 07 e 22 horas sob arejamento constante (2. ^a multiplicação)	37
6	Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos após 22 horas, sob arejamento constante	42
7	Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melaço suplementado com vários elementos após 22 horas, sob arejamento constante	43

FIGURAS

Pág.

8	Teores de nitrogênio nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>xa</u> rope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	45
9	Teores de nitrogênio nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>me</u> laço suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	45
10	Teores de potássio nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>xa</u> rope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	47
11	Teores de potássio nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>me</u> laço suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	47
12	Teores de fósforo nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>xa</u> rope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	49
13	Teores de fósforo nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de <u>me</u> laço suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação somados)	49

FIGURAS

Pág.

14	Teores de magnésio nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xa rope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação soma- dos)	50
15	Teores de magnésio nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de me laço suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação soma- dos)	50
16	Teores de zinco nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xa rope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação soma- dos)	52
17	Teores de zinco nas leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de me laço suplementado com vários elementos (após 22 horas; material de 1. ^a e 2. ^a multiplicação soma- dos)	52
18	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósfo- ro em diferentes níveis, em mosto de xarope na multiplicação da levedura Fleischmann, após 07 e 22 horas sob arejamento constante	55
19	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósfo- ro em diferentes níveis, em mosto de xarope na multiplicação da levedura IZ-1904, após 07 e 22 horas sob arejamento constante	56

FIGURAS

Pág.

20	Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope na multiplicação da levedura M-300-A após 07 e 22 horas, sob arejamento constante	57
21	Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicados em mosto de xarope, suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, sob arejamento constante, após 22 horas	60
22	Teor de nitrogênio na levedura Fleischmann, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	62
23	Teor de nitrogênio na levedura IZ-1904 , multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	62
24	Teor de nitrogênio na levedura M-300-A , multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	63
25	Teor de fósforo na levedura Fleischmann, multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	64
26	Teor de fósforo na levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope suplementado, com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	64
27	Teor de potássio na levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope, suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	66

FIGURAS

Pág.

28	Teor de potássio na levedura M-300-A, multipli <u>ca</u> da em mosto de xarope, suplementado com dife <u>re</u> ntes níveis de nitrogênio e fósforo	66
29	Teor de magnésio na levedura Fleischmann, multi <u>p</u> licada em mosto de xarope suplementado, com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	67
30	Teor de magnésio na levedura M-300-A multipli <u>ca</u> da em mosto de xarope suplementado com dife <u>re</u> ntes níveis de nitrogênio e fósforo	67
31	Teor de manganês na levedura IZ-1904, multipli <u>ca</u> da em mosto de xarope suplementado com dife <u>re</u> ntes níveis de nitrogênio e fósforo	69
32	Teor de manganês na levedura M-300-A multipli <u>ca</u> da em mosto de xarope, suplementado com di <u>f</u> erentes níveis de nitrogênio e fósforo	69
33	Teor de zinco na levedura IZ-1904 multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo	71
34	Relação entre matéria seca e porcentagem de bro <u>t</u> amento na levedura Fleischmann	73
35	Relação entre matéria seca e porcentagem de bro <u>t</u> amento na levedura M-300-A	74
36	Relação entre matéria seca e porcentagem de bro <u>t</u> amento na levedura IZ-1904	75

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS USADOS

AR	açúcar redutor
ART	açúcar redutor total
Ca	cálcio
C.V.	Coeficiente de Variação
DNA	ácido desoxiribonucléico
g	grama
K	potássio
l	litro
Mg	magnésio
ml	mililitro
Mn	manganês
N	nitrogênio
P	fósforo
ppm	partes por milhão
P/V	peso por volume
RNA	ácido ribonucleico
Zn	zinco

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE N , P , Mg , Mn E Zn NA MULTIPLICAÇÃO DE LEVEDURAS INDUSTRIAIS

EDVALDO ALBERTO ZAGO

HENRIQUE VIANNA DE AMORIM
Orientador

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a importância da suplementação dos elementos nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês e zinco em mosto de xarope (caldo de cana concentrado) e melaço, bem como os níveis desses elementos, para a multiplicação das leveduras Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*), IZ-1904 (*Saccharomyces uvarum*); M-300-A (híbrido das leveduras IZ-671 e IZ-672, ambas *Saccharomyces cerevisiae*).

As leveduras eram inoculados em mostos de xarope e melaço diluídos à 2 e 4% de açúcar redutor total, com e sem a suplementação dos elementos testados.

A inoculação era feita em 60 ml de mosto 2%. Após três horas em arejamento constante eram adicionados mais 60 ml de mosto 4% de ART. Após três horas novamente 120 ml de mosto 4% de ART, eram adicionados e deixava-se arejando

até se completar 22 horas.

Outro experimento foi feito variando-se as concentrações de nitrogênio e fósforo e o procedimento foi semelhante ao acima descrito, após a inoculação das leveduras.

Foram analisados nos tratamentos em questão os teores de matéria seca das leveduras, porcentagem de brotamento, viabilidade e análise dos teores de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco, assim como eram realizadas contagens de bactérias ao microscópio com o objetivo de controlar a infecção.

O nitrogênio foi o elemento cuja deficiência mais evidenciou o decréscimo na produção de matéria seca das leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A, tanto em mosto de xarope quanto no de melaço. As exigências quanto à nitrogênio pelas leveduras foram maiores em mosto de xarope que em mosto de melaço.

Em mosto de xarope, a maior quantidade de massa celular foi obtida quando o mosto era suplementado com 400 ppm de N.

O fósforo também, quando em baixa concentração afetou a produção de matéria seca das leveduras, embora de uma forma menos drástica que o nitrogênio. As leveduras Fleischmann e M-300-A foram as mais exigentes em fósforo que a 1Z-1904.

As concentrações médias de magnésio (0,0167% em mosto de xarope e 0,051% em mosto de melaço) , manganês (2,62 ppm em mosto de xarope e 3,67 ppm em mosto de melaço), e zinco (3,47 ppm em mosto de xarope e 4,8 ppm em mosto de melaço) foram suficientes para a multiplicação, já que as doses acrescentadas não influenciaram a produção de matéria seca das três linhagens de levedura.

EFFECT OF N , P , Mg , Mn AND Zn CONCENTRATION ON THE GROWTH OF INDUSTRIAL YEASTS

EDVALDO ALBERTO ZAGO

HENRIQUE VIANA AMORIM
Adviser

SUMMARY

The objective of this work was to find out the effect of the addition in the must of syrup (cane juice concentrate) and molasses, of nitrogen, phosphorus, magnesium, manganese, and zinc on the growth of the industrial yeasts (*Saccharomyces* spp: Fleischmann, 12-1904 and M-300-A).

The yeast inocula were grown on two and four percent of total sugar of syrup and molasses must, with or without salts addition.

The inocula were introduced into 60 ml of must with 2% of total sugar. After three hours with constant air bubbling, more 60 ml of must with 4% total sugar were added. After 3 hours of the second must addition, 120 ml of must with 4% total sugar were finally added. Air bubbling was kept for 22 hours.

Following the same procedure, two experiments varying the levels of nitrogen and phosphorus were carried out.

The following determinations were made: yeast dry matter by optical density measurement (colorimetric method) ; budding and viability (light microscopy) ; nitrogen (Kjeldhal) , phosphorus (colorimetric) , potassium , magnesium, manganese and zinc (atomic absorption) contents and bacterial counting in all experiments as a matter of control.

Nitrogen was the most important element. The lack of addition of nitrogen salts in the must of syrup and molasses decreased the most the dry matter production in all yeast tested.

The dry matter production was higher in of molasses musts. On the other hand, the addition of 400 ppm of nitrogen in the syrup must was sufficient to achieve the best growth.

The addition of phosphorus also affected the yeast growth, although less drastically than the nitrogen supplementation.

The strains of Fleischmann and M-300-A yeasts were more exacting in phosphorus than the strain 1Z-1904.

The magnésium, manganese and zinc contents existing in the molasses and syrup were sufficient to promote the yeast growth, since there was not significant difference among the treatments with and without addition of these elements.

1 - INTRODUÇÃO

As leveduras requerem para o seu desenvolvimento diversos elementos fundamentais, tais como nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio e outros em proporções inferiores que são os micronutrientes (HERNANDEZ, 1960).

Além dos fatores nutricionais a taxa de crescimento das células de levedura depende das características da espécie de levedura e dos fatores, tais como pH , temperatura e grau de eficiência da aeração (WHITE, 1954).

No aspecto nutricional, poucos trabalhos tem sido feito no sentido de se determinar as reais necessidades de nutrientes das raças de leveduras usadas nas destilarias brasileiras, tanto no aspecto de multiplicação quanto no de fer-

mentação.

No início da safra quando as destilarias necessitam produzir grandes quantidades de massa celular, em tempo relativamente curto, muitas dúvidas ainda existem quanto ao uso de nutrientes nessa fase.

O assunto torna-se um pouco mais complexo quando se trata de destilarias anexas ou autônomas, uma vez que nas primeiras a matéria prima é o melaço que é rico em sais do que o xarope ou caldo de cana, que são as matérias primas utilizadas nas destilarias autônomas.

Tanto nas destilarias autônomas como nas anexas o tempo que se leva para obter uma quantidade de fermento compatível com a produção e o volume das dornas, é de um a dois meses. Este atraso na multiplicação provoca prejuízos relevantes e para diminuir-los muitas destilarias compram toneladas de fermento prensado tipo Fleischmann ou Itaiquara e adicionam às dornas para se iniciar a safra.

Portanto, o objetivo desse trabalho é estabelecer quais são os elementos minerais mais importantes na multiplicação das leveduras Fleischmann, 12-1904 e Valusepe Zanittas - 79 (M-300-A), bem como a sua concentração no meio para se obter uma multiplicação rápida e eficiente, já que os nutrientes minerais estão entre os fatores mais importantes para uma rápida multiplicação.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

Alguns trabalhos já tem sido feito no sentido de se estabelecer os elementos minerais importantes para o crescimento da levedura.

O nitrogênio é um elemento importantíssimo porque ele entra como constituinte de várias substâncias orgânicas presentes na levedura, tais como, aminoácidos, proteínas, enzimas, purinas e pirimidinas, pigmentos respiratórios (citocromos), vitaminas, lecitina, cefalina, etc. (WHITE, 1954).

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

Entre os sais de amônio, o sulfato de amônio tem se mostrado excelente para o crescimento dos diferentes gêneros de levedura.

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

MASSART e HORENS (1952) encontraram um aumento no consumo de oxigênio em levedura crescendo em meio contendo glicose mais sulfato de amônio quando comparada com a criada em meio contendo só glucose.

Em nossas condições FARAH ALVES e DEL BIANCO (1971) ; VAIRO *et alii* (1975) e DOS ANJOS e MAGALHÃES (1980), verificaram haver uma melhora na multiplicação de *Saccharomyces cerevisiae* obtida de fermento prensado, quando se adicionou sulfato de amônio em mosto de melaço de cana.

SALGADO e SARRUGE (1979) trabalhando com a levedura *Saccharomyces uvarum* , 1Z-1831 , encontraram um aumento do teor de proteína na levedura quando foi adicionado sulfato de amônio ao meio.

Também outros sais de amônio, tais como o mono, di e triamônio fosfato , bicarbonato e carbonato de amônio, acetato de amônio, tartarato de amônio, lactato de amônio e cloreto de amônio, são utilizados pela levedura com facilidade e bom aproveitamento (SUOMALAINEN e OURA, 1971).

Quanto ao nitrogênio na forma de nitrato tem sido usado com cautela em meios de crescimento de leveduras.

Segundo MORRIS (1958) a maioria das espécies compreendendo os gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora* e *Debaryomyces*, não assimilam nitrato, ao contrário de todas as espécies de *Hansenula*, que conseguem utilizá-lo.

SALGADO e SARRUGE (1979) trabalhando com *Saccharomyces uvarum*, 12-1831, encontraram um decréscimo no teor de proteína nas leveduras crescida em meio suplementado com nitrato de sódio quando a concentração de glucose foi elevada de 1 a 5 ou 10%.

Além dos compostos inorgânicos, inúmeros são os compostos orgânicos que podem servir como fonte de nitrogênio para as leveduras.

Entre os compostos orgânicos as leveduras podem obter nitrogênio dos aminoácidos (THORNE, 1933, 1941, 1949; SCHULTZ e POMPER, 1948; REED e PEPPLER, 1973), peptídeos (MORRIS, 1958), amidas, ácidos nucleicos e seus compostos derivados (THORNE, 1933; DI CARLO *et alii*, 1951).

Um composto orgânico que tem sido muito utilizado nas destilarias brasileiras é a uréia.

Segundo DUBOIS (1975) a levedura possui a enzima ureia amidoliase, que transforma a ureia em alofanato que posteriormente é decomposto em amônia e dióxido de carbono, sendo a amônia retida na forma de glutamato.

De fato, DOS ANJOS MAGALHÃES *et alii* (1980) encontraram uma melhoria na produção de proteína em fermento prensado Itaiquara quando suplementaram mosto de melaço com nitrogênio na forma de uréia ou sulfato de amônio.

Quanto as quantidades de nitrogênio usada na forma de sais inorgânicos, tem-se as seguintes afirmações.

FULMER *et alii* (1921) trabalhando em meio sintético encontrou que o cloreto de amônio, sulfato de amônio, nitrato de amônio e tartarato de amônio quando colocados no meio numa concentração de 0,06% (g/100 ml de meio) dão um ótimo de crescimento para a levedura.

FALCONE e ARRUDA (1964) relataram que a suplementação de nitrogênio em nossas indústrias é feita pela adição de 1 a 1,5 g de fosfato ácido de amônio por litro de mosto.

FULMER (1925) citado por Devereux e Tanner (1927) encontrou que o ótimo de concentração de NH_4Cl para o crescimento da levedura foi de 1,88 g/l de meio contendo 100 g de sacarose.

DOS ANJOS MAGALHÃES *et alii* (1980) trabalhando com mosto de melaço com 11,6% de açúcar redutor total, sem aeração, encontrou que concentrações de nitrogênio na forma de uréia ou sulfato de amônio, superiores a 0,6 g/l não é vantagem, quando se leva em conta somente a produção de proteína celular.

O fósforo também tem sido relatado como um elemento importante para o crescimento das leveduras.

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

STEVENINCK e BOOIS (1964) afirmam existir uma relação entre polifosfato e entrada de glucose na célula. Segundo STEVENINCK e ROTHSTEIN (1965) ele pode servir como um carregador fosforilado para o transporte ativo da glucose.

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

O fósforo é absorvido pela célula de levedura na forma do ânion monovalente ($H_2PO_4^-$). Se fosfato diácido de potássio é usado como fonte de fosfato, consideravelmente muito mais fosfato pode ser absorvido que quando se usa fosfato monoácido de sódio. (Rothstein, 1961, citado por SUOMALAINEN e OURA, 1971).

A um pH de 4,5 o íon fosfato se encontra totalmente na forma de $H_2PO_4^-$, sendo portanto esse pH muito bom para a absorção de fósforo pela levedura (AMORIM, 1977).

Um aspecto que chama atenção no metabolismo de polifosfato em levedura é a variabilidade no conteúdo do mesmo. Em células deficientes este pode não ser detectado. Por outro lado, com suprimento de fósforo a levedura pode acumular acima de 20% de seu peso em polifosfato (HAROLD, 1966). O fosfato pode ser armazenado na forma de polifosfato no vácuolo da célula (INDGE, 1968).

Quanto as quantidades de fósforo usadas na suplementação de meios de crescimento, FALCONE e ARRUDA (1964), relatam que na obtenção do pé de cuba em nossas indústrias, usa-se de 1 a 1,5 g de fosfato monoácido de amônio por litro de mosto de melaço, o que corresponde a 234 a 352 ppm de fósforo.

FULMER *et alii* (1921) trabalhando com meio sintético de crescimento de levedura, verificou que a concentração ótima de fosfato bibásico de potássio foi de 0,02% o que corresponde a 35,6 ppm de fósforo.

Compostos orgânicos podem ser defosforilados pela enzima fosfatase situada na parede celular e este grupo fosfato pode ser posteriormente absorvido pela levedura (AMORIM, 1977).

Outro elemento importante para o crescimento das leveduras é o magnésio (FULMER *et alii*, 1921, 1936, SUGATA e KOCH, 1926; DEVEREUX e TANNER, 1972; LESH *et alii*,

1938 ; OKOROKOV *et alii*, 1975 e LING E HOSENEY, 1977). O mag
nésio é ativador de várias enzimas e é de particular importân
cia na ativação das fosfato - transferases e um número grande
de descarboxilases (BOWEN, 1966, citado por Suomalain e Oura,
1971).

O magnésio pode sofrer a competição de vários
íons presentes no meio. Atribui-se ao cálcio um efeito inibi
dor tanto ao crescimento como à fermentação alcoólica, e este
efeito inibidor parece estar ligado à competição entre cálcio
e magnésio pelo mesmo sistema de transporte através do plasma
lema (AMORIM, 1977).

A competição entre potássio, rubídio, césio e
magnésio foi demonstrada por CONWAY e BEARY (1958). Entretan
to, quando o magnésio ocorre em grande quantidade no meio ex
terno e o potássio em quantidades normais, o potássio funcio
na como transportador de magnésio (CONWAY e BEARY, 1958).

Quando leveduras eram crescidas em meio contem
do quantidades mínimas de potássio e alta taxa de magnésio, o
crescimento das leveduras era completamente inibido por 3 - 4
dias, após o que o processo desenvolveu-se lentamente. As cé
lulas deficientes em magnésio ficavam alongadas e formavam lon
gas cadeias (CONWAY e BEARY, 1962).

O pH do meio influencia marcadamente a absorção
de potássio e magnésio. Segundo ROTHSTEIN (1954, 1955), cita
do por Conway e Beary (1958), na região de pH 3,5 a 4,5, mag

nêsio é ativamente absorvido na presença de fosfato, e o potâsio não teve nenhum efeito inibitório.

Quanto à fonte de magnêsio e quantidades empregadas, FALCONE e ARRUDA (1964) relataram que a fonte é o sulfato de magnêsio e a dosagem adicionada em mosto de melaço é de 0,2 a 0,25 gramas de sulfato de magnêsio pentahidratado por litro de mosto de melaço, o que corresponde de 22 a 27,5 ppm de magnêsio.

Entre os micronutrientes, zinco tem sido relatado como essencial para o crescimento das leveduras (Mc HARGUE e CALFEE, 1931 ; OLSON e JOHNSON, 1949 ; PECIULIS *et alii* , 1969 ; PECIULIS, 1973 ; ORTH e BUSHUK, 1973 ; LAWFORD e PIK, 1980.a ; LAWFORD e PIK, 1980.b).

O zinco tem funções fisiológicas importantes, tais como co-fator para numerosas metaloenzimas. Recentemente foi descoberto que as RNA polimerases são zinco metaloenzimas (AULD *et alii*, 1976 ; WANDZILAK e BENSON, 1977). Consequentemente a deficiência de zinco é claramente capaz de afetar o crescimento à nível de transcrição, bem como à nível de metabolismo intermediário (LAWFORD e PIK, 1980.b).

LAWFORD e PIK (1980.a) observaram que o meio deficiente em zinco resulta num pronunciado decréscimo no crescimento da cultura. Eles concluíram que a deficiência de zinco provoca um efeito deletério no metabolismo energético, embora ainda não seja entendido como ele influi nesse metabolis

mo.

Segundo PECIULIS *et alii* (1969) zinco aumentou a quantidade de nitrogênio total em levedura, em considerável extensão. Também a quantidade de aminoácidos livres na célula é reduzido mais que duas vezes na presença de zinco. A redução da quantidade de aminoácidos livres e o aumento dos aminoácidos ligados, provam que este elemento estimula a inclusão dos aminoácidos nas proteínas.

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

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

Outro aspecto interessante com respeito ao zinco é que as leveduras podem acumulá-lo em altas concentrações celulares.

LAWFORD e PIK (1980,a) relataram que células de *C. utilis* podem acumular zinco durante o crescimento e o elevado nível de zinco acumulado não foi inibitório ao crescimento.

FEDOROVA *et alii* (1978) encontrou alto teor de zinco em fermento de padaria com alta capacidade fermentativa.

Quanto às quantidades de zinco adicionadas, Mc HARGUE e CALFEE (1931) mostraram que zinco é capaz de estimular o crescimento em concentrações variando de 0,2 a 200 ppm. Entretanto, concentrações de 300 a 500 ppm inibem parcialmente o crescimento.

OLSON e JOHNSON (1949) trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae* y-30 observaram que elas requerem 1,2 ppm de Zn para o máximo de crescimento.

POPENKO e BAYAKHUMOV (1971) afirmam que 30 mg de $ZnSO_4$ por litro, aumenta o desenvolvimento de leveduras (Strain K₂ e 15).

Além do zinco, outro micronutriente que tem sido mencionado como importante para o crescimento das leveduras é o manganês (Mc HARGUE e CALFEE, 1931 ; LIMA, 1953 ; MORRIS, 1958 ; PECIULIS *et alii*, 1969 ; PECIULIS, 1972 ; ORTH e BUSHUK, 1973)

Entretanto, alguns trabalhos afirmam que o manganês não teve nenhum efeito no crescimento das leveduras (OLSON e JOHNSON, 1949 ; POPENKO e BAYAKUMOV, 1971 ; LING e HOSENEY, 1977).

Quanto ao papel fisiológico desempenhado pelo manganês nas leveduras, poucos são os trabalhos encontrados.

Segundo MORRIS (1958) o manganês está associado com a ativação da arginase.

A biossíntese de tiamina é fortemente ativada por manganês (PECIULIS, 1973).

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

Quanto a quantidade de manganês a ser empregada, pequenas concentrações promovem o crescimento das leveduras, mas quantidades excessivas são tóxicas. A concentração ótima de manganês é de 10 ppm (Mc HARGUE e CALFEE, 1931).

Também MORRIS, 1958 afirma ser 10 ppm a concentração de manganês que estimula o crescimento da levedura e só se percebe o efeito tóxico do manganês, quando dosagens acima de 500 ppm são usadas.

LIMA (1953) em condições de fermentação concluiu que as doses mais aconselháveis de sulfato de manganês são de 0,01 a 0,08 g/l, sendo ao redor de 0,01 g/l a dose ideal, em trabalho feito com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Hansen (12-2).

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAL

3.1.1 - MOSTO

Foram utilizados mostos preparados a partir de xarope e melaço provenientes da Usina Santa Elisa S. A., Sertãozinho, SP. . Essa matéria prima era diluída até as concentrações de 2 e 4% (g/100 ml) em ART. Em seguida os sais eram adicionados e o pH acertado à 4,0 com ácido sulfúrico.

O xarope foi obtido através da concentração do caldo de cana.

3.1.2 - TEORES DE MINERAIS NO XAROPE E NO MELAÇO

Elementos	Xarope	Melaço
N (%)	0,106	0,47
K (%)	1,37	4,58
Ca (%)	0,30	0,97
Mg (%)	0,28	0,97
P (ppm)	305	566
Mn (ppm)	44	70
Zn (ppm)	60	90
Brix (volume)	69,2	85,2
Art (%)	58,4	65,3

Esses resultados são médias de duas repetições.

3.1.3 - TEORES DE SAIS NOS MOSTOS 2 E 4% DE ART

3.1.3.1 - Mosto de xarope

Elementos	Mosto 2%	Mosto 4%
N (%)	0,0036	0,0072
K (%)	0,0468	0,0937
Ca (%)	0,0102	0,0204
Mg (%)	0,0095	0,0191
P (ppm)	10,4	20,8
Mn (ppm)	1,5	3,0
Zn (ppm)	1,9	4,0

3.1.3.2 - Mosto de melaço

Elementos	Mosto 2%	Mosto 4%
N (%)	0,014	0,028
K (%)	0,14	0,28
Ca (%)	0,029	0,059
Mg (%)	0,029	0,059
p (ppm)	17,3	34,6
Mn (ppm)	2,1	4,2
Zn (ppm)	2,7	5,5

3.1.2 - SAIS UTILIZADOS

Foram usados para suplementar os mostos os seguintes sais: fosfato monoácido de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, da Riedel-De Haen A. G. Seelze bei Hannover; sulfato de amônia (NH_4SO_4) , da J. T. Baker Produtos Químicos Ltda, SP; fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) e o sulfato de magnésio (MgSO_4) , ambos da Reagen - Quimibrás Indústrias Químicas Reunidas, RJ; sulfato de manganês hidratado $(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ da QEEL - Química Especializada Erich Loewenberg Ltda, SP; sulfato de zinco heptahidratado $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$ da Carlo Erba do Brasil.

Todos os sais utilizados tinham a especificação puro, pró-análise.

Esses sais, antes de serem usados, foram colocados em dessecador à vácuo, com sílica gel, durante uma semana.

3.1.3 - EQUIPAMENTOS PARA A CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO

A multiplicação das leveduras foi realizada em tubos de ensaio de 45 mm por 300 mm. O arejamento era fornecido por um compressor de ar (2,3 ml de ar / ml de mosto / minuto). O ar era esterilizado pela passagem em uma solução de dicromato de potássio à 2% , e depois lavado pela passagem em água destilada esterilizada (Figura 1).

Os tubos eram mantidos parcialmente imersos em banho maria à 32°C.

FIGURA 1 - Multiplicação do fermento em escala de laboratório

3.1.4 - LEVEDURAS UTILIZADAS

Foram utilizadas leveduras que atualmente são as mais empregadas nas destilarias de álcool brasileiras.

A Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) é um fermento de panificação, que acredita-se que seja a mais usada para a fermentação alcoólica no Brasil.

A IZ-1904 (não se tem certeza se é *Saccharomyces cerevisiae* ou *Saccharomyces uvarum*), foi selecionada no Departamento de Tecnologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, para tolerar altas temperaturas e as condições das destilarias brasileiras.

A Valusepe Zanitas - 79 (M-300-A - Genética) é a primeira levedura híbrida (IZ-671 x IZ-672, ambas *Saccharomyces cerevisiae*), produzida no Brasil para a produção de álcool. Foi obtida no Departamento de Genética da E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP, em 1976, pelo Prof. Dr. Flávio C. A. Tavares. Foi testada em escala de laboratório e industrial pelo grupo do Prof. Dr. Henrique V. Amorim. Na safra de 1980/81 esta levedura já produziu cerca de duzentos milhões de litros de álcool em três destilarias anexas e uma autônoma, e na safra (1981/82) a produção atingiu cerca de trezentos milhões de litros de álcool (8% da produção brasileira). Esta levedura foi selecionada para alto teor alcoólico e altas temperaturas.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - DETERMINAÇÃO DE ART NO MOSTO, MELAÇO, XAROPE E VINHO

A determinação do ART no mosto, melaço, xarope, e vinho foi feita pelo método de Somogy e Nelson, adaptado por AMORIM *et alii* (1981).

3.2.1.1 - Determinação de ART no mosto

3.2.1.1.1 - Preparo da amostra

Foram pipetados 2 ml de mosto e diluídos a 200 ml com água destilada.

Foram adicionados nesse diluído, 0,2 g de oxalato de sódio e agitado. Depois, foram adicionadas 1 g de celite e agitado durante três minutos.

O conteúdo foi filtrado em papel de filtro, sendo desprezados os primeiros 20 - 25 ml.

Foram pipetados 5 ml desse filtrado e transferido para balão volumétrico de 200 ml.

Foram adicionados 10 ml de HCl 0,75 N e o balão colocado em banho-maria à 65°C por 30 minutos.

Após esfriamento desse material até a temperatura ambiente, foram adicionados 10 ml de NaOH 0,75 N e o volume completado com água destilada.

3.2.1.1.2 - Reação de Somogy e Nelson

Foram numerados os tubos de ensaio e adicionados as seguintes soluções:

tubos 1 e 2 : 1 ml de água destilada (prova em branco);

tubos 3 e 4 : 1 ml de padrão de açúcar invertido (50 µg de ART/ml);

outros tubos: 1 ml dos diluídos conforme obtido no ítem 3.2.1.1.1.

Foi colocado em cada um dos tubos, 1 ml do reativo de Somogy e agitado.

Os tubos foram aquecidos durante 15 minutos em água fervente.

Após o resfriamento dos mesmos em água corrente foi colocado em cada tubo 1 ml do reativo de Nelson e agitado. A seguir foram colocados em cada tubo 7 ml de água destilada e agitado.

Após 15 minutos de repouso, foi feita a leitura em colorímetro Klett - Summerson, usando-se o filtro verde nº 54 (540 nm).

3.2.1.2 - Determinação de ART no melaço e xarope

3.2.1.2.1 - Preparo da amostra

Foram pipetados 25 ml dessa solução para balão volumétrico de 250 ml e completado o volume com água destilada.

Foram pipetados 25 ml dessa solução e diluídas 250 ml com água destilada.

Foram adicionados 0,2 g de celite e agitado e a seguir mais 1 g de celite e agitado durante 3 minutos.

Essa solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo sendo desprezados os primeiros 20 - 25 ml.

Foram pipetados 5 ml do filtrado e transferidos para balão volumétrico de 250 ml onde foram adicionados 10 ml de HCl 0,75 N e o balão colocado em banho-maria à 65°C durante trinta minutos.

Após esfriar à temperatura ambiente foram adicionados 10 ml de NaOH 0,75 N e o volume completado com água destilada.

3.2.1.2.2 - Reação de Somogy e Nelson

A determinação do ART foi feita conforme o item 3.2.1.1.2.

3.2.1.3 - Determinação de ART em vinho

3.2.1.3.1 - Preparo da amostra

Foram pipetados 50 ml de vinho centrifugado e diluído a 500 ml com água destilada. Nesse diluído foram colocados 0,2 g de oxalato de sódio e agitado e a seguir 1,0 g de celite e agitado durante 3 minutos. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro qualitativo, sendo desprezados os primeiros 20 - 25 ml.

Foram pipetados 50 ml do filtrado e diluídos a 100 ml com água destilada.

3.2.1.3.2 - Reação de Somogy e Nelson

A determinação do ART foi feita conforme o item 3.2.1.1.2.

3.2.2 - DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE FERMENTO PRODUZIDO

A determinação da quantidade de fermento produzido foi feita pela medida da turbidez da amostra em colorímetro Klett-Summerson usando filtro vermelho nº 66 (660 nm), adaptação do método descrito por PELCZAR *et alii* (1980).

Foi feita uma curva padrão para cada linhagem de levedura, sendo essas leveduras multiplicadas nas mesmas condições do experimento.

3.2.3 - DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E BROTEAMENTO DAS LEVEDURAS E INFECÇÃO BACTERIANA

Essas determinações foram feitas segundo COLINS e LYNE (1970), adaptado por AMORIM *et alii* (1981).

3.2.3.1 - Contagem de bactérias

Com auxílio de uma alça de platina, foi colocado uma gotícula do corante (azul de metileno e azul de Nilo), no centro de uma esfera que delimita uma área de 1 cm^2 numa lâmina de vidro. Ao lado do corante foram colocados mais 2 gotículas de dispersil. Em seguida foi colocado $1\text{ }\mu\text{l}$ (microlitro) do material a ser analisado previamente diluído. Com a alça de platina essas substâncias foram convenientemente misturadas e homogeneizadas e deixadas secar ao ar.

Em seguida, a contagem foi feita ao microscópio com objetiva de imersão (100 x), contando-se 50 campos por lâmina.

A equação usada para o cálculo do número de células foi:

$$\text{Número de células/ml} = \text{Fator do microscópio} \times \frac{1 \text{ ml}}{\text{Volume da amostra}} \times \text{Média do número de microrganismos por campo} \times \text{Fator de diluição}$$

Fator do microscópio: obtido com lâmina micrograduada

Fator de diluição: conforme diluição da amostra

3.2.3.2 - Determinação da porcentagem de viabilidade celular e porcentagem de células em brotamento

Foi colocado com auxílio de uma alça de platina 1 gota de corante (azul de metileno + citrato de sódio) numa lâmina de vidro comum. Ao lado do corante, foi colocado 1 gota de dispersil. Em seguida, foi colocado na lâmina, 2 ml do material a ser analisado, já convenientemente diluído (diluição necessária para dar 40 - 60 células por campo). Essas substâncias foram homogeneizadas com uma alça de platina e uma lâmina foi colocada de modo a não formar bolhas.

A contagem foi feita em microscópio usando-se objetiva de imersão (100 x).

Após a contagem de aproximadamente 1.000 células foi calculada a porcentagem de células viáveis e em brotamento.

A porcentagem de células viáveis foi obtida levando-se em consideração o número de células vivas em relação ao total de células observadas.

A porcentagem de células em brotamento foi calculada em relação ao número total de células vivas

3.2.4 - DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS

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

O fósforo foi analisado segundo CATANI e JACINTO (1974) após digestão nitroperclórica das amostras.

Os elementos magnésio, potássio, manganês e zinco foram analisados por absorção atômica, segundo SARRUGE e HAAG (1974), após digestão nitroperclórica das amostras.

3.2.5 - CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

3.2.5.1 - Esquema geral

3.2.5.1.1 - Preparo do inóculo

O inóculo da levedura era preparado pela multiplicação em mosto de melaço diluído a 2 e 4%. Em seguida era suplementado com 300 ppm de nitrogênio e 332 ppm de fósforo na forma de fosfato monoácido de amônio, 50 ppm de magnésio na forma de sulfato de magnésio, 10 ppm de zinco na forma de sulfato de zinco pentahidratado e 10 ppm de manganês na forma de sulfato de manganês hidratado.

Após a multiplicação, o levedo era utilizado nos ensaios de multiplicação. O levedo era colocado nos tubos de experimento de modo a se colocar 0,5 ml de fermento (com 8,39% de umidade) por tubo.

3.2.5.1.2. - Multiplicação

O experimento foi realizado à 32°C. Após a inoculação, 60 ml de mosto 2% eram adicionado e a homogeneização era feita. Desses, eram retirados 10 ml para determinação inicial da quantidade de levedura.

Em seguida, o ar era injetado (2,3 ml de ar/ml de mosto por minuto). Após três horas eram adicionados 60 ml de mosto 4% em ART. Deixava-se arejando mais três horas. Adicionava-se então, mais 120 ml de mosto à 4% em ART. Depois de uma hora de arejamento eram coletados 10 ml para se fazer a determinação da massa celular produzida. Deixava-se arejando até se completar 22 horas, quando mais 10 ml eram coletados para a determinação da massa de levedura produzida e 1 ml para a contagem de leveduras viáveis ao microscópio.

Após, o material era centrifugado e a levedura era seca em estufa à 85°C até peso constante. A levedura seca era triturada em moinho triturador (DANGOUMAU GRINDER DA PROLABO - Paris, França), e o pó analisado quanto ao teor dos elementos, anteriormente discriminados.

3.2.5.2 - Efeito da suplementação de diversos elementos na multiplicação das leveduras Fleischmann , 12-1904 e M-300-A em mosto de xarope

3.2.5.2.1 - Preparo do mosto

O xarope era diluído até as concentrações correspondentes a 2% (mosto 1) e 4% (mosto 2) em ART e os sais eram adicionados de acordo com o seguinte esquema:

a - Testemunha:

Não foram adicionados sais ao mosto.

b - Tratamentos sem suplementação em nitrogênio:

Eram adicionados os seguintes elementos:

332 ppm de P na forma de fosfato monoácido de potássio;
50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco;
10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.

c - Tratamento sem suplementação em fósforo:

300 ppm de N na forma de sulfato de amônio;
50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco;
10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.

d - Tratamento sem suplementação de magnésio:

300 ppm de N e 332 ppm de P na forma de fosfato mono-ácido de amônio;
10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco;
10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.

e - Tratamento sem suplementação de zinco:

300 ppm de N e 332 ppm de P na forma de fosfato mono-ácido de amônio;
50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.

f - Tratamento sem suplementação de manganês:

300 ppm de N e 332 ppm de P na forma de fosfato mono-ácido de amônio;

50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco.

g - Tratamento completo:

300 ppm de N e 332 ppm de P na forma de fosfato mo
no-ácido de amônio;
50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco;
10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.

Após a adição dos sais o pH era acertado a 4,0 e os mostos armazenados em congelador (- 15°C). Uma alíquota de cada tratamento era separada para análise de ART.

3.2.5.2.2 - Teores de ART dos mostos (% ART P/V)

Tratamentos	Mosto 1 (+ 2%)	Mosto 2 (+ 4%)
T	2,2	3,8
- N	2,2	3,7
- P	2,3	3,7
- Mg	2,3	3,8
- Mn	2,3	3,8
- Zn	2,1	3,8
C	2,1	3,8

3.2.5.2.3 - Condução do experimento

O experimento foi conduzido do mesmo modo descrito no item 3.2.5.1. O inóculo do 2º dia de multiplicação e

ra obtido respectivamente de cada tubo da multiplicação anterior (1.^a multiplicação)

3.2.5.3 - Efeito da suplementação de diversos elementos na multiplicação das leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A em mosto de melaço (1.^o Exp.)

3.2.5.3.1 - Preparo do mosto

O mosto foi preparado conforme o item 3.2.5.2.1, somente que utilizando melaço em vez de xarope.

3.2.5.3.2 - Análise do ART dos mostos (% ART P/V)

Tratamentos	Mosto 1 ($\pm$ 2%)	Mosto 2 ($\pm$ 4%)
T	1,7	3,6
- N	1,7	3,5
- P	1,7	3,4
- Mg	1,9	3,4
- Mn	1,8	3,7
- Zn	1,9	3,5
C	1,9	3,8

3.2.5.3.3 - Condução do experimento

O experimento foi conduzido, do mesmo modo descrito no item 3.2.5.1.

3.2.5.4 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope, na multiplicação das leveduras Fleischmann 1Z-1904 e M-300-A (2º experimento)

3.2.5.4.1 - Preparo dos mostos

O xarope era diluído até as concentrações correspondentes a 2 e 4% de ART e os sais eram adicionados no seguinte esquema:

- a - Todos os mostos eram suplementados com a adição de:
 - 50 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio;
 - 10 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco;
 - 10 ppm de Mn na forma de sulfato de manganês.
- b - A adição de fósforo variava de 0 , 75 e 150 ppm na forma de fosfato monoácido de potássio.
- c - A adição de nitrogênio variava de 0 , 100 , 200 , 300 e 400 ppm na forma de sulfato de amônio.

3.2.5.4.2 - Teores de ART dos mostos

Tratamen tos N/P	Fleischmann		M-300-A		IZ-1904	
	Mosto 1	Mosto 2	Mosto 1	Mosto 2	Mosto 1	Mosto 2
0/0	1,9	3,6	2,6	3,0	2,0	3,8
100/0	1,9	3,7	2,5	3,0	2,2	3,9
200/0	1,9	3,6	2,6	3,0	2,2	3,9
300/0	1,9	3,7	2,7	3,5	2,3	3,9
400/0	1,9	3,7	2,7	3,1	2,3	3,9
0/75	1,9	3,7	2,5	3,1	2,3	4,0
100/75	1,9	3,7	2,6	3,1	2,2	4,0
200/75	1,9	3,5	2,7	3,1	2,2	3,8
300/75	1,0	3,4	2,7	3,1	2,2	3,8
400/75	1,9	3,7	2,7	3,1	2,1	3,9
0/150	1,9	3,4	2,6	3,2	2,2	3,9
100/150	1,9	3,6	2,6	3,1	2,2	4,0
200/150	1,9	3,6	2,7	3,1	2,2	3,9
300/150	1,9	3,2	2,8	3,1	2,1	3,9
400/150	1,9	3,1	2,8	3,1	2,2	3,9

3.2.5.4.3 - Condução do experimento

O experimento foi conduzido conforme ítem 3.2.5.1 somente sendo modificada a adição dos sais que foi feita conforme o ítem 3.2.5.4.1.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VÁRIOS ELEMENTOS EM MOSTO DE XAROPE E MELAÇO NA MULTIPLICAÇÃO DAS LEVEDURAS FLEISCHMANN , IZ-1904 E M-300-A APÓS 7 E 22 HORAS , SOB AREJAMENTO CONSTANTE

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas em anexo. Para facilidade eles foram colocados na forma de Gráficos que podem ser visualizado nas Figuras do texto.

A taxa de conversão de açúcar em matéria seca de levedura foi baixa, (123 mg de matéria seca por grama de açúcar) quando o ideal seria 500 mg de matéria seca por grama de açúcar (REED e PEPPLER, 1973). Isso se deve ao fato de não se possuir aparelhagem adequada para se manter as condições ideais para a multiplicação, isto é, de se manter um suprimen-to contínuo de mosto de forma a manter baixas concentrações de açúcar no meio.

A população bacteriana no final das multiplicações encontra-se na Tabela 37. Por esses resultados pode-se constatar que as multiplicações foram feitas em um nível de bactéria da ordem de 10^6 bactérias/ml.

O nitrogênio foi o elemento, cuja deficiência mais evidenciou o decréscimo na produção de matéria seca das leveduras, tanto em mosto de xarope quanto de melaço, conforme pode ser observado nas Figuras 2, 3, 4 e 5 (correspondente às Tabelas 1, 2, 6 e 7) e também pelo teor de açúcar residual no vinho (Tabela 5).

Em mosto de melaço a levedura que se mostrou mais exigente em nitrogênio foi a Fleischmann, seguida pela M-300-A e depois a IZ-1904. Os resultados evidenciaram também que quanto mais exigente em nitrogênio, maior será a produção de matéria seca produzida pela levedura quando em solução completa.

O efeito causado pela falta de nitrogênio foi mais drástico no segundo dia de multiplicação o que parece evidenciar uma alteração no metabolismo nitrogenado das leveduras já que o inóculo do segundo dia foi obtido com o material deficiente da primeira multiplicação (Figuras 3 e 5, correspondentes as Tabelas 1, 2, 6 e 7).

1) T ; 2) - N ; 3) - P ; 4) - Mg ; 5) - Mn ; 6) - Zn ; 7) C

FIGURA 2 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação das leveduras Fleischmann, 12-1904 e M-300-A após 7 e 22 horas sob arejamento constante (1ª multiplicação).

FIGURA 3 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 7 e 22 horas sob arejamento constante (2. multiplicação).

FIGURA 4 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melação na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A após 7 e 22 horas, sob arejamento constante (i.e. multiplicação).

FIGURA 5 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melão na multiplicação das leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A após 7 e 22 horas, sob arejamento constante (2ª multiplicação).

Na prática, a falta desse elemento no mosto, influirá no tempo de produção de massa celular, já que as sucessivas gerações obtidas na multiplicação serão cada vez mais carentes. Consequentemente a produção de álcool durante a multiplicação poderá ser relativamente maior, o que é um inconveniente no início da safra, quando o ideal seria produzir só células e nada de álcool.

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

Resultados semelhantes foram encontrados por FARAH ALVES e DEL BIANCO (1971) e VAIRO *et alii* (1975).

O menor teor de fósforo no mosto também diminuiu a produção de massa seca pelas leveduras, embora de uma forma muito menos drástica que o nitrogênio (Figuras 2, 3, 4 e 5, correspondentes as Tabelas 2, 3, 6 e 7).

O efeito negativo da falta de fósforo foi mais evidente após 7 horas que após 22 horas de multiplicação.

A não adição do fósforo aos mostos diminuiu a produção de matéria seca nas leveduras Fleischmann e M-300-A e em menor proporção na levedura 12-1904 em mosto de xarope, o que pode também ser visualizado pelo açúcar residual no vinho (Tabela 5).

Também quanto à fósforo, as leveduras Fleischmann e M-300-A foram as mais exigentes.

Quando não se adicionou o elemento magnésio, aos mostos (Figuras 2, 3, 4 e 5, correspondentes as Tabelas 1, 2, 6 e 7), não houve alteração na produção de matéria seca, o que parece indicar que as quantidades médias de magnésio já existente nos mostos usados, 0,0167% (xarope) e 0,051% (melaço), já são suficientes.

Esses resultados concordam com os de DOS ANJOS MAGALHÃES *et alii* (1980) que não encontraram aumento de produção de proteína celular quando adicionaram sulfato de magnésio (0,25 g/l na forma de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$) em mosto de melaço.

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

Também a adição de 10 ppm de zinco ao mosto não melhorou a produção de matéria seca pelas leveduras (Figuras 2, 3, 4 e 5, correspondentes as Tabelas 1, 2, 6 e 7). Isso indica que as quantidades médias encontradas nos mostos 3,47 ppm (xarope) e 4,8 ppm (melaço) eram suficientes.

Esses resultados não concordam com os de Mc HARGUE e CALFEE (1931) que encontraram que a melhor concentração de zinco no meio para o crescimento das leveduras foi 10 ppm. Também POPENKO e BAYAKHUMOV (1971) verificaram que o melhor crescimento das leveduras (strain K₂ e 15) foi na dose na dose de 30 mg de sulfato de zinco por litro (12,1 ppm de Zn).

Por outro lado os resultados concordam com os de OLSON e JOHNSON (1949) os quais encontraram que a *Saccharomyces cerevisiae* γ-30 requer 200 microgramas de zinco por litro de meio (0,2 ppm) para o seu ótimo desenvolvimento. Densky *et alii* citado por REED e PEPPLER (1973) trabalhando com fermentação de cerveja em meios contendo de 0,05 a 0,1 ppm de Zn, verificaram que havia grande estímulo no crescimento das leveduras se o meio fosse suplementado com zinco até o nível de 0,5 ppm. FREY *et alii* (1967) também quando adicionavam 0,5 ppm de zinco em meios de fermentação de cerveja contendo de 0,04 a 0,07 ppm de zinco obtiveram grande estímulo, tanto na fermentação quanto no crescimento das leveduras.

Quanto ao manganês, a adição de 10 ppm de manganês aos mostos não aumentou a quantidade de matéria seca (Figuras 2, 3, 4 e 5, correspondentes às Tabelas 1, 2, 6 e 7), o que indica que as quantidades médias encontradas no mos

to 2,62 ppm (xarope) e 3,67 ppm (melaço) já eram suficientes

Esses resultados estão semelhantes aos encontrados por LIMA (1953) que trabalhando com a levedura 12-2 (*Saccharomyces cerevisiae*, Hansen) concluiu que as doses mais recomendáveis de manganês para o crescimento da levedura foram 0,01 a 0,08 g de sulfato de manganês por litro, sendo ao redor de 0,01 (3,6 ppm de manganês) a dose ideal em condições de fermentação.

Em mosto de xarope, todos os tratamentos com exceção do nitrogênio, diferiram da testemunha que não recebeu suplementação nenhuma, o que vem reforçar a afirmativa de que o nitrogênio é o elemento mais carente nos mostos de xarope utilizados e que portanto deve ser suplementado.

Como pode ser observado nas Tabelas 3 e 8 a porcentagem de viabilidade das células obtidas tanto na multiplicação em xarope, quanto em melaço, foi elevada, podendo se afirmar que os níveis dos elementos usados nesse experimento, mesmo os que afetaram a produção de matéria seca não afetaram a viabilidade das células.

As Figuras 6 e 7, correspondentes às Tabelas 4 e 9 mostram as porcentagens de brotamento das células crescidas em mosto de xarope e melaço suplementado com vários elementos. A porcentagem de brotamento foi marcadamente menor nos tratamentos testemunha e sem adição de nitrogênio.

FIGURA 6 - Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos após 22 horas, sob arejamento constante.

FIGURA 7 - Porcentagem de brotamento em células, de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos, após 22 horas sob arejamento constante.

Nos tratamentos onde o fósforo não foi adicionado, embora com menor intensidade também foram afetados negativamente as porcentagens de brotamento, com exceção das leveduras IZ-1904 e M-300-A em mosto de xarope.

Quando comparamos a produção de matéria seca produzida pelas três leveduras após 7 horas de multiplicação observamos que as leveduras Fleischmann e M-300-A produziram uma maior quantidade de matéria seca com a IZ-1904 (Figuras 2 , 3 , 4 e 5 , correspondentes as Tabelas 1 e 6).

Essa diferença mais evidente durante o ensaio (após 7 horas) pode significar uma divisão celular mais lenta para a levedura IZ-1904 quando comparada com as outras duas, nas condições do experimento.

Os teores dos elementos analisados na matéria seca das leveduras, encontram-se nas Figuras 8 a 17 , correspondentes às Tabelas 10 a 15.

Com referência à quantidade de nutrientes absorvidos pelas leveduras nos diversos tratamentos encontrou-se de um modo geral, um comportamento semelhante entre as leveduras.

Os menores teores de nitrogênio encontrados foram nas leveduras provenientes do tratamento testemunha e não suplementado com nitrogênio tanto em mosto de xarope como de melaço (Figuras 8 e 9).

FIGURA 8 - Teores de nitrogênio nas variedades Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1ª e 2ª multiplicação somados).

FIGURA 9 - Teores de nitrogênio nas variedades Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1ª e 2ª multiplicação somados).

Em mosto de melaço as leveduras crescidas no tratamento não suplementado com fósforo também apresentaram um menor teor de nitrogênio, embora de uma forma menos acentuada que nos tratamentos testemunha e não suplementado com nitrogênio.

OLIVEIRA e SOUSA (1970) encontraram uma correlação altamente significativa entre fósforo e nitrogênio em leveduras e explicou através da intervenção do fósforo no sistema ADP - ATP, influenciando no metabolismo nitrogenado.

As Figuras 10 e 11 mostram as quantidades de potássio analisado nas leveduras multiplicadas em mosto de xarope e melaço que receberam a suplementação dos vários elementos em questão.

O tratamento que evidenciou uma tendência de acúmulo de potássio foi o deficiente em nitrogênio. Isso parece ser mais devido ao fato de que nesse tratamento o fósforo foi adicionado na forma de fosfato monoácido de potássio o que elevou a concentração de potássio no meio.

Entretanto, o baixo teor de nitrogênio no meio pode ter favorecido uma maior absorção de potássio. Segundo EVANS e SORGER (1966) os íons amônio e potássio são quimicamente parecidos sendo essa semelhança observada em reações bioquímicas, onde o amônio pode substituir o potássio na ativação de várias enzimas "in vitro".

FIGURA 10 - Teores de potássio nas variedades Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1ª e 2ª multiplicação somados).

FIGURA 11 - Teores de potássio nas variedades Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1ª e 2ª multiplicação somados).

No tratamento não suplementado em fósforo houve um menor acúmulo de potássio pelas leveduras, em mosto de melaço.

As Figuras 12 e 13 mostram os teores de fósforo analisados nas leveduras crescidas em mosto de xarope e melaço suplementado com os vários elementos em questão.

Conforme poderia ser esperado as leveduras obtidas nos tratamentos testemunha e não suplementado em fósforo foram os que apresentaram um menor teor desse elemento.

As quantidades de fósforo analisadas nas leveduras crescidas em mosto de xarope não suplementado em N foram significativamente baixos, enquanto nas crescidas em mosto de melaço os níveis encontrados foram semelhantes ao tratamento completo. Como o melaço possui um teor de nitrogênio superior ao xarope, talvez o nível existente foi suficiente para uma absorção normal de fósforo pelas leveduras.

As Figuras 14 e 15 mostram o teor de magnésio, encontrado nas leveduras multiplicadas em mosto de xarope e melaço suplementados com os vários elementos em questão.

No tratamento que não recebeu a suplementação de fósforo as leveduras analisadas apresentaram de um modo geral menor teor de magnésio.

FIGURA 12 - Teores de fósforo nas leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

FIGURA 13 - Teores de fósforo nas leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

1) T ; 2) - N ; 3) - P ; 4) - Mg ; 5) - Mn ; 6) - Zn ; 7) C

FIGURA 14 - Teores de magnésio nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

FIGURA 15 - Teores de magnésio nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

OLIVEIRA e SOUSA (1970) encontraram correlação entre o conteúdo de magnésio e o de fósforo em *Candida utilis* e afirmaram que a correlação com o magnésio é muito importante, devido ao papel do magnésio no transporte ativo e a intervenção do fósforo sobre a síntese dos carregadores.

As Figuras 16 e 17 mostram os teores de zinco encontrados nas leveduras multiplicadas nos mostos de xarope e melaço suplementados com os vários elementos em questão.

As análises de zinco nas três leveduras utilizadas revelaram um acúmulo de zinco pelas células. A levedura 1Z-1904 apresentou neste aspecto ser diferente das outras duas, pois o acúmulo de zinco nessa levedura foi notavelmente superior. Essa super acumulação de zinco foi observada anteriormente por LAWFORD *et alii* (1980.a) em *Candida utilis*, e constataram que esse super acúmulo de zinco não era inibitório ao crescimento.

Nos tratamentos testemunha e não suplementado em zinco as leveduras apresentaram um teor mais baixo de zinco. O fato de que nas leveduras do tratamento testemunha, o teor de zinco analisado foi sempre um pouco maior que nas do tratamento deficiente em zinco, pode ser explicado pelo efeito da diluição, pois no tratamento onde não se colocou zinco mas se colocou os outros elementos o teor de matéria seca produzida foi muito maior que na testemunha.

1) T ; 2) - N ; 3) - P ; 4) - Mg ; 5) - Mn ; 6) - Zn ; 7) C

FIGURA 16 - Teores de zinco nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de xarope suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

FIGURA 17 - Teores de zinco nas leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicadas em mosto de melão suplementado com vários elementos (após 22 horas; material da 1. e 2. multiplicação somados).

Ainda, quando se observa as Figuras 16 e 17 pode-se notar que as leveduras Fleischmann e M-300-A em mosto de xarope e Fleischmann e 12-1904 em mosto de melaço, apresentaram um maior acúmulo de zinco no tratamento onde se suprimiu o fósforo. Talvez haja menor absorção de zinco nos tratamentos mais elevados em fósforo devido à precipitação do zinco na forma de fosfato de zinco. OLIVEIRA e SOUSA (1970), afirmam ocorrer a formação de fosfatos insolúveis de zinco, alumínio, ferro e manganês nas células de leveduras e LAWFORD e PIK (1980.a) afirmam ser os polímeros de polifosfato acumulado nas células possíveis agentes armazenadores de zinco. No presente caso, talvez a insolubilização do zinco pelo fósforo fora da célula seja a causa principal deste resultado.

Resultado obtido por alguns pesquisadores, em plantas, evidenciaram esse efeito antagônico entre fósforo e zinco. MOTSARA (1974) utilizando isótopo radioativo de zinco verificou que o fósforo induziu uma imobilização do micronutriente na superfície radicular do milho e cevada. MALAVOLTA e LOPEZ GOROSTIAGA (1974) trabalhando com raízes e plantas de cevada verificaram que na presença de fosfato havia inibição não competitiva na absorção de zinco e precipitação de zinco na superfície das raízes.

4.2 - EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO EM DIFERENTES NÍVEIS, EM MOSTO DE XAROPE, NA MULTIPLICAÇÃO DAS LEVEDURAS FLEISCHMANN , IZ-1904 E M-300-A

Estatisticamente os resultados obtidos para os tratamentos com nitrogênio, foram independentes dos níveis de fósforo (Figuras 18 , 19 e 20 , correspondentes às Tabelas 16 , 17 , 18 , 19 , 20 e 21).

Considerando os resultados obtidos após 7 horas de multiplicação, podemos perceber um aumento significativo de matéria seca até a dose de 400 ppm de nitrogênio, o que indica que quanto maior a dose de nitrogênio usada, tem-se maior quantidade de células em menor tempo.

Após 22 horas de multiplicação, a quantidade de matéria seca produzida não aumentou nas doses superiores a 200 ppm de nitrogênio, para a levedura Fleischmann.

A produção de matéria seca obtida das leveduras IZ-1904 e M-300-A foi crescente com o aumento das doses de nitrogênio tanto às 7 como às 22 horas de multiplicação.

A baixa produção de células nos tratamentos 0 e 100 ppm de nitrogênio podem ser confirmadas pelo açúcar residual dos vinhos obtidos (Tabelas 22 , 23 e 24)

Acima da dose de 100 ppm o consumo de açúcar foi total.

FIGURA 18 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope na multiplicação da levedura Fleischmann, após 7 e 22 horas sob arejamento constante.

FIGURA 19 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope na multiplicação da levedura 12-1904, após 7 e 22 horas sob aeração constante.

FIGURA 20 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope na multiplicação da levedura M-300-A após 7 e 22 horas, sob aerajamento constante.

Esses resultados são semelhantes aos apresentados por FULMER *et alii* (1921) que afirma que a dose ótima de nitrogênio para o crescimento das leveduras é 0,060% de amônio (466 ppm de N).

Também Fulmer (1925) citado por DEVEREUX e TANNER (1927) encontrou que o ótimo de concentração de NH_4Cl para o crescimento da levedura foi de 1,88 g/l (492 ppm de N).

O fósforo influenciou significativamente na produção de matéria seca da levedura Fleischmann, na dose de 75 e 150 ppm quando comparadas com o tratamento não suplementado em fósforo. Nas leveduras 12-1904 e M-300-A embora houvesse um aumento de matéria seca nas doses de 75 e 150 ppm este não foi significativo.

FULMER *et alii* (1921), trabalhando com meio sintético, verificaram que as dosagens de fósforo que aumentavam o crescimento eram bem baixas (até 35,6 ppm). Adições de fósforo acima dessa dose até 1.050 ppm de fósforo, não alteraram a produção de massa celular.

DOS ANJOS MAGALHÃES *et alii* (1980) trabalhando com mosto de melaço não encontraram aumento no teor de proteínas quando adicionaram fosfato de sódio 258 ppm de fósforo aos mostos utilizados e inferiram que nas condições em que foram realizados os seus ensaios, só o nitrogênio era o fator limitante.

Os dados referentes a porcentagem de viabilidade celular encontram-se nas Tabelas 25 , 26 e 27.

A porcentagem de células viáveis para as três leveduras foi boa e parece não ser influenciada pelos sais utilizados.

Por outro lado, percebe-se claramente a influência dos sais nitrogenados no brotamento das células, isto é, quanto maior a quantidade de nitrogênio usado, maior a porcentagem de brotamento (Figura 21 , correspondente às Tabelas 28, 29 e 30).

A porcentagem de células em brotamento na levedura M-300-A foi mais baixa que nas outras duas. Esse fato parece indicar que a levedura M-300-A atingiu a fase estacionária de multiplicação muito mais rápido que as outras duas leveduras, portanto cessando a sua multiplicação.

Na levedura M-300-A a tendência foi de aumentar a porcentagem de brotamento quando se elevou o teor de fósforo no meio de 0 para 75 ppm de fósforo, nas doses de 300 e 400 ppm de nitrogênio.

Postamente nas leveduras Fleischmann e 12-1904 a quantidade de células em brotamento de uma maneira geral de cresceram com o aumento do nível de fósforo.

Os teores dos elementos analisados na matéria seca das leveduras encontram-se relacionados nas Figuras 22 a 31 , correspondentes às Tabelas 31 , 32 e 33.

FIGURA 21 - Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicados em mosto de xarope, suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, sob arejamento constante, após 22 horas.

Quanto à análise mineral podemos verificar que os teores de nitrogênio analisados na matéria seca das leveduras cresceram até a dose de 400 ppm no mosto (Figuras 22, 23 e 24), o que significa que os componentes orgânicos nitrogenados, tais como aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, também tiveram os seus teores aumentados, permitindo uma multiplicação celular muito mais intensa.

As quantidades de nitrogênio encontradas nas leveduras no tratamento 400 ppm de nitrogênio estão dentro da faixa normal, que segundo WHITE (1954) é de 8,5% na matéria seca.

Os três níveis de fósforo empregados não influenciaram no acúmulo de nitrogênio pelas leveduras utilizadas. Esses resultados não concordam com os de FARAH ALVES e DEL BIANCO (1971) que afirmam ter a adição de fosfato em mosto de melaço provocado sensível melhora na assimilação do nitrogênio pela levedura.

As Figuras 25 e 26 mostram a interação entre as doses de nitrogênio e fósforo no mosto e a quantidade de fósforo encontrada na matéria seca das leveduras Fleischmann e 1Z-1904. Houve correlação positiva entre a dose de nitrogênio no mosto e a dose de fósforo encontrada nas leveduras. Esses resultados evidenciam que a maior aplicação de nitrogênio resulta numa maior produção de compostos nitrogenados, muitos dos quais, contendo ou requerendo fósforo para a sua formação.

FIGURA 23 - Teor de nitrogênio na levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 22 - Teor de nitrogênio na levedura Fleischmann, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 24 - Teor de nitrogênio na levedura M-300-A multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 25 - Teor de fósforo na levedura Fleischmann, multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 26 - Teor de fósforo na levedura 1Z-1904, multiplicadas em mosto de xarope suplementado, com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

Desta maneira, um aumento na absorção de nitrogênio, resulta também num maior acúmulo de fósforo. Resultados semelhantes foram encontrados em leveduras por OLIVEIRA e SOUSA (1970). Um maior acúmulo de fósforo em meio contendo mais nitrogênio também pode ser observado em plantas superiores (HEWITT, 1963).

Quanto ao potássio absorvido pelas leveduras os resultados mostram um decréscimo no teor de potássio das leveduras 1Z-1904 e M-300-A quando se eleva o teor de nitrogênio no mosto (Figuras 27 e 28). A interação entre esses dois nutrientes, tem sido mais estudado em plantas. Em planta de tomate, MAYNARD *et alii* (1968) verificam um antagonismo do nitrogênio sobre o potássio quando nitrogênio era fornecido na forma amoniacal. PIETZ *et alii* (1978) encontraram uma correlação negativa entre doses de fertilizantes nitrogenados empregados e o teor de potássio nos grãos de milho.

Os resultados encontrados nas análises de magnésio na matéria seca das leveduras Fleischmann e M-300-A (Figuras 29 e 30) parecem indicar uma absorção diferente quando se varia nitrogênio dentro dos níveis de fósforo usado. Quando não se adicionou fósforo ao mosto houve elevação do magnésio, encontrado nas leveduras, conforme se elevou o nível de nitrogênio no mosto. Quando foi adicionado fósforo ao mosto houve um decréscimo nos teores de magnésio encontrados.

FIGURA 27 - Teor de potássio na levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope, suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 28 - Teor de potássio na levedura M-300-A, multiplicada em mosto de xarope, suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 29 - Teor de magnésio na levedura Fleischmann, multiplicada em mosto de xarope suplementado, com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 30 - Teor de magnésio na levedura M-300-A multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

Esses resultados não concordam com JENNINGS *et alii* (1958) que afirmam que as células adquirem maior capacidade para absorver magnésio, quando fosfato está presente no meio, talvez porque neste último trabalho as condições de deficiência tenham sido mais drásticas.

Por outro lado se considerarmos que quando se aumentou a dose de fósforo também se aumentou a dose de potássio, pois o fósforo foi colocado na forma de fosfato monoácido de potássio, uma inibição de absorção de magnésio pode ter ocorrido com o aumento da concentração de potássio no meio.

O aumento da absorção de magnésio ocorrida quando se aumentou o teor de nitrogênio no mosto, na dose de 0 ppm de fósforo, pode ser explicado pelo aumento do fósforo na levedura nas doses crescentes de nitrogênio. JENNINGS *et alii* (1958) sugere um carregador de magnésio e manganês dependente de fósforo e afirma que somente uma pequena fração do fosfato que entra na célula está envolvida na formação dos carregadores de magnésio e manganês, já que a maior parte do fosfato absorvido é considerado na forma de polifosfato, ATP e intermediários glicolíticos.

Quanto ao manganês, os teores determinados na matéria seca das leveduras IZ-1904 e M-300-A foram crescente com o aumento das doses de nitrogênio no mosto (Figuras 31 e 32).

FIGURA 32 - Teor de manganês na levedura M-300-A, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

FIGURA 31 - Teor de manganês na levedura IZ-1904, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

Essa maior absorção de manganês parece estar ligada ao fato de que com o aumento das doses de nitrogênio no mosto, o fósforo foi mais acumulado nas leveduras.

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

As quantidades de zinco analisadas na levedura 12-1904 decresceram quando se elevaram as doses de nitrogênio no mosto (Figura 33).

~~Esses resultados diferem dos apresentados por~~ OLIVEIRA e SOUSA (1970) que afirmam aumentar o nível de zinco na levedura quando se aumenta o nível de nitrogênio com mosto de lixívia bissulfítica. Também se considerarmos a elevação do nível de fosfato nas células quando se elevou os níveis de nitrogênio os resultados obtidos não concordam com os de LAW FORD e PIK (1980.a) que conferem aos polifosfatos acumulados nas células de leveduras possíveis agentes de armazenamento de zinco.

FIGURA 33 - Teor de zinco na levedura 12-1904 multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo.

4.3 - RELAÇÃO ENTRE PORCENTAGEM DE BROTAMENTO E MATÉRIA SECA PRODUZIDA

As Figuras 34 , 35 e 36 correspondentes às Tabelas 34 , 35 e 36 mostram a interação entre a porcentagem de brotamento e matéria seca produzida nas leveduras Fleischmann, 1Z-1904 e M-300-A , respectivamente.

A grande dispersão dos pontos se deve ao fato de ter-se reunido todos os dados obtidos nos diversos experimentos realizados para se fazer essa correlação.

Percebe-se que houve uma correlação positiva significativa entre quantidade de matéria seca produzida e porcentagem de brotamento, para as três leveduras, sendo a que a melhor correlação foi para 1Z-1904. Isso indica que a análise da porcentagem de brotamento é importante quando se pretende uma alta quantidade de levedura em pouco tempo, pois quanto mais células em brotamento houver, maior será a utilização dos açúcares para a produção de células. Por outro lado, este índice pode ser adotado para o controle da multiplicação com uma dose de confiança razoável.

A melhor correlação obtida com os dados da levedura 1Z-1904 parece estar ligado ao fato de que esta levedura desenvolveu menos, atingindo a fase estacionária mais tarde que as outras duas.

FIGURA 34 - Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento na levedura Fleischmann

FIGURA 35 - Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento na leve-dura M-300-A

FIGURA 36 - Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento na levedura IZ-1904.

5 - CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem apresentar as conclusões seguintes.

O nitrogênio foi o elemento que mais afetou a produção de matéria seca das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, tanto em mosto de xarope quanto no de melaço. Esse efeito foi mais acentuado na segunda multiplicação que foi inoculada com levedura já deficiente da primeira multiplicação.

Em mosto de melaço ficou evidente que a levedura Fleischmann é mais exigente em nitrogênio seguida pela M-300-A e depois IZ-1904. Também ficou evidenciado que quanto mais exigente em nitrogênio maior será a produção de matéria seca pela levedura, quando em meio completo em nutrientes.

O fósforo também, quando em baixa concentração afeta a produção de matéria seca das leveduras, embora de uma forma menos drástica que o nitrogênio.

As leveduras Fleischmann e M-300-A foram mais exigentes em fósforo que a 12-1904.

As exigências quanto a nitrogênio pela leveduras foram maiores em mosto de xarope que de melaço.

As concentrações médias de magnésio (0,0167%), manganês (2,62 ppm) e zinco (3,47 ppm) já existentes nos mostos parecem ser suficientes para a multiplicação, já que as doses acrescentadas não influenciaram na produção de matéria seca das três linhagens estudadas.

A quantidade de células em brotamento foi influenciada pela quantidade de nitrogênio no mosto. Quanto mais nitrogênio, mais intenso foi o brotamento.

A levedura Fleischmann, foi a que maior quantidade de matéria seca produziu seguida pela M-300-A e depois 12-1904.

As leveduras multiplicadas em meio deficiente em fósforo acumularam menos nitrogênio e potássio, e menor acúmulo de fósforo no tratamento deficiente em nitrogênio.

As leveduras multiplicadas em mosto de xarope e melaço com menor teor de fósforo, apresentaram um menor teor de magnésio.

A levedura 12-1904 é diferente das Fleischmann e M-300-A na capacidade de acumular zinco. Nos tratamentos com menor teor de fósforo as leveduras acumularam uma maior quantidade de zinco.

A maior quantidade de matéria seca foi obtida, pela suplementação do mosto de xarope com 400 ppm de nitrogênio.

A suplementação do mosto com 75 ppm de fósforo em mosto de xarope já foi suficiente para manter um crescimento satisfatório.

A supressão ou acréscimo dos elementos nos mostos não influenciaram na viabilidade das leveduras.

Quanto maior a quantidade de matéria seca obtida, maior era a quantidade de células em brotamento.

6 - BIBLIOGRAFIA

- AMORIM, H. V., 1977. Introdução à bioquímica da fermentação alcoólica. PLANALSUCAR, Araras, 91 p.
- AMORIM, H. V. ; A. J. OLIVEIRA e E. A. ZAGO, 1981. Novos métodos para o controle de destilaria de álcool. Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo (no prelo).
- AULD, D. S. ; J. ATSUYA ; C. CAMPINO e P. VALENZUELO, 1976. Yeast RNA polymerase I: a eukaryotic zinc metalloenzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 69: 548-554.
- CATANI, R. A. e A. D. JACINTHO, 1974. Avaliação da Fertilidade do Solo. Métodos de análises. Piracicaba, SP, Livroceres, 61 p.
- COLLINS, C. H. e P. M. LYNE, 1970. Microbiologicals Methods. Butterworths. London.

- CONWAY, E. J. e M. E. BEARY, 1958. Active transport of magnesium across the yeast cell membrane. The Biochemical Journal, Liverpool, 69: 275-280.
- CONWAY, E. J. e M. E. BEARY, 1962. A magnesium yeast and its properties. The Biochemical Journal, Liverpool, 84: 328-333.
- DEVEREUX, E. D. e E. W. TANNER, 1927. Observations on the growth of yeast in pure nutrient solutions. Journal of Bacteriology, Baltimore, 14: 317-333.
- DI CARLO, E. J. ; A. S. SCHULTZ e D. K. Mc MANUS, 1951. The assimilation of nucleic acid derivatives and related compounds by yeasts. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 189: 151-175.
- DOS ANJOS MAGALHÃES, M. M. ; M. L. R. VAIRO e W. BORZANI, 1980. Influência da adição de fonte de nitrogênio ao mosto no teor de proteína da levedura residual da fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Tecnologia, São Paulo, 11: 13-21.
- DUBOIS, E., 1975. Regulation genetrophe des enzymes du catabolisme de l'arginine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires, 30 (6): 147-160.
- EVANS, H. J. e G. J. SORGER, 1966. Role of mineral elements with emphasis on univalent cations. Annual Review of Plant Physiology, Palo Alto, 17: 47-77.
- FALCONE, M. e M. R. ARRUDA, 1964. Estudo sobre obtenção de "pê-de-cuba" para produção de etanol a partir de mosto de melaço. São Paulo. Escola Politécnica - USP, Depto. de Engenharia Química. (Boletim 19), 29 p.

FARAH ALVES, T. C. e V. DEL BIANCO, 1971. Produção de levedura alimento e assimilação do nitrogênio em melaços brasileiros. Rio de Janeiro, GB, Publicação do Instituto Nacional de Tecnologia, 45-63.

FEDOROVA, J. Y. ; S. E. TRAUBENBERG ; I. A. POPADICH ; I. F. GRIBOVSKAYA ; N. N. MARHOVA e L. V. SHEVYAKOVA, 1978. Mineral composition of Baker's yeast. Khlebopekarnaya i Konditershaya Promyshlennost , Moskva (1): 34-5 (Russian). Apud: Chemical Abstracts, Columbus, 88(19): 134, 1978. (Ref. 839).

FREY, S. W. ; W. G. DE VITT e B. R. BELLOMY, 1967. Effect of several trace metals on fermentation. Proceedings of the American Society of Brewing Chemists, Chicago, 12: 199-205.

FULMER, E. I. ; E. V. NELSON e F. F. SHERWOOD, 1921. The nutritional requirements of yeast. II. The effect of the composition of the medium on the growth of yeast. Journal of the American Chemical Society, Easton, Pa., 43: 191-199.

FULMER, E. I. ; L. A. UNDERKOFER e J. B. LESH, 1936. Effect of the composition of the medium upon the growth of yeast in the presence of bios preparations. The effect of magnesium salts. Journal of the American Chemical Society, Easton, Pa., 58: 1356-1358.

GOODMAN, J. e A. ROTHSTEIN, 1957. The active transport of phosphate into the yeast cell. Journal of General Physiology, Baltimore, 40: 915.

- HAROLD, F. M., 1966. Inorganic polyphosphates in biology ; structure, metabolism and function. Bacteriological Reviews, Baltimore, 30: 772-794.
- HERNANDEZ, M. R., 1960. Nuevas pruebas en torno a la fermentación de mostos submetidos a bajas pressiones. 8 p. Separata de la Semana Vitinicola. Madrid, Estación de Viticultura y Enologia de Haro.
- HEWITT, E. J., 1963. The essential nutrient elements: requirements and interaction in plants. In: STEWARD, F. C. Plant Physiology, III. Inorganic nutrition of plants. New York, Academic Press, 811 p.
- INDGE, K. J., 1968. Polyphosphates of the yeast cell vacuole. Journal General Microbiology, Cambridge, 51: 447-455.
- JENNINGS, D. H. ; D. C. HOOPER e A. ROTHSTEIN, 1958. The participation of phosphate in the formation of a "carrier" the transport of Mg^{++} and Mn^{++} ions into yeast cells. Journal of General Physiology, Baltimore, 41(5): 1019-1026.
- LAWFORD, H. G. e J. R. PIK, 1980.a. Physiology of *Candida utilis* yeast in zinc-limited chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26: 64-70.
- LAWFORD, H. G. e J. R. PIK, 1980.b. Hyperaccumulation of zinc by zinc-depleted *Candida utilis* grown in chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26: 71-76.

- LAWFORD, H. G. ; J. R. PIK ; G. R. LAWFORD ; T. WILLIAMS e A. KLIGERMAN, 1980. Hyper accumulation of zinc by zinc-depleted *Candida utilis* growth in chemostat culture. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 26: 71-76.
- LEGGETT, J. E., 1961. Entry of phosphate into yeast cell. Plant Physiology, Lancaster, 36(3): 277-284.
- LESH, J. B. ; L. A. UNDERKOFER e E. I. FULMER, 1938. The effect of the composition of the medium upon the growth of yeast in the presence of bios preparations. I - The response of several strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the American Chemical Society, Easton, Pa., 60(2): 2505-2507.
- LIMA, U. A., 1953. Contribuição ao estudo da influência do manganês sobre o crescimento e atividades da *Saccharomyces cerevisiae* (Hansen), Piracicaba, SP., ESALQ/USP. 36 p. (Tese de Doutorado)
- LING, R. S. e R. C. HOSENEY, 1977. Effect of certain nutrients on the gas produced in pre ferments. Cereal Chemistry, St. Paul, Minn., 54(3): 597-604.
- MC HARGUE, S. S. e R. K. CALFEE, 1931. Effect of manganese, copper and zinc on the growth of yeast. Plant Physiology, Lancaster, 6: 559-566.
- MALAVOLTA, E. e O. E. LOPEZ GOROSTIAGA, 1974. Studies on the zinc phosphate relationships in plant. In: Proceedings of the VII International Colloquium on Plant Analysis and Fertilizer Problems, Hannover, p. 261-272.

- MASSART, L. e J. HORENS, 1952. L'assimilation d'azote aminé par les levures. Enzymologia, Acta Biocatalytica, Den Haag, 3(15): 359-361.
- MAYNARD, D. N. ; A. V. BARKER e W. H. LACHMAN, 1968. Influence of potassium on the utilization of amonium by tomato plants. Proceedings of the American Society Horticultural Science, College Park, 92: 543-552.
- MORRIS, E. O., 1958. The Chemistry and Biology of Yeasts. New York, Academic Press, N. Y.
- MOTSARA, M. R., 1974. Micronutrient research in India. The identification and understanding of the problem with particular reference to zinc deficiency. In: Isotope-aided Micronutrient Studies in Rice Production with Special Reference to Zinc Deficiency. Vienna, FAO/IAEA, p. 61-74.
- NORDHEIN, W., 1969. Specific relations and correlations in metabolism of yeast cells. Antonie van Leeuwenhoek. Yeast Symposium, Amsterdam, 35: 4-9. Suplemento.
- OKOROKOV, L. A. ; L. P. LICHKO ; V. P. KHOLODEWKO ; V. M. KADONTSEVA ; S. B. PETRIKEVICH ; E. I. ZAICHKIN e A. M. KARIMOVA, 1975. Free and bound magnesium in fungi and yeast. Folia Microbiologica, Praque, 20(6): 460-466. Apud: Chemical Abstracts, Columbus, 85: 1976. (Ref. 156199 n).
- OLIVEIRA, J. S. e M. F. SOUSA, 1970. Quelques aspects du métabolisme minérale dans la levure *Candida utilis*. Revista de Ciências Agronômicas, Série A, Lourenço Marques, 3: 33-66.

- OLSON, H. e M. S. JOHNSON, 1949. Factors producing high yeast yields in synthetic media. Journal of Bacteriology, Baltimore, 57: 235-246.
- ORTH, R. A. e W. BUSHUK, 1973. Studies of gentenin. III. Identification of subunits coded by the D-genome e their relation to bread making quality. Cereal Chemistry, St. Paul, 50: 680.
- PECIULIS, J. ; E. AUGUSTAITTIENE ; K. PAKARSKYTE e J. VALAVICIUS, 1969. The role of micro elements on the acumulation of proteins and some vitamins in yeast cells. Antonie van Leeuwenhoek. Yeast Symposium. Amsterdam, 35: p. 13. Suplemento.
- PECIULIS, J., 1973. Physiologics biochemical activity of yeasts grown with trace elements. Itogi. Issled. Fziol. Biolkim. Rast., 1966-1970. gy. 1971. (Publ. 1972), 148-57. (Russ). Edited by Terentiev, V. M. Nauka i. Tekhnika; Minsk USSR. Apud: Chemical Abstracts, Columbus, 79: 329, 1973. (Ref. 30.438 x).
- PELCZAR, M. ; R. REID e E. C. S. CHAN, 1980. Microbiologia. São Paulo. Mc Graw-Hill do Brasil. v. 1.
- PIETZ, R. I. ; J. R. PETERSON ; C. LUE HING e L. F. WELCH, 1978. Variability in the concentration of twelve elements in rain. Journal of Environmental Quality, 7(1): 106-110.
- POPENKO, A. K. e Ya. K. BAYAKHUMOV, 1971. Effect of some trace elements on microorganisms. Izv. Akad. Nank. Kaz. SSR, Ser. Biol., 1971. 9(2): 33-38 (Russ). Chemical Abstracts, Columbus, 75: 101, 1971 (Ref. 45.928 y).

- REED, G. e H. J. PEPPLER, 1973. Yeast Technology. Westport, Connecticut, The Avi Publishing.
- SALGADO, J. M. e J. R. SARRUGE, 1979. Influência dos compostos nitrogenados e da relação C/N na obtenção do concentrado protéico de microrganismos. Revista Microbiológica, São Paulo, 10(1): 15-17.
- SARRUGE, J. R. e H. P. HAAG, 1974. Análise Química em Plantas. Piracicaba, SP. ESALQ/USP. Departamento de Química. 56 p.
- SCHULTZ, A. S. e S. POMPER, 1948. Amino acids as nitrogen source for the growth of yeasts. Archives of Biochemistry, New York, 19: 184-192.
- STEVENINK, J. Van e H. L. BOOIS, 1964. The role of polyphosphates in the transport mechanism of glucose in yeast cells. Journal of General Physiology, Baltimore, 48: 43-60.
- STEVENINK, J. van e A. ROTHSTEIN, 1965. Sugar transport and metal binding in yeast. Journal of General Physiology, Baltimore, 49: 235-246.
- SUGATA, H. e F. C. KOCH, 1926. Sulphur metabolism of yeast. Plant Physiology, Lancaster, 1: 337-347.
- SUOMALAINEN, H. e E. OURA, 1971. Yeast nutrition and solute uptake. In: ROSE, A. A. e J. S. HARRISON. The Yeasts. 3^a ed., London. Academic Press. v. 2 , p. 3.

- THORNE, R. S. W., 1933. The ability of certain pure chemical compounds to function as nitrogen sources for yeast. Journal of the Institute of Brewing, London, 39: 608-621.
- THORNE, R. S. W., 1941. The growth and fermentation of a strain of *S. cerevisiae* with amino acids as nutrients. Journal of the Institute of Brewing, London, 67: 259-272.
- THORNE, R. S. W., 1949. Nitrogen metabolism of yeast, a consideration of the mode of assimilation of amino acids. Journal of the Institute of Brewing, London, 55: 201-222.
- VAIRO, M. I. R. ; E. E. GREGORI e V. BORZANI, 1975. Respostas de um cultivo contínuo de *Saccharomyces cerevisiae* a perturbações por impulso provocadas por adição de sulfato de amônio. Revista Brasileira de Tecnologia, São Paulo, 6: 1-6.
- WANDZILAK, T. M. e R. W. BENSON, 1977. Yeast RNA polymerase. III. A zinc metalloenzyme. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 76: 247-252.
- WHITE, J., 1954. Yeast Technology. Chapman and Hall, London, 432 p.
- WHITNEY, P. A. e T. G. COOPER, 1970. Area carboxylase and allophanate hydrolase ; two components of a multienzyme complex in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 40: 814-819.
- WICKERHAM, L. J., 1946. A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. Journal of Bacteriology, Baltimore, 52: 293-301.

7 - A P Ê N D I C E

TABELA 1 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 07 horas sob arejamento constante

Tratamentos	(mg de matéria seca)					
	Fleischmann			IZ-1904		
	1º	2º		1º	2º	M-300-A
Testemunha	137,0 a	50,0 a		84,1 a	63,0 a	105,0 a
- N	140,5 a	59,0 a		73,7 a	59,4 a	121,0 a
- P	185,0 a	214,5 a		119,8 b	159,3 b	161,0 a
- Mg	383,0 b	388,0 a		170,8 a	153,1 b	392,0 b
- Mn	377,0 b	425,5 b		113,4	153,5 b	395,5 b
- Zn	387,0 b	423,0 b		122,4 b	149,2 b	396,5 b
Completa	403,5 b	424,5 b		122,8 b	152,6 b	387,0 b

Obs.: Os resultados são médias de duas repetições

C. V. Res. A = 2,56 d.m.s. 1% = 39,5

C. V. Res. B = 3,57 d.m.s. 5% = 32,8

a - Houve diferença significativa quando comparada com o tratamento completo

b - Houve diferença significativa quando comparada com a testemunha

(uu) Significativo ao nível de 1%

(u) Significativo ao nível de 5%

TABELA 2 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de xarope na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante

Tratamentos	mg de matéria seca					
	Fleischmann		IZ-1904		M-300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	486,5 a ^u	294,0 a ^{uu}	325,8 a ^{uu}	210,1 a ^{uu}	408,0 a ^{uu}	288,5 a ^{uu}
- N	514,0 a ^{uu}	342,0 a ^{uu}	316,5 a ^{uu}	198,6 a ^{uu}	439,5 a ^{uu}	314,5 a ^{uu}
- P	687,0 a ^{uu} b ^{uu}	595,0 a ^{uu} b ^{uu}	761,6 b ^{uu}	718,0 b ^{uu}	629,5 a ^{uu} b ^{uu}	523,5 a ^{uu} b ^{uu}
- Mg	968,5 b ^{uu}	721,0 a ^{uu} b ^{uu}	823,9 b ^{uu}	721,0 b ^{uu}	767,5 b ^{uu}	814,0 a ^{uu} b ^{uu}
- Mn	989,0 b ^{uu}	883,0 b ^{uu}	818,6 b ^{uu}	745,7 b ^{uu}	726,0 b ^{uu}	715,0 b ^{uu}
- Zn	967,0 b ^{uu}	790,0 b ^{uu}	830,8 b ^{uu}	745,8 b ^{uu}	706,5 b ^{uu}	674,0 b ^{uu}
Completa	992,0 b ^{uu}	804,0 b ^{uu}	808,4 b ^{uu}	739,3 b ^{uu}	728,5 b ^u	670,5 b ^{uu}

Obs.: Os resultados são médias de duas repetições

C. V. Res. A = 0,77 d.m.s. 1% = 97,9

C. V. Res. B = 1,83 d.m.s. 5% = 80,9

a - Houve diferença significativa quando comparada com o tratamento completo

b - Houve diferença significativa quando comparada com a testemunha

(uu) Significativo ao nível de 1%

(u) Significativo ao nível de 5%

TABELA 3 - Porcentagem da viabilidade das células Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, multiplicados em mosto de xarope suplementado com vários elementos

Tratamento	Fleischmann		IZ-1904		M - 300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	77,0	88,7	89,5	98,0	100,0	100,0
- N	95,5	91,2	95,7	98,2	100,0	99,0
- P	94,5	62,7	91,2	94,0	98,3	100,0
- Mg	91,0	79,4	90,4	93,2	93,3	100,0
- Mn	82,5	85,5	92,2	93,0	89,3	97,6
- Zn	87,6	83,5	88,6	96,0	100,0	98,6
Completa	80,0	86,0	88,2	94,2	100,0	100,0

TABELA 4 - Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, multiplicadas em mosto de xarope suplementados com vários elementos

Tratamentos	Fleischmann		IZ-1904		M-300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	2,8	5,3	19,7	15,9	15,0	12,8
- N	12,0	13,6	28,2	35,0	11,6	18,7
- P	17,3	29,6	35,4	54,5	15,8	38,0
- Mg	35,8	49,6	29,4	49,0	47,7	43,0
- Mn	27,5	48,4	34,7	39,2	40,4	45,3
- Zn	25,1	46,3	31,3	32,0	36,8	39,4
Completa	28,1	47,6	40,2	33,3	53,2	32,7

TABELA 5 - Teores de ART no vinho obtido na multiplicação das levedu-
ras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, em mosto de xarope suple-
mentados com vários elementos, após 22 horas sob arejamento
constante

	% ART (g/100 ml)							
	Fleischmann				IZ-1904			
	1º	2º	1º	2º	1º	2º	1º	2º
T	1,70	1,90	2,10	2,30	1,80	1,98		
- N	1,50	1,90	1,90	2,20	1,90	1,80		
- P	1,00	1,20	0,70	0,60	0,35	1,14		
- Mg	0,15	0,05	0,02	0,02	0,20	0,03		
- Mn	0,05	0,02	0,02	0,02	0,20	0,02		
- Zn	0,15	0,02	0,02	0,02	0,15	0,02		
Completo	0,15	0,02	0,02	0,02	0,15	0,02		

TABELA 6 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 07 horas sob arejamento constante

Tratamentos	mg de matéria seca					
	Fleischmann			IZ-1904		
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	265,0 a ^{uu}	8,0 a	223,0 a ^{uu}	180,0 a ^{uu}	351,0 a	221,0 a ^u
- N	333,0 a ^{uu} b ^{uu}	227,0 a ^{uu} b ^{uu}	245,5 a ^{uu} b ^{uu}	241,5 a ^{uu} b ^{uu}	490,5 a ^{uu} b ^{uu}	851,0 a ^{uu} b ^{uu}
- P	310,0 a ^{uu} b ^{uu}	183,5 a ^{uu} b ^{uu}	223,0 a ^{uu}	189,0 a ^{uu}	417,0 a ^{uu} b ^{uu}	277,0 a ^{uu} b ^{uu}
- Mg	613,0 a ^{uu} b ^{uu}	606,0 a ^{uu} b ^{uu}	364,5 a ^{uu} b ^{uu}	362,0 a ^{uu} b ^{uu}	675,0 a ^{uu} b ^{uu}	655,5 a ^{uu} b ^{uu}
- Mn	617,5 a ^{uu} b ^{uu}	633,0 a ^{uu} b ^{uu}	328,6 a ^{uu} b ^{uu}	349,0 a ^{uu} b ^{uu}	662,5 a ^{uu} b ^{uu}	650,0 a ^{uu} b ^{uu}
- Zn	584,0 a ^{uu} b ^{uu}	520,0 b ^{uu}	328,0 a ^{uu} b ^{uu}	288,0 a ^{uu} b ^{uu}	618,0 b ^{uu}	630,5 a ^{uu} b ^{uu}
Completa	593,0 b ^{uu}	533,0 b ^{uu}	309,0 b ^{uu}	303,0 b ^{uu}	616,0 b ^{uu}	616,0 b ^{uu}

Obs.: Os resultados são médias de duas repetições

C. V. Res. A = 0,28 d.m.s. 1% = 15,7

C. V. Res. B = 0,73 d.m.s. 5% = 13,1

a - Houve diferença significativa quando comparada com o tratamento completo

b - Houve diferença significativa quando comparada com a testemunha

(uu) Significativo ao nível de 1%

(u) Significativo ao nível de 5%

TABELA 7 - Efeito da suplementação de vários elementos em mosto de melão na multiplicação das leveduras Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante

Tratamentos	mg de matéria seca					
	Fleischmann			IZ-1904		
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	754,0 a ^{uu}	143,0 a ^{uu}	646,0	636,5 a ^u	853,5 a ^{uu}	729,0 a ^{uu}
- N	862,0 a ^{uu uu} b ^{uu}	365,0 a ^{uu uu} b ^{uu}	736,5 a b	718,5 b ^{uu}	882,0	798,0 a ^{u uu} b ^{uu}
- P	893,0 a ^{uu}	144,0 a ^{uu}	597,0	620,0 a ^{uu}	935,5 b ^{uu}	956,0 a ^{u uu} b ^{uu}
- Mg	1095,0 b ^{uu}	1015,0 a ^{u uu} b ^{uu}	737,5 a b	750,0 a ^{u uu} b ^{uu}	992,5 a ^{uu uu} b ^{uu}	966,5 a ^{uu uu} b ^{uu}
- Mn	1056,0 b ^{uu}	1080,0 b ^{uu}	686,0 a b	741,5 b ^{uu}	946,0 b ^{uu}	935,5 b ^{uu}
- Zn	1076,5 b ^{uu}	1054,5 b ^{uu}	599,0 b	687,0 b ^u	933,5 b ^{uu}	929,5 b ^{uu}
Completo	1057,0 b ^{uu}	1072,0 b ^{uu}	589,0 b	692,0 b ^u	922,0 b ^{uu}	901,0 b ^{uu}

Obs.: Os resultados são médias de duas repetições

C.V. Res. A = 2,17 d.m.s. 1% = 61,2

C.V. Res. B = 1,97 d.m.s. 5% = 50,0

a - Houve diferença significativa quando comparada com o tratamento completo

b - Houve diferença significativa quando comparada com a testemunha

(uu) Significativo ao nível de 1%

(u) Significativo ao nível de 5%

TABELA 8 - Porcentagem de viabilidade das células Fleischmann, IZ-1904 e M-300-A multiplicada em mosto de melaço suplementados com vários elementos

Tratamento	Fleischmann		IZ-1904		M-300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	94,2	100,0	99,4	99,5	99,4	98,3
- N	99,2	97,7	99,2	99,1	98,3	97,7
- P	80,3	98,5	99,2	97,4	97,5	98,6
- Mg	99,2	94,4	98,8	98,6	96,3	98,6
- Mn	80,4	95,5	96,6	99,4	95,5	98,7
- Zn	94,0	96,5	97,8	98,7	96,1	98,6
Completa	98,0	97,1	97,7	96,8	95,3	98,1

TABELA 9 - Porcentagem de brotamento em células de leveduras Fleischmann , IZ-1904 e M-300-A, multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos

Tratamentos	Fleischmann		IZ-1904		M-300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Testemunha	10,0	9,0	8,3	8,8	5,1	7,1
- N	6,2	8,5	8,6	24,3	11,5	9,2
- P	10,0	12,4	15,9	19,5	4,2	19,5
- Mg	34,1	25,7	21,7	26,1	33,7	43,7
- Mn	31,5	24,2	28,2	29,1	29,9	27,3
- Zn	18,7	21,6	33,7	28,5	21,5	44,6
Completa	32,2	27,2	24,1	22,1	38,0	27,9

TABELA 10 - Análise mineral da levedura Fleischmann, multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos

Teores do elemento na matéria seca					
	N (%)	K (%)	P (%)	Mg (%)	Zn (ppm)
T	3,5 a 4,4	0,5 a 4,4	0,3 a 4,4	0,04 a 4,4	112 a 4,4
- N	3,6 a 4,4	1,2	0,6 a 4,4	0,05 a 4,4	372 a 4,4
- P	7,0	0,9 a 4,4	0,3 a 4,4	0,05 a 4,4	902 a 4,4
- Mg	7,9	1,1	1,5 a	0,10	577
- Mn	7,1	1,2	1,6	0,10	552
- Zn	7,5	1,2	1,6	0,10	135 a 4,4
Completo	7,4	1,2	1,6	0,10	602

Para N:	C. V. = 3,72	d.m.s. 1% =	1,2735	d.m.s. 5% =	0,9303
Para K:	C. V. = 3,62	d.m.s. 1% =	0,2005	d.m.s. 5% =	0,1499
Para P:	C. V. = 10,56	d.m.s. 1% =	0,6105	d.m.s. 5% =	0,4502
Para Mg:	C. V. = 4,64	d.m.s. 1% =	0,0205	d.m.s. 5% =	0,0149
Para Zn:	C. V. = 6,23	d.m.s. 1% =	157,3262	d.m.s. 5% =	114,9218

(4,4) Significativo ao nível de 1%

TABELA 11 - Análise mineral da levedura IZ-1904 , multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos

Teores do elemento na matéria seca					
	N (%)	K (%)	P (%)	Mg (%)	Zn (ppm)
T	3,8 a μ	0,5	0,5 a $\mu\mu$	0,05 μ	250 a $\mu\mu$
- N	3,8 a μ	0,9 a $\mu\mu$	0,8 a $\mu\mu$	0,07	1.112 a $\mu\mu$
- P	5,9	0,5	0,3 a $\mu\mu$	0,06	1.200 a $\mu\mu$
- Mg	7,5	0,5	1,8	0,08	1.425
- Mn	8,1	0,5	1,9	0,08	1.375
- Zn	7,1	0,7 a μ	2,3 a $\mu\mu$	0,09	95 a $\mu\mu$
Completa	7,5	0,5	1,9	0,09	1.412

Para N: C. V. = 1,28 d.m.s. 1% = 4,3541 d.m.s. 5% = 3,1805

Para K: C. V. = 6,78 d.m.s. 1% = 0,2052 d.m.s. 5% = 0,1499

Para P: C. V. = 6,53 d.m.s. 1% = 0,4803 d.m.s. 5% = 0,3502

Para Mg: C. V. = 0,00 d.m.s. 1% = 0,0450 d.m.s. 5% = 0,0335

Para Zn: C. V. = 1,76 d.m.s. 1% = 93,78 d.m.s. 5% = 68,5

($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%

(μ) Significativo ao nível de 5%

TABELA 12 - Análise mineral da levedura M-300-A multiplicada em mosto de xarope suplementado com vários elementos

Teores do elemento na matéria seca					
	N (%)	K (%)	P (%)	Mg (%)	Zn (ppm)
T	4,6 a $\mu\mu$	0,3 a $\mu\mu$	0,3	0,06	165 a μ
- N	5,2 a $\mu\mu$	1,2 a $\mu\mu$	0,7	0,07	405 a $\mu\mu$
- P	7,1	1,1	0,4	0,05 a μ	952 a $\mu\mu$
- Mg	7,7	0,6 a μ	1,1	0,07	422 a $\mu\mu$
- Mn	7,3	0,9	1,1	0,08	447 a $\mu\mu$
- Zn	7,4	0,9	1,1	0,08	87 a $\mu\mu$
Completa	7,6	0,9	1,1	0,1	622
Para N:	C. V. = 3,2959	d.m.s. 1% = 1,2056	d.m.s. 5% = 0,8806		
Para K:	C. V. = 9,2518	d.m.s. 1% = 0,3839	d.m.s. 5% = 0,2804		
Para P:	C. V. = 3,1979	d.m.s. 1% = 0,1451	d.m.s. 5% = 0,1060		
Para Mg:	C. V. = 14,6731	d.m.s. 1% = 0,0580	d.m.s. 5% = 0,0454		
Para Zn:	C. V. = 3,6803	d.m.s. 1% = 88,5819	d.m.s. 5% = 64,7063		
($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%					
(μ) Significativo ao nível de 5%					

TABELA 13 - Análise mineral da levedura Fleischmann multiplicada em mosto de melaço suplementado com vários elementos

Teores de elemento na matéria seca						
	N (%)	K (%)	P (%)	Mg (%)	Zn (ppm)	
T	4,3 a $\overline{uu}$	1,0 a $\overline{uu}$	0,8 a $\overline{u}$	0,20		406
- N	4,0 a $\overline{u}$	2,1	1,9	0,25		547
- P	5,6 a $\overline{uu}$	1,2 a $\overline{uu}$	0,8 a $\overline{u}$	0,10 a $\overline{uu}$		446
- Mg	6,9	2,8 a	1,8	0,27		462
- Mn	6,6	2,6	1,4	0,27		397
- Zn	7,1	2,6	1,6	0,31		205 a $\overline{uu}$
Completa	7,1	2,3	1,5	0,25		495
Para N: C. V. =	4,3047	d.m.s. 1% =	1,3977	d.m.s. 5% =		1,0210
Para K: C. V. =	4,8793	d.m.s. 1% =	0,5609	d.m.s. 5% =		0,4097
Para P: C. V. =	10,2154	d.m.s. 1% =	0,7869	d.m.s. 5% =		0,5748
Para Mg: C. V. =	11,5411	d.m.s. 1% =	0,1465	d.m.s. 5% =		0,1070
Para Zn: C. V. =	11,1628	d.m.s. 1% =	256,2956	d.m.s. 5% =		187,2159
($\overline{uu}$)	Significativo ao nível de 1%					
($\overline{u}$)	Significativo ao nível de 5%					

TABELA 16 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope, na multiplicação da levedura Fleischmann, após 7 horas sob arejamento constante

ppm N	mg de matéria seca			Médias
	ppm P			
	0	75	150	
0	173,7	219,1	231,5	208,1
100	296,5	335,6	332,3	321,5 $\mu\mu$
200	365,5	403,6	400,8	390,1 $\mu\mu$
300	398,9	451,5	428,3	426,3 $\mu\mu$
400	434,7	460,3	464,2	453,0 $\mu\mu$
Médias	333,8	374,0 $\mu\mu$	371,4 $\mu\mu$	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 3,88

d.m.s. 1% = 23,7

d.m.s. 5% = 19,2

Para níveis de P: C. V. = 3,88

d.m.s. 1% = 16,2

d.m.s. 5% = 12,6

($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%

TABELA 17 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope, na multiplicação da levedura Fleischmann, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	mg de matéria seca			Médias
	ppm P			
	0	75	150	
0	516,7	566,8	595,3	559,6
100	882,4	944,7	1.007,0	944,7 μμ
200	1.131,7	1.224,9	1.234,8	1.197,1 μμ
300	1.095,5	1.244,3	1.159,8	1.166,5
400	1.074,1	1.124,8	1.110,6	1.103,1
Médias	940,0	1.021,0 μμ	1.021,5 μμ	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 3,30

d.m.s. 1% = 54,5

d.m.s. 5% = 44,2

Para níveis de P: C. V. = 3,30

d.m.s. 1% = 37,2

d.m.s. 5% = 28,9

($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%

TABELA 18 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura 12-1904, após 7 horas sob arejamento constante

mg de matéria seca		Médias		
ppm N	ppm P			
0	75			
	150			
0	69	112	97	92,4
100	167	195	181	181,1
200	213	233	203	216,5
300	236	238	239	237,6
400	263	264	243	256,6
Médias	189,6	208,4	192,6	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 15,35

d.m.s. 1% = 51,2

d.m.s. 5% = 41,5

Para níveis de P: C. V. = 15,35

d.m.s. 1% = 35,0

d.m.s. 5% = 27,2

(UU) Significativo ao nível de 1%

TABELA 19 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação da levedura 12-1904, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	mg de matéria seca			Médias
	ppm P			
	0	75	150	
0	255	344	269	289,5
100	609	695	653	652,3 $\mu\mu$
200	875	862	866	867,6 $\mu\mu$
300	914	915	981	936,5 μ
400	1.024	947	1.025	998,8 μ
Médias	735,5	752,6	758,8	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 5,69

d.m.s. 1% = 72,4

d.m.s. 5% = 58,6

Para níveis de P: C. V. = 5,69

d.m.s. 1% = 49,4

d.m.s. 5% = 38,4

($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%

(μ) Significativo ao nível de 5%

TABELA 20 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope na multiplicação da levedura M-300-A, após 7 horas, sob arejamento constante

ppm N	mg de matéria seca			
	ppm P		Médias	
	0	75	150	
0	123	154	142	139,5
100	215	216	227	219,3 $\overline{uu}$
200	259	262	260	260,0 $\overline{u}$
300	281	292	300	291,0 $\overline{u}$
400	309	271	319	299,6
Médias	237,4	239	249,5	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 11,0

d.m.s. 1% = 45,1

d.m.s. 5% = 36,5

Para níveis de P: C. V. = 11,0

d.m.s. 1% = 30,8

d.m.s. 5% = 23,9

($\overline{uu}$) Significativo ao nível de 1%

($\overline{u}$) Significativo ao nível de 5%

TABELA 21 - Efeito da suplementação de nitrogênio e fósforo em diferentes níveis, em mosto de xarope na multiplicação da levedura M-300-A, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	mg de matéria seca			
	ppm P		Média	
	0	75	150	
0	275	336	267	292,7
100	612	544	529	561,7 $\mu\mu$
200	768	743	716	742,3 $\mu\mu$
300	767	857	872	832,0 $\mu\mu$
400	792	903	920	871,6
Média	642,8	676,6	660,8	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 6,34

d.m.s. 1% = 71,1

d.m.s. 5% = 57,5

Para níveis de P: C. V. = 6,34

d.m.s. 1% = 48,5

d.m.s. 5% = 37,7

($\mu\mu$) Significativo ao nível de 1%

TABELA 22 - Teores de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura Fleischmann, em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	% ART (g/100 ml)		
	ppm P		
	0	75	150
0	1,80	1,76	1,70
100	0,70	0,76	0,56
200	0,03	0,04	0,02
300	0,02	0,02	0,02
400	0,02	0,02	0,02
Médias	0,51	0,52	0,46

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 19,30

d.m.s. 5% = 0,1322

Para níveis de P: C. V. = 19,30

d.m.s. 5% = 0,0867

(u) Significativo ao nível de 5%

TABELA 23 - Teores de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura IZ-1904, em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	% de ART (g/100 ml)			Média
	ppm P			
	0	75	150	
0	1,53	1,60	1,53	1,55
100	0,10	0,23	0,21	0,19 μ
200	0,06	0,03	0,05	0,051
300	0,06	0,04	0,05	0,05
400	0,04	0,04	0,03	0,04
Média	0,36	0,39	0,37	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 38,04

d.m.s. 5% = 0,1961

Para níveis de P: C. V. = 38,04

d.m.s. 1% = 0,1286

(μ) Significativo ao nível de 5%

TABELA 24 - Teores de ART no vinho obtido na multiplicação da levedura M-300-A, em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	% de ART (g/100 ml)		
	ppm P		
	0	75	150
0	1,53	1,63	1,50
100	0,16	0,36	0,27
200	0,04	0,05	0,14
300	0,04	0,04	0,02
400	0,02	0,03	0,02

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 23,57

d.m.s. 5% = 0,1261

Para níveis de P: C. V. = 23,57

d.m.s. 5% = 0,0827

TABELA 25 - Porcentagem de viabilidade das células da levedura Fleischmann ,
multiplicadas em mosto de xarope suplementados com diferentes ní-
veis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento cons-
tante

ppm N	% de viabilidade das células		
	ppm P		
	0	75	150
0	99,3	100,0	100,0
100	98,5	98,1	99,4
200	96,0	99,2	98,1
300	97,5	96,6	97,4
400	97,9	95,8	97,6

Esses resultados são médias de três repetições

TABELA 26 - Porcentagem de viabilidade das células da levedura IZ-1904, multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	% de viabilidade das células		
	ppm P		
	0	75	150
0	99,1	100,0	97,0
100	100,0	98,4	98,4
200	97,6	98,6	96,5
300	93,8	98,9	98,9
400	93,7	95,2	95,2

Esses resultados são médias de três repetições

TABELA 27 - Porcentagem de viabilidade das células da levedura M-300-A multiplacadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

ppm N	% de viabilidade das células		
	ppm P		
	0	75	150
0	97,3	94,3	98,5
100	99,8	99,5	100,0
200	97,4	99,3	93,5
300	94,6	91,0	98,4
400	92,4	99,0	94,0

Esses resultados são médias de três repetições

TABELA 28 - Porcentagem de brotamento em células de levedura Fleischmann multiplicadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo, após 22 horas sob arejamento constante

% de brotamento de células				
ppm N	ppm P		Médias	
	0	75	150	
0	7,7	8,9	9,4	8,6
100	9,1	12,6	12,0	11,2
200	23,2	11,1	9,9	14,7
300	32,8	21,3	17,8	23,9 <u>uu</u>
400	30,5	44,1	24,8	33,1 <u>uu</u>
Médias	20,6	19,6	14,8	

Esses resultados são médias de três repetições

Para níveis de N: C. V. = 25,97

d.m.s. 1% = 8,1

d.m.s. 5% = 6,5

Para níveis de P: C. V. = 25,97

d.m.s. 1% = 5,5

d.m.s. 5% = 4,3

(uu) Significativo ao nível de 1%

TABELA 29 - Porcentagem de brotamento em células de levedura IZ-1904, multiplacadas em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo sob arejamento constante, após 2.2 horas

ppm N	% de brotamento das células		
	ppm P		
	0	75	150
0	15,4	5,3	5,4
100	15,9	9,9	13,6
200	53,0 μ	32,2	36,9 (P)
300	66,6 μ	62,0 $\mu\mu$	45,6 (P) μ
400	61,5 μ	35,7	57,6 $\mu\mu$

Esses resultados são médias de três repetições

C. V. = 31,36

d.m.s. 1% = 39,16

d.m.s. 5% = 33,01

d.m.s. 5% = 35,29 (compara o tratamento com parcela perdida com os outros)

d.m.s. 5% = 40,4 (compara os dois tratamentos com parcela perdida entre si)

(P) = tratamentos com uma parcela perdida

($\mu\mu$) = significativo ao nível de 1%

(μ) = significativo ao nível de 5%

TABELA 30 - Porcentagem de brotamento em células da levedura M-300-A., multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo sob arejamento constante, após 22 horas

ppm N	% de brotamento das células			
	ppm P		Médias	
	0	75		
0	0,4	0,0	1,5	0,6
100	0,2	0,4	0,9	0,4
200	2,5	0,9	2,5	2,0
300	5,1	19,9	19,6	14,9
400	1,9	19,0	13,3	11,4
Médias	2,0	8,0	7,5	

Esses resultados são médias de três repetições:

Para níveis de N: C. V. = 61,1
d.m.s. 1% = 6,0
d.m.s. 5% = 4,9

Para níveis de P: C. V. = 61,1
d.m.s. 1% = 4,1
d.m.s. 5% = 3,2

TABELA 31 - Teores de minerais da levedura Fleischmann multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo

Tratamento N x P	N %	P %	K %	Mg %	Mn ppm	Zn ppm
0 x 0	3,6	0,5	1,7	0,13	17	670
100 x 0	3,7	2,0	1,9	0,20	17	666
200 x 0	4,1	2,1	2,7	0,26	28	590
300 x 0	5,5	1,9	2,2	0,30	26	434
400 x 0	6,9	2,2	2,1	0,30	26	448
0 x 75	3,2	1,7	2,6	0,29	25	710
100 x 75	2,2	2,1	2,8	0,28	25	650
200 x 75	3,9	2,1	2,7	0,29	25	597
300 x 75	4,9	2,0	2,6	0,30	33	489
400 x 75	6,2	2,3	2,4	0,34	33	478
0 x 150	3,3	2,0	2,5	0,26	23	563
100 x 150	3,4	2,0	2,6	0,28	22	589
200 x 150	4,1	2,1	2,6	0,31	24	602
300 x 150	6,9	2,1	2,7	0,29	28	474
400 x 150	5,8	2,2	2,8	0,38	29	496

TABELA 32 - Teores de minerais da levedura 12-1904 multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo

Tratamento N x P	N %	P %	K %	Mg %	Mn ppm	Zn ppm
0 x 0	5,5	0,6	2,2	0,21	44	1.137
100 x 0	5,7	2,1	2,7	0,61	50	1.575
200 x 0	6,1	2,3	1,9	0,49	63	1.437
300 x 0	7,0	2,2	1,9	0,46	90	1.050
400 x 0	8,3	2,3	1,8	0,46	138	912
0 x 75	5,3	1,9	2,8	0,49	40	1.612
100 x 75	5,3	2,2	3,0	0,46	53	1.637
200 x 75	6,0	2,0	2,1	0,39	64	1.037
300 x 75	8,1	2,5	2,3	0,48	106	1.100
400 x 75	8,5	2,4	2,0	0,51	119	1.050
0 x 150	5,2	2,1	3,0	0,44	35	1.575
100 x 150	5,7	2,3	3,0	0,44	50	1.600
200 x 150	6,0	2,3	2,7	0,41	64	1.312
300 x 150	7,0	2,3	2,5	0,39	79	1.112
400 x 150	8,6	2,5	2,3	0,44	131	1.037

TABELA 33 - Teores de minerais da levedura M-300-A, multiplicada em mosto de xarope suplementado com diferentes níveis de nitrogênio e fósforo

Tratamento N x P	N %	P %	K %	Mg %	Mn ppm	Zn ppm
0 x 0	4,2	1,5	2,1	0,27	26	730
100 x 0	4,5	2,8	2,4	0,35	28	798
200 x 0	5,7	2,8	2,8	0,37	37	725
300 x 0	7,2	2,7	2,3	0,39	35	751
400 x 0	7,6	3,0	2,7	0,39	35	730
0 x 75	4,5	2,7	2,7	0,38	33	746
100 x 75	4,8	2,5	2,4	0,40	32	805
200 x 75	5,2	2,9	2,7	0,41	29	790
300 x 75	6,3	2,5	2,2	0,35	31	727
400 x 75	6,8	2,8	2,0	0,36	37	710
0 x 150	4,5	2,8	2,8	0,39	27	587
100 x 150	4,9	2,7	2,1	0,32	23	686
200 x 150	5,7	2,8	2,5	0,38	27	735
300 x 150	6,5	2,7	2,7	0,34	29	686
400 x 150	6,8	2,9	2,5	0,34	47	698

TABELA 34 - Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento em levedura Fleischmann

Matéria seca (mg)	% de brotamento	Matéria seca (mg)	% de brotamento
294	5,3	992	28,1
342	13,1	1.002	10,1
480	9,1	1.007	14,7
486	2,8	1.035	25,6
514	12,0	1.058	20,5
518	4,7	1.060	42,8
526	9,3	1.067	18,2
566	9,0	1.069	30,2
567	9,7	1.071	26,4
591	8,7	1.074	34,9
595	29,6	1.077	29,9
595	15,4	1.085	25,8
602	8,0	1.085	32,8
617	4,3	1.096	35,7
687	17,3	1.101	50,0
721	49,6	1.111	33,9
790	46,3	1.125	39,7
804	47,6	1.127	23,9
835	10,0	1.132	20,1
882	5,7	1.150	12,1
883	48,4	1.151	15,5
884	17,0	1.160	14,0
934	12,4	1.184	30,1
945	8,4	1.194	10,1
958	11,5	1.202	13,3
967	25,1	1.219	7,9
968	35,8	1.225	10,9
978	14,9	1.235	7,7
983	11,2	1.244	20,6
989	27,5		

TABELA 35 - Relação entre matéria seca e porcentagem de
brotamento em levedura 12-1904

Matéria seca (mg)	% de brotamento	Matéria seca (mg)	% de brotamento
198	3,5	819	34,7
210	15,9	824	29,4
230	7,9	831	31,3
231	1,9	833	25,6
256	10,6	834	48,0
280	27,7	849	52,1
286	4,2	855	47,6
291	10,3	861	16,2
316	8,2	864	57,7
326	19,7	870	45,4
334	8,1	875	13,7
347	3,7	879	50,2
351	4,1	897	56,9
548	15,8	899	23,4
631	11,7	899	55,9
638	23,9	911	23,4
641	8,1	946	60,3
646	9,8	965	77,7
677	11,9	972	98,7
683	19,4	978	40,5
702	9,7	985	67,8
705	8,3	1.011	50,8
718	54,5	1.015	37,7
721	49,0	1.017	60,4
739	33,3	1.030	55,2
746	39,2	1.041	86,5
746	32,0	1.056	70,2
761	35,4	1.060	49,9
803	40,2		

TABELA 36 - Relação entre matéria seca e porcentagem de brotamento em levedura M-300-A

Matéria seca (mg)	% de brotamento	Matéria seca (mg)	% de brotamento
248	0,5	711	7,5
264	0,8	715	45,3
267	2,5	721	11,0
270	1,4	726	40,4
276	0,0	728	53,2
277	0,0	728	0,0
282	0,8	743	2,6
288	12,8	744	2,9
296	0,0	757	0,3
314	18,7	767	47,3
408	15,0	772	0,0
439	11,6	783	0,9
352	0,0	789	0,3
490	0,0	795	3,6
519	1,8	810	0,0
523	0,5	811	2,9
523	38,0	814	43,0
540	0,0	820	0,0
566	0,0	829	15,0
619	0,6	833	27,8
622	0,7	855	13,4
629	15,8	857	13,4
648	0,0	857	23,9
665	0,0	866	21,4
670	32,7	875	21,0
674	39,4	912	22,6
706	6,9	930	19,1
706	36,8	932	15,7
		946	10,2
		963	5,7

TABELA 37 - População bacteriana após a multiplicação das leveduras Fleischmann , 1Z-1904 e M-300-A , após 22 horas sob arejamento constante:

1º Experimento

1º) Efeito da suplementação dos vários elementos em mosto de xarope e melaço na multiplicação das leveduras Fleischmann , 1Z-1904 e M-300-A

	X 10 ⁶ bactérias por ml de vinho bruto					
	Fleischmann		1Z-1904		M-300-A	
	1º	2º	1º	2º	1º	2º
Xarope	10,6	6,6	5,0	5,1	5,0	7,0
Melaço	18,2	14,2	3,5	4,0	20,2	14,2

2º Experimento

Efeito da suplementação dos elementos nitrogênio e fósforo em diferentes níveis em mosto de xarope, na multiplicação das leveduras Fleischmann , 1Z-1904 e M-300-A

	X 10 ⁶ bactérias por ml de vinho bruto		
	Fleischmann	1Z-1904	M-300-A
1. ^a repetição	7,0	1,5	0,2
2. ^a repetição	5,0	2,0	0,2
3. ^a repetição	8,0	0,9	0,5