EFEITO DA REMOÇÃO DE CÉLULAS SOBRE O RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR LEVEDURAS

VALENTINA DE FÁTIMA DE MARTIN
Química

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Abril - 1987

D372e De Martin, Valentina de Fátima
Efeito da remoção de células sobre o
rendimento da fermentação alcoólica por
leveduras. Piracicaba, 1987.
190p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fermentação alcoólica - Rendimento
2. Levedura - Célula - Remoção. 3. Levedu
ra na nutrição animal. I. Escola Superior
de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 663.503

EFEITO DA REMOÇÃO DE CÉLULAS SOBRE O RENDIMENTO
DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA POR LEVEDURAS

VALENTINA DE FÁTIMA DE MARTIN

Aprovada em 04.08.1987

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez
Prof.ª Dr.ª Dejanira R. De Angelis

ESALQ/USP
IBRC/UNESP

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira
Orientador

Aos meus pais

MARIA e VITÓRIO

OFEREÇO.

ã ADÉLIA, CONCEIÇÃO,

ROSE e ALESSANDRO

DEDICO.

SINCEROS AGRADECIMENTOS

a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial,

Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira;

Ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim;

Ao Prof. Dr. Luiz Eduardo Gutierrez;

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Basso;

Ao Prof. Dr. Humberto de Campos;

Ao Engº Agrônomo Alessandro A. Orelli Junior;

Ao Engº Florestal Valter J. Diehl;

Aos técnicos Zelinda Jordão, Roque S. Torres e Antonio C. Tra_{va}iolli;

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP;

Ao Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ/USP;

Ao Departamento de Química, Setor Bioquímica - ESALQ/USP;

À FERMENTEC S/C Ltda. - Assessoria em Fermentação Alcoólica, Piracicaba, SP;

Ao CEBITEC - ESALQ/USP;

À CAPES;

À FINEP;

À todos os amigos do Departamento de Química, Setor Bioquímica - ESALQ/USP.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO	xxiv
SUMMARY	xxvi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Considerações sobre a sangria de levedura no processo de fermentação alcoólica de Melle-Boinot	03
2.2. A levedura de destilaria de álcool de cana- de-açúcar (<i>S. cerevisiae</i>) e seu uso como ra- ção animal	13
2.2.1. Composição química da levedura	16
2.2.2. Valor nutritivo da levedura	22
2.2.3. Efeito tóxico da levedura	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Leveduras utilizadas	26
3.2. Multiplicação das leveduras	26
3.2.1. Mostos utilizados	26
3.2.2. Determinação do °Brix no xarope	27
3.2.3. Determinação de ART no xarope e nos mostos	28
3.2.4. Determinação de sulfito no xarope ..	28
3.2.5. Determinação dos elementos minerais, no xarope e nos mostos	29
3.2.6. Suplementação de sais nos mostos ...	29
3.2.7. Determinação do pH nos mostos	30
3.2.8. Condução da multiplicação	30

3.3. Fermentação alcoólica com sangria de células de levedura	31
3.3.1. Caracterização dos experimentos ...	31
3.3.2. Mostos utilizados	32
3.3.3. Análises do melaço e mostos de xarope e melaço	33
3.3.4. Equipamentos utilizados (Fermentadores)	34
3.3.5. Condução dos experimentos	34
3.3.6. Tempo de fermentação	36
3.3.7. Porcentagens de célula em volume removidas (sangrias)	36
3.3.8. Determinação do teor de matéria seca	37
3.3.9. Determinação do número de células .	39
3.3.10. Determinação da viabilidade e brotamento celulares	40
3.3.11. Determinação da carga bacteriana ..	40
3.3.12. Determinação do teor alcoólico do vinho	40
3.3.13. Determinação do teor alcoólico na água de recuperação do álcool arrastado pelo gás carbônico	40
3.3.14. Determinação do pH no vinho	41
3.3.15. Determinação de AR no vinho	41
3.3.16. Determinação do rendimento da fermentação	41
3.4. Delineamento experimental e análise estatística	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. Comparação do efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos, conduzida com as leveduras tipo	

Fleischmann prensada e tipo Fleischmann multiplicada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 1)	45
4.1.1. Viabilidade celular	45
4.1.2. Brotamento celular	47
4.1.3. Número de células	48
4.1.4. Matéria seca	52
4.1.5. Rendimento da fermentação	54
4.2. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica, durante 7 ciclos, conduzida com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2) .	57
4.2.1. Viabilidade celular	57
4.2.2. Brotamento celular	61
4.2.3. Número de células	65
4.2.4. Matéria seca	68
4.2.5. Rendimento da fermentação	72
4.3. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica, durante 7 ciclos, conduzida com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).	77
4.3.1. Viabilidade celular	77
4.3.2. Brotamento celular	80
4.3.3. Número de células	84
4.3.4. Matéria seca	87
4.3.5. Rendimento da fermentação	91
4.4. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica, durante 7 ciclos, conduzida com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de melão a 33°C (Experimento 4)	96
4.4.1. Viabilidade celular	96

4.4.2. Brotamento celular	100
4.4.3. Número de células	103
4.4.4. Matéria seca	106
4.4.5. Rendimento da fermentação	110
4.5. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica, durante 7 ciclos, conduzida com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>), em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).....	114
4.5.1. Viabilidade celular	114
4.5.2. Brotamento celular	117
4.5.3. Número de células	120
4.5.4. Matéria seca	123
4.5.5. Rendimento da fermentação	127
5. CONCLUSÕES	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
APÊNDICE	143

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Fluxo de matéria-prima até a obtenção de açúcar, álcool e alguns subprodutos (<u>D'ARCE & MACHADO</u> , 1985)	06
2	Processo de secagem da levedura para ração animal (<u>GERMEK</u> , 1986)	10
3	Relação entre matéria seca (g) e porcentagem de células (v/v) para levedura tipo Fleischmann suspensa em água	38
4	Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 30°C	60
5	Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C	64
6	Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células, para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C	67
7	Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C	71

FIGURA Nº

Página

8	Rendimento de fermentação (%) em função dos direntes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 30°C	76
9	Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C	79
10	Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C	83
11	Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C	86
12	Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C	90
13	Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C	94
14	Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C	99

FIGURA Nº

Página

15	Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C	102
16	Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C	105
17	Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C	108
18	Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C	112
19	Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C	116
20	Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C	119
21	Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C	122

FIGURA Nº

Página

22	Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C.....	126
23	Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C.....	130

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
1	Composição elementar de leveduras comerciais e melaços (HARRISON, 1971)	17
2	Composição química (%) aproximada de <i>S. cerevisiae</i> de destilaria de álcool	18
3	Composição em aminoácidos (%) de <i>S. cerevisiae</i> em comparação com farelo de soja	20
4	Concentração de vitaminas, encontrada em várias leveduras (HARRISON, 1971)	21
5	Teores de nutrientes minerais no xarope.	27
6	Teores de nutrientes minerais nos mostos de xarope	28
7	Caracterização dos experimentos realizados com sangria de células (v/v) de levedura	32
8	Teores de nutrientes minerais no melaço.	33
9	Esquema de análise de variância para o delineamento em parcelas subdivididas em blocos casualizados (Experimento 1)	42
10	Esquema de análise de variância para o delineamento em parcelas subdivididas em blocos casualizados (Experimentos 2, 3, 4 e 5)	43

TABELA Nº

Página

11	Comparações das médias de viabilidade celular (%) das leveduras tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1)	46
12	Comparações das médias de brotamento celular (%) das leveduras tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1)	49
13	Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) das leveduras tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1)	51
14	Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para levedura tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1) ..	53
15	Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) conduzida com levedura tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1)	55
16	Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2)	58

TABELA Nº

Página

17	Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2)	62
18	Comparações das médias do número de células (células/mililitro x 10 ⁹) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2)	66
19	Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2)	70
20	Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2)	74
21	Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3)	78
22	Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).	81

23	Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3)	85
24	Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3)	89
25	Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3)	92
26	Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4)	98
27	Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4)	101
28	Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann, em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4)	104

TABELA Nº

Página

29	Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4) .	107
30	Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4)	110
31	Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).....	115
32	Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).....	118
33	Comparações das médias do número de células (células/mililitro x 10 ⁹) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>), em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).....	121
34	Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).....	125

35	Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (<i>S. cerevisiae</i>), em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5)	128
36	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições) Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann prensada e previamente multiplicada. Mosto: xarope (Brix: 14,80%; ART: 15,30%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C. (Experimento 1 - Bloco I)	146
37	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições) Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann: prensada e previamente multiplicada. Mosto: xarope (Brix: 14,80%; ART: 15,30%; pH: 3,60). Temperatura: 30°C. (Experimento 1 - Bloco II)	148
38	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições) Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischman (prensada). Mosto: xarope (Brix : 14,90%; ART: 15,00%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C (Experimento 2 - Bloco I) ...	150

39	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann - (prensada). Mosto: xarope (Brix: 14,90%; ART: 15,00%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C (Experimento 2 - Bloco II)	152
40	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann (prensada). Mosto: xarope (Brix: 14,90%; ART: 15,40%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 3 - Bloco I)	154
41	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann (prensada). Mosto: xarope (Brix: 14,90%; ART: 15,40%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 3 - Bloco II)	156
42	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann (prensada). Mosto: melaço (Brix: 19,80%; ART: 15,20%; pH: 3,60). Temperatura: 33°C (Experimento 4 - Bloco I)	158

43	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> tipo Fleischmann (prensada). Mosto: melaço (Brix: 19,80%; ART: 15,20%; pH: 3,60). Temperatura: 33°C (Experimento 4 - Bloco II)	160
44	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> linhagem M-300-A. Mosto: xarope (Brix: 14,98%; ART : 15,50%; pH 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 5 - Bloco I)	162
45	Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: <i>S. cerevisiae</i> linhagem M-300-A. Mosto: xarope (Brix: 14,88%; ART : 15,00%;pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 5 - Bloco II)	164
46	Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) em função da sangria de células (Experimento 1)	166
47	Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$ em função da sangria de células (Experimento 1)	167

TABELA Nº

Página

48	Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) em função da sangria de células (Experimento 1)	168
49	Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) em função da sangria de células (Experimento 1)	169
50	Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) em função da sangria de células (Experimento 1)	170
51	Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	171
52	Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em $\arcsen \sqrt{y/100}$ para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	172
53	Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	173
54	Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	174

TABELA Nº

Página

55	Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	175
56	Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3)	176
57	Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados para $\arcsen \sqrt{y/100}$, para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3)	177
58	Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2)	178
59	Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3) ...	179
60	Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3)	180
61	Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4) ...	181

62	Análise de variância dos dados de brota- mento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$ para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4)	182
63	Análise de variância dos dados de núme- ro de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4)	183
64	Análise de variância dos dados de maté- ria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4) .	184
65	Análise de variância dos dados de rendi- mento de fermentação (%) para os diferen- tes níveis de sangria de células (Experi- mento 4)	185
66	Análise de variância dos dados de viabi- lidade celular (%) para os diferentes ní- veis de sangria de células (Experimen- to 5)	186
67	Análise de variância dos dados de brota- mento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$ para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5)	187
68	Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5)	188

TABELA Nº

Página

69	Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5) ...	189
70	Análise de variância dos dados de rendimento alcoólico (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5)	190

EFEITO DA REMOÇÃO DE CÉLULAS SOBRE O RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR LEVEDURAS

Autora: VALENTINA DE FÁTIMA DE MARTIN

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

RESUMO

A maior parte das indústrias brasileiras produtoras de etanol trabalham com o processo de Melle-Boinot, o qual consiste essencialmente em centrifugar a levedura após completada a fermentação e reutilizar a mesma levedura no próximo ciclo fermentativo.

O presente trabalho visou basicamente estudar em escala de laboratório, o efeito da remoção de quantidades crescentes de células de levedura do processo (sangria) entre os ciclos fermentativos, sobre o rendimento da fermentação alcoólica.

Os experimentos foram conduzidos com a levedura prensada tipo Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) em mosto de xarope a 30°C e 33°C, em mosto de melaço a 33°C e com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

Após cada ciclo fermentativo foram retirados 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de células, durante sete ciclos.

Foram determinados viabilidade e brotamento celulares, número de células/ml, matéria seca, bactérias/ml e açúcares redutores residuais. A partir dos resultados das

análises do vinho foi calculado o rendimento da fermentação alcoólica.

Os resultados indicaram que, em escala de laboratório, a remoção de 5% a 20% (v/v) de células produziu os seguintes efeitos:

- aumentou a viabilidade e o brotamento celular da levedura tipo Fleischmann e não teve influência sobre a linhagem M-300-A;
- diminuiu o número de células e o teor de matéria seca de ambas as linhagens de levedura;
- diminuiu o rendimento da fermentação para ambas as linhagens de levedura.

EFFECT OF THE CELLS REMOVAL ON THE YIELD OF ALCOHOLIC FERMENTATION BY YEASTS

Author: VALENTINA DE FÁTIMA DE MARTIN

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

SUMMARY

Almost all the brasilian ethanol plants production work on the Melle-Boinot process, which consist essentially in centrifuging out the yeast after the fermentation is completed and reusing the same yeast in the next fermentation cycle.

The present work was undertaken to study on laboratory scale, the effect of the removal of increasing amounts of the yeast cells from the process (sangria) among the fermentative cycles on the alcoholic fermentation yield.

The experiments were performed with Fleischmann pressed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in must of sugar cane syrup at 30°C and 33°C, must of molasses at 33°C, and with yeast strain M-300-A (*S. cerevisiae*) in must of sugar cane syrup at 33°C.

After each fermentation cycle, 5%, 10%, 15% and 20% (v/v) of cells were removed, by seven cycles.

The cell viability, budding and the number of cells/ml, dry matter, bacterial cells/ml and residual reducing sugar were determined. From the results of the

fermented must analysis, the fermentation yield was calculated.

The results showed that, on a laboratory scale, the removal of cells from 5% up to 20% (v/v) had the following main effects:

- increase in cell viability and in cell budding for the Fleischmann pressed yeast but had no effect on the M-300-A strain;
- decrease in number of cells/ml and in dry matter for both strains of yeast;
- decrease in fermentation yield for both strains of yeast.

1. INTRODUÇÃO

Existe em todo o mundo grande interesse em substituir os suplementos proteicos tradicionalmente usados na alimentação animal por subprodutos ou resíduos agroindustriais de alto valor nutritivo, que apresente um baixo custo e que atenda à crescente demanda de proteína. Dentre as fontes alternativas a proteína de origem microbiana, particularmente a levedura, é considerada de alto teor proteico e rica em vitaminas e sais minerais.

O Brasil constitui-se no maior produtor de álcool do mundo, todo ele obtido por via fermentativa, e portanto um produtor em potencial de levedura como subproduto. No processo de fermentação de Melle-Boinot, usado pela grande maioria das usinas e destilarias brasileiras, as células de levedura são separadas do vinho por centrifugação para retornar ao processo. Dessa separação obtem-se uma suspensão do microrganismo, comumente denominada "leite-de-levedura". Segundo o princípio básico do processo, com a reciclagem de células a população do microrganismo será mantida elevada, o açúcar e nutrientes serão desviados para o desenvolvimento de

novas células e conseqüentemente obter-se-á um tempo de fermentação menor e um rendimento alcoólico mais elevado.

Entretanto, várias usinas e destilarias contestam essa teoria, mostrando que o desvio de parte da levedura a ser recirculada, para ser empregada como ração animal, não compromete a produção de etanol. Estas baseiam-se em evidências práticas porém, empíricas. Existem vários fatores envolvidos, os quais são pouco conhecidos e precisam ser elucidados e definidos. Dentre estes, pode-se destacar, a quantidade de células que pode ser desviada, os fatores que determinam essa quantidade, e as condições de fermentação e de equipamentos que permitem um maior ou menor nível de sangria.

Embora polêmica a prática da sangria de levedura no processo de fermentação alcoólica, é indiscutível a utilização deste subproduto no arraçoamento do gado de corte, uma vez que a safra ocorre justamente nos meses de seca (julho a outubro) quando a alimentação do gado é prejudicada pela falta de pastagem.

De um modo ou de outro o estudo do efeito da retirada de certa quantidade de massa celular do processo fermentativo é de grande interesse para as indústrias produtoras de álcool brasileiras.

O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar os efeitos da remoção de quantidades crescentes de levedura de um ciclo fermentativo para outro sobre o rendimento da fermentação alcoólica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A SANGRIA DE LEVEDURA NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE MELLE-BOINOT

A literatura mostrou-se desprovida de trabalhos científicos referentes ao efeito da sangria de levedura sobre o processo de fermentação alcoólica, particularmente em escala de laboratório. Em razão disso, foram revisados apenas os parâmetros que deverão ser considerados ao se estabelecer o índice de recuperação do microrganismo em cada destilaria de álcool e o que têm realizado algumas delas nesse campo.

Durante a fermentação alcoólica a multiplicação de levedura requer uma determinada quantidade de açúcar que em consequência deixa de se transformar em álcool (NEVES, 1938). Trabalhos de Pasteur e Duclaux citados pelo mesmo autor mostram que a formação de tecidos celulares de levedura requer de 1,5 a 2,0 gramas de açúcar por grama de levedura seca produzida. O consumo de açúcar, segundo KRETZSCHMAR (1961), é de aproximadamente 3,6% do açúcar total e pode variar, de acordo com STUPIELLO & HORII (1982), de 2% a 12% dependendo

das condições do meio e da própria condução da fermentação. OURA (1973) estabeleceu que células de levedura crescendo sob condições anaeróbicas consomem 6,2 moles de glucose para produzirem 100 gramas de matéria seca (11,16 g/g matéria seca).

Desenvolvido no ano de 1933, o sistema de fermentação de Melle-Boinot propôs-se a minimizar esse gasto de açúcar (ALMEIDA, 1960). Nesse sistema de fermentação, as células de levedura são recuperadas através de uma total recirculação das mesmas, de maneira a tornar mínima a formação de novas células pela manutenção da alta concentração celular e assim conseguir um aumento do rendimento alcoólico da fermentação através de um consumo menor de açúcar, empregado na formação de componentes celulares da levedura (JONES et alii, 1981; STUPIELLO & HORII, 1982). Com a utilização das mesmas células em circuito fechado, o consumo de açúcar para construção de novas células desaparece tão logo a concentração celular específica (CCE) correspondente ao limite de Brown seja atingida, permanecendo o consumo para a manutenção das mesmas (MARRILLER, 1951; DESMONTS, 1966). A marcha do processo de Melle-Boinot foi resumidamente descrita por HORII (1980); terminada a fermentação, o vinho resultante passa por filtros de malhas grossas (cerca de 3 mm) e malhas finas (cerca de 0,55 mm) e é enviado para as centrífugas. Após a centrifugação obtém-se duas fases: uma suspensão concentrada, com cerca de 60% de massa celular e a fase do sobrenadante, composta de vinho, resíduos mais leves e bactérias. Este sobrenadante é enviado para a dorna volante, uma espécie de depósito intermediário

de vinho onde fica aguardando para ser destilado. A suspensão concentrada de células, denominada normalmente de creme ou leite-de-levedura é enviada para as cubas de tratamento, providas de um sistema de agitação, onde sofre adição de água (cerca de 1,5 a 2,0 vezes o volume de leite) e ácido sulfúrico concentrado até o meio atingir um pH de 2,5 a 2,7. Essa suspensão deve permanecer sob essas condições durante aproximadamente 4 horas para que parte das bactérias remanescentes do processo sejam eliminadas ou reduzidas a níveis não prejudiciais à fermentação posterior. O leite-de-levedura assim tratado retorna às dornas, servindo de inóculo para o próximo ciclo fermentativo. A Figura 1 mostra, de maneira esquemática, o fluxo de matéria prima (cana-de-açúcar) até a obtenção do açúcar, álcool e alguns subprodutos.

Segundo AIBA et alii (1968), em fermentação alcoólica o crescimento celular cessa a um nível de 10^8 células/mililitro. Para DESMONTS (1966), a CCE dos mostos fermentados pelo processo Melle-Boinot varia, em destilaria de melaço de cana-de-açúcar, entre 400×10^9 e 550×10^9 células por litro de mosto, com um consumo de açúcar para a sua manutenção de aproximadamente 0,35 gramas e 0,33 gramas por grama de levedura (seca a 90%), respectivamente. A taxa de consumo de açúcar para a manutenção das células, na fermentação de cerveja, é substancialmente menor em relação à taxa de consumo de açúcar pelas células de levedura em crescimento (CASEY et alii 1984). SEARLE & KIRSOP (1979), trabalhando com fermentação em batelada para produção de cerveja, determinaram um consumo

FIGURA 1. Fluxo da matéria prima até a obtenção de açúcar, álcool e alguns subprodutos (D'ARCE & MACHADO, 1985).

de açúcar igual a 0,06 gramas/grama de levedura/hora para a manutenção da população de levedura que não está em crescimento.

O desvio da levedura comercializável não é, portanto, teoricamente gratuita uma vez que provoca gasto correspondente de açúcar para formação das células de substituição (DESMONTS, 1966). Segundo STUPIELLO & HORII (1982), as indústrias que praticam uma sangria de aproximadamente 10% do leite-de-levedura para produção de levedura seca, e que afirmam não sofrer prejuízo no rendimento do processo fermentativo, incorrem numa afirmação imprecisa e decorrente principalmente de um acompanhamento deficiente de processo.

Segundo AMORIM et alii (1985), durante os últimos nove anos, pesquisas em escala de laboratório e industrial indicaram que quanto maior a porcentagem de levedura no vinho, maior o rendimento da fermentação, o que levou à otimização do desempenho das centrífugas de várias destilarias. Por outro lado, conforme o mesmo autor, em destilarias anexas, a utilização de mel (meio rico em sais) acarreta uma multiplicação mais intensa e se a porcentagem de recirculação for alta, haverá um acúmulo de células "velhas" e uma queda na viabilidade que poderá afetar o rendimento. Esses resultados, segundo o autor, não foram repetidos em destilarias autônomas provavelmente devido à diferença na composição mineral do mosto.

No Brasil, é crescente o interesse das indústrias alcooleiras pela produção de proteína obtida pelo des-

vio de parte do leite-de-levedura no processo de fermentação Melle-Boinot (Figura 1). Abaixo estão citados os níveis de sangria praticados por algumas delas.

DESMONTS (1966) removeu de 15 a 25 gramas de levedura seca por litro de álcool de melaço de cana-de-açúcar, correspondendo a aproximadamente 15% do fermento do mosto fermentado, o que não afetou o rendimento ou a velocidade de fermentação. Na França, segundo o mesmo autor, em destilaria de beterraba, a sangria de 25% da CCE dos mostos não causou prejuízo aparente na produção de álcool.

A Usina Açucareira Santa Luiza, Araraquara-SP, recupera de 20 a 40 gramas de matéria seca por litro de álcool produzido a partir de melaço de cana-de-açúcar (PINNOTI, 1984).

Durante a safra de 1984, a Cia. Açucareira Vale do Rosário, Morro Agudo, SP, comercializou 700 toneladas de levedura seca para ração, obtidas pelo desvio das mesmas do processo industrial (BRITO, 1985).

Segundo GERMEK & KATZ (s.d.) após a centrifugação do vinho, desvia-se do leite-de-levedura resultante, contendo aproximadamente 60% de células, cerca de 15% para a produção da proteína microbiana. GERMEK (1986) descreveu que para a produção da proteína desvia-se cerca de 10% do leite-de-levedura, o qual será diluído, centrifugado e concentrado até aproximadamente 15% de matéria seca. A seguir é enviado a um tanque onde recircula até atingir uma temperatura de 80°C mediante aquecimento em aquecedor de película, numa fase denomi

nada termólise, para então ser enviado ao sistema secador obtendo um concentrado proteico de matéria seca a 92% (Figura 2). O mesmo autor apresenta níveis de sangria discordantes (10 e 15%), o que evidencia certa falta de precisão nos dados.

Sem apresentar maiores detalhes, MALIK (1980) citou que delevurar cerca de 35 a 40% do vinho antes da destilação é adequado para satisfazer o requerimento da reciclagem de levedura numa destilaria e que a recuperação do subproduto poderá melhorar o balanço de energia.

A recuperação possível de levedura, de acordo com DESMONTS (1966), deve variar proporcionalmente à CCE, que depende por sua vez das condições do meio de cultura, ora mais apto, ora menos apto, conforme as destilarias permitirem um número de Brown mais elevado.

A taxa de crescimento da levedura durante a fermentação é controlada por muitos fatores dos quais os mais importantes são: aeração, temperatura, concentração do substrato, concentração inicial de células, linhagem usada e pH (WHITE & MUNNS, 1951; HARRISON, 1971). A cultura aumenta com o aumento de aeração, temperatura de fermentação e concentração do mosto (GILLILAND, 1981).

A cinética de crescimento da levedura alcoólica, frequentemente descrita na literatura sem nenhuma referência à quantidade de inóculo inicial ou o estudo da fermentação alcoólica usando diferentes níveis de células, podem produzir diferentes resultados experimentais segundo STREHAIA

FIGURA 2. Processo de secagem da levedura para ração animal (GERNEK, 1986).

NO et alii (1983), o que evidencia a importância da concentração inicial de células. Uma fermentação com 0,05% de células (v/v) ou 1% (v/v) foi conduzida com longa fase exponencial, enquanto que partindo de 60% (v/v) nunca obteve tal fase (NAGOWITHANA & STEINKRAUS, 1976). STREHAIANO et alii (1983) estudaram o efeito do nível de inoculação (2, 10, 20 e 60% (v/v)) em fermentação em batelada usando glucose como substrato e concluíram que a taxa de crescimento e a produção de biomassa decresceram com o aumento da quantidade de inóculo. Um aumento de 8,5 vezes na quantidade de inóculo diminuiu de 10 a 11,3 vezes o acúmulo de biomassa e de 2,35 vezes o teor de álcoois superiores (13,25 mg/100 ml para 5,65 mg/100 ml) (GRACHEVA & GAVRILOVA, 1972). De acordo com GRACHYOVA & NISMAN (1972) um aumento de 0,0280 para 5,1084 g/100 ml de inóculo de *Saccharomyces carlsbergensis* fermentando mosto de cerveja, reduziu a taxa de formação de biomassa de mais de 400 vezes. Em condições semelhantes HOUGH (1962) mostrou que o uso de concentrações de levedura acima das convencionais diminuiu a taxa de crescimento também para *Saccharomyces cerevisiae* aumentando a disponibilidade de carboidrato para a fermentação.

Numerosas linhagens de levedura foram testadas em laboratório de fermentação de cervejaria sob condições controladas por um período de nove meses, por GILLILAND (1962). A massa total de levedura produzida variou de 5 g/l a 22 g/l. (como levedura prensada à 75% de umidade) em função das diferentes linhagens. As diferenças diminuíram quando a fermenta

ções foram aeradas mais intensivamente e praticamente desapareceram quando realizadas em agitador.

A influência da concentração do mosto foi estudada por GILLILAND (1981): um mosto de cervejaria de densidade igual a 1,040 produziu até 17 g/l, enquanto que em condições similares, um mosto de densidade 1,070 produziu até 28 g/l (como levedura prensada).

O crescimento celular acarreta por sua vez outras consequências. Segundo OURA (1977), o crescimento de células está relacionado com a formação de glicerol. É possível, segundo o mesmo autor, avaliar as variações no balanço redox durante o crescimento pelo acompanhamento do processo biossintético de todos os componentes celulares. Com esse tipo de comparação tem sido demonstrado que a formação de 100 g de material celular (peso seco) está associado à formação de 1,3-1,5 moles de NADH_2 em excesso. Esse excesso de NADH_2 é contrabalanceado pela formação de uma quantidade equivalente de glicerol. A formação de ácido succínico está por sua vez associada à produção de glicerol. Também a síntese de álcoois superiores é proporcional ao acúmulo de biomassa, de acordo com GRACHYOVA & NISMAN (1972). Embora de difícil quantificação face ao grande número de fatores envolvidos, parte da levedura recirculada tem sido desviada, processada e comercializada como componente de rações animais por algumas usinas e destilarias conforme evidenciou o artigo "Em dez anos o Proálcool conquistou seu lugar na economia" (1985). Se esta prática tornar-se economicamente viável no futuro, mesmo exigin-

do a substituição de uma parcela da produção de álcool, será altamente valiosa a sua utilização para alimentar os animais, uma vez que o período de safra e os meses de seca de inverno são coincidentes.

O Brasil atualmente está com uma capacidade nominal de produção de 14 bilhões de litros de álcool, de acordo com análise do Proálcool em "Os dez anos de Proálcool" (1985). Considerando a obtenção de 2,0 kg (DESMONTS, 1966) a 4,0 kg (PINNOTI, 1984) de levedura seca por 100 l de álcool produzidos à 100%, o potencial de produção será de 280.000 a 560.000 toneladas de biomassa de *S. cerevisiae* por ano.

De acordo com DESMONTS (1966) os valores comerciais do álcool e da levedura seca deverão regular a escolha entre uma maior recuperação de levedura às custas do álcool ou vice-versa.

Considerando todos os parâmetros envolvidos, uma possível sangria de levedura em escala industrial dependerá do processo de fermentação (contínuo ou descontínuo), das condições da fermentação e do desempenho das centrífugas de cada destilaria, não parecendo ser possível uma generalização do nível de levedura a ser retirado pelas mesmas.

2.2. A LEVEDURA DE DESTILARIA DE ÁLCOOL DE CANA-DE-AÇÚCAR (*S. cerevisiae*) E SEU USO COMO RAÇÃO ANIMAL

As fontes de proteína para alimento animal podem ser chamadas de convencionais e não convencionais. As pri

meiras dizem respeito aos produtos conhecidos e utilizados como fonte de proteína como farelo de trigo, soja, algodão, amendoim, etc. As não convencionais referem-se às fontes pouco conhecidas como é o caso da "proteína unicelular".

A expressão "proteína unicelular" ou "Single Cell Protein" (SCP) é um termo usado para proteína bruta ou refinada, cuja origem é de organismos unicelulares ou multi-celulares. Esta expressão foi proposta em 1.966 pelo Instituto de Tecnologia de Massachusetts (M.I.T.) segundo SCRIMSHAW (1975). Entre nós também são utilizados os termos proteína microbiana (KIHLEBERG, 1972) e biomassa (MOURA & ZUCAS, 1980).

Entre os microrganismos utilizados para a produção de proteínas unicelulares, estão as algas, as bactérias, os fungos e as leveduras, as quais representam uma fonte potencial não só de proteínas, como de glicídeos, lipídeos, vitaminas e minerais. Destas classes de microrganismos, as leveduras, particularmente as do gênero *Candida* e *Saccharomyces* são as espécies mais estudadas por serem usadas há muito tempo em alimentos e rações (MARIATH & ZUCAS, 1983). As destilarias de álcool podem produzir, conforme DESMONTS (1966), ambos os gêneros de levedura: *Candida* (levedura de cultivo) cultivável sobre vinhaça em instalações anexas à destilaria e *Saccharomyces* (levedura de recuperação) constituindo-se em subproduto da fermentação alcoólica.

No processo de produção de álcool, as leveduras de recuperação podem ser obtidas de três diferentes maneiras: desvio do leite-de levedura (item 2.1), centrifugação da

vinhaça e aproveitamento do fundo de dornas (Figura 1).

O fundo de dornas, de acordo com AMORIM & MATTOS (1982), contém além da levedura, bagacilho, terra, areia, sais insolúveis e proteínas. A composição deste material depende de como a matéria prima (caldo e/ou melaço) foi processada. O uso de melaços e caldos não clarificados produz fundo de dorna mais impuro, tornando necessário filtrá-lo anteriormente à sua concentração e desidratação.

As leveduras obtidas através do desvio de uma parte do leite-de-levedura fornece um material mais puro e concentrado, sendo este ideal para a alimentação animal.

A utilização da levedura de destilaria na alimentação animal pode ser efetuada de duas maneiras: "in natura" e desidratada. Para AMORIM & MATTOS (1982), a utilização da levedura "in natura" depende de uma série de fatores, tais como, manuseio, transporte, armazenamento e tempo de conservação, restringindo o seu uso em áreas próximas à indústria.

A levedura empregada na alimentação animal deve ser tratada e inativada afim de evitar perturbações digestivas decorrentes de fermentações anormais no aparelho digestivo dos animais (JARDIM, 1976; BOUCOURT, 1980). Além disso, as leveduras vivas, quando no trato digestivo, apresentam a tendência de absorver as vitaminas do bolo alimentar podendo causar avitaminoses (DESMONTS, 1968; BHATTACHARJEE, 1970). A secagem ou desidratação da levedura facilita o seu manuseio, transporte, armazenamento por longos períodos, podendo ser utilizada em fábricas de ração (AMORIM & MATTOS, 1982).

O teor de umidade da levedura seca não deve exceder 7% segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos ou 12% segundo D'ARCE & MACHADO (1985).

2.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LEVEDURA

As variações na qualidade da levedura seca podem ser expressas como função da linhagem de levedura, substrato, processo empregado e tratamento recebido antes da secagem (HEYMANS, 1952; DESMONTS, 1966; HARRISON, 1971).

A Tabela 1 mostra os intervalos relativos às proporções dos elementos em leveduras comerciais, incluindo a de cerveja, panificação e levedura para alimento animal e humano; mostra também intervalos típicos para melaços, incluindo cana-de-açúcar e beterraba como matérias primas comuns (HARRISON, 1971). A composição de algumas leveduras de destilaria de cana-de-açúcar (*S. cerevisiae*) são mostradas na Tabela 2.

As leveduras têm sido consideradas como fontes ricas de proteínas (SUBRAHMANYAN et alii, 1955). O teor de proteína bruta (N x 6,25) é bastante variável (30-60%) com cerca de 80% de nitrogênio na forma de aminoácidos, 12% na forma de ácidos nucleicos e 8% na de amônia; cerca de 7% do nitrogênio total ocorre como aminoácidos livres e em quantidades menores em compostos tais como lecitina, glutatona, ácido adenílico, vitaminas, enzimas e coenzimas (PEPPLER, 1970).

TABELA 1. Composição elemental de leveduras comerciais e melaços (HARRISON, 1971).

Elemento	Leveduras (g/100g matéria seca)	Melaços (g/100g matéria seca)
C	45 - 77	39 - 41
H	6,0 - 6,5	6,3 - 6,8
O	31 - 32	47 - 50
N	7,5 - 9,0	0,1 - 2,8
K	0,9 - 3,5	0,8 - 5,2
P	1,1 - 2,0	0,01 - 0,9
S	0,3 - 0,5	0,15 - 0,2
Mg	0,15 - 0,5	0,007 - 0,75
Ca	0,04 - 0,9	0,018 - 1,2
Na	0,02 - 0,2	0,82 - 1,4
Zn	0,004 - 0,13	0,0006 - 0,013
Fe	0,003 - 0,1	0,01 - 0,021
Cu	0,002 - 0,012	0,0001 - 0,006
Mn	0,0004 - 0,0035	0,001 - 0,004
Co	0,0005	0,00004 - 0,0001
Mo	0,000005 - 0,000009	0,000009 - 0,000026
Cl	0,004 - 0,1	1 - 3
I	0,00005 - 0,0004	-
Pb	0,0001 - 0,0007	0,0006
As	0,00001	-
Si	-	0,028
Sr	-	0,005
B	-	0,0002 - 0,0004

TABELA 2. Composição química (%) aproximada de *S. cerevisiae* de destilaria de álcool.

	Material analisado				
	1	2	3	4	5
Matéria seca	90,70	89,42	88,01	100,00	94,70
Proteína bruta	30,77	28,04	29,00	36,44	51,20
Fibra bruta	0,13	0,26	0,53	1,18	-
Extrato não nitrogenado	48,89	-	51,38	43,31	-
Extrato etéreo	1,10	0,34	0,93	2,80	2,00
Cinzas	9,81	4,86	6,15	12,24	7,30

- 1 Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (MIYADA, 1978).
- 2 Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (PINNOTI, 1983).
- 3 Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (BERTO, 1985).
- 4 Levedura líquida de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (BERGAMASCHINE, 1985).
- 5 Levedura seca cultivada em substrato de melaço de cana-de-açúcar (COZZOLINO, 1982).

Quanto à composição em aminoácidos, as leveduras são ricas em lisina (usualmente deficiente em proteínas de cereais) e treonina (DESMONTS, 1966), porém são deficientes em aminoácidos sulfurados como metionina e cistina (KIHLEBERG, 1972; LIPINSKY & LITCHFIELD, 1974; VANANUVAT, 1977).

COZZOLINO (1982) trabalhando com concentrado proteico de *S. cerevisiae* cultivada em melaço determinou os aminoácidos limitantes desse concentrado. Em relação às proteínas do ovo foi observada uma limitação primária de sulfurados totais (metionina e cistina) seguida de triptofano e aromáticos totais (fenilalanina e tirosina).

A Tabela 3 mostra a composição em aminoácidos de *S. cerevisiae* de diversas destilarias em comparação com o farelo de soja.

Os carboidratos constituem de 26% a 36% da matéria seca (KIHLEBERG, 1972), sendo representados em média por 33% de trealose, 27% de glucanas e 21% de mananas (ambos polissacarídeos da parede celular da levedura, formados por moléculas de glucose e manose, respectivamente) e 12% de glicogênio (PEPPLER, 1970).

O teor de lipídeos pode chegar até 50% do peso seco para "fat yeasts" como *Rhodotorula gracilis*, porém não excede à 7% para levedura de cervejaria e panificação (EDDY, 1958). Os lipídeos são especialmente glicerídeos de ácidos graxos, fosfolipídeos (lecitina e cefalina) e esteróis (ergosterol) (GAMBIRÁSIO, 1967).

TABELA 3. Composição em aminoácidos (%) de *S. cerevisiae* em comparação com farelo de soja.

Aminoácidos (%)	Material analisado				
	1	2	3	4	5
* Arginina	0,98	5,00	3,69	2,66	3,06
Alanina	1,87	6,57	4,87	3,17	-
Ácido aspártico	3,06	-	8,30	5,40	-
Ácido glutâmico	4,08	-	10,69	10,14	-
Cistina	-	0,15	-	-	0,60
* Fenilalanina	1,06	3,81	3,49	1,99	2,04
Glicina	1,45	4,03	3,65	2,46	-
* Histidina	0,47	2,33	2,00	1,33	1,16
* Isoleucina	1,37	4,58	3,49	2,37	2,67
* Leucina	2,02	6,72	5,44	3,33	3,73
* Lisina	1,87	7,53	4,97	4,65	2,98
* Metionina	1,27	1,49	3,57	1,00	0,52
Prolina	0,90	3,31	3,39	1,87	-
Serina	0,94	5,52	4,24	2,43	-
Tirosina	0,87	3,62	1,50	1,62	0,87
Triptofano	-	0,51	-	0,53	0,84
* Treonina	1,57	5,21	4,22	2,45	1,99
* Valina	1,97	4,78	4,76	3,11	2,50
Proteína bruta (%)	30,77	32,00	36,44	51,20	46,00

* Aminoácidos essenciais

1 Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (MIYADA, 1978).

2 Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (PINNOTI, 1984)

3 Levedura líquida de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (BERGAMASCHI NE, 1985).

4 Levedura seca cultivada em substrato de melaço de cana-de-açúcar (COZZO LINO, 1982).

5 Farelo de soja (CAMPOS, 1981).

As cinzas representam de 1,9 a 10% do peso seco da levedura, dependendo da linhagem e do meio de fermentação (EDDY, 1958) sendo o fósforo e o potássio seus maiores componentes (Tabela 1). As leveduras constituem uma das maiores fontes de vitamina do complexo B, exceto das cianocobalaminas (vitamina B₁₂) (VANANUVAT, 1977). São ricas em ergosterol que por irradiação ultravioleta pode ser transformado em vitamina D₂ (HSU, 1961). A Tabela 4 mostra o intervalo de concentração de vitaminas, encontradas em várias leveduras (HARRISON, 1971).

TABELA 4. Concentração de vitaminas, encontrada em várias leveduras (HARRISON, 1971).

Vitaminas	µg/g matéria seca
Tiamina	20 - 165
Riboflavina	45 - 100
Niacina	330 - 585
Piridoxina	20 - 50
Folacina	.5 - 49
Pantotenato	40 - 120
Biotina	0,6 - 2,0
Ácido p-aminobenzóico	5 - 160
Inositol	3000 - 5000

Segundo JACQUOT (1943), as leveduras apresentam traços das vitaminas A e C.

2.2.2. VALOR NUTRITIVO DA LEVEDURA

O grande valor proteico e vitamínico da levedura e o papel que ela pode desempenhar na alimentação humana e animal tem recebido grande atenção dos pesquisadores nacionais e internacionais.

Embora seu valor nutritivo varie com o substrato e condições de propagação, foi verificada boa digestibilidade da proteína de levedura, com uma variação de 75 a 95% (KIHLEBERG, 1972; WASLIEN, 1975).

Em experimentos com carneiro, KELLNER (1910) verificou uma digestibilidade de 90,9% da proteína de levedura. COZZOLINO (1982), trabalhando com ratos, determinou os seguintes valores para proteína de *S. cerevisiae* e caseína respectivamente: digestibilidade do nitrogênio, 80 e 90%; valor biológico, 79% e 84%. O valor biológico da proteína da levedura foi elevado de 57% para 90% quando suplementada com metionina (SHACKLADY et alii, 1973; SALES et alii, 1977).

A levedura seca, obtida por desvio de parte do leite-de-levedura, foi avaliada mediante estudos com vaca em lactação e manutenção por D'ARCE & MACHADO (1985). Os níveis de produção não apresentaram diferenças significativas, ocorrendo no entanto, aumento significativo no teor de pro-

teína do leite dos animais que receberam levedura como fonte suplementar de proteína.

BRAUDE (1942), observou que o fornecimento de levedura líquida para vacas em lactação (11 a 17 kg/cabeça / dia) aumentou a produção de leite e o teor de gordura em relação aos animais controle que receberam semente de colza. Para STYCZŃSKI (1966) e TOMLINSON et alii (1977) o emprego de levedura no estado líquido não aumentou a produção e o teor de gordura do leite.

BOWMAN & VEUM (1973) verificaram que a suplementação de dietas com 1,5 ou 2,0% de *S. cerevisiae* não afetou significativamente as características da carcaça de suínos em recria, crescimento e acabamento.

O uso de levedura seca (*S. cerevisiae*) na ração, nos níveis de 0, 7, 14 e 21% não influenciou o ganho diário de peso dos suínos em nenhuma das fases estudadas (crescimento, acabamento e crescimento-acabamento) porém, melhorou a qualidade da carcaça com o aumento dos níveis de levedura na ração (MIYADA, 1978). Utilizando os mesmos níveis de levedura seca, LIMA (1983), verificou aumento linear no peso dos animais aos 21 dias e à desmama com o aumento do teor de levedura na dieta, provavelmente devido à maior ingestão de vitaminas do complexo B.

De acordo com BERTO (1985), o uso de até 45% de proteína de levedura seca de destilaria de álcool em substituição à proteína do farelo de soja e milho nas rações de leitões em recria, é tecnicamente possível e está na depen-

dência da disponibilidade e custo do produto no mercado.

A levedura pode servir de alimento também para aves e peixes (TUSE, 1984). O crescimento de frangos submetidos à dieta contendo de 15 a 20% de levedura foi semelhante ao obtido com dieta de farelo de soja, porém foi levemente retardado relativamente ao crescimento obtido com dieta composta de farinha de peixe e parte de farinha de soja (VANANUVAT, 1977).

2.2.3. EFEITO TÓXICO DA LEVEDURA

Em ensaio biológico com ratos, alimentados com levedura seca de fundo de dorna, MATTOS et alii (1983) não constatarem alterações no fígado, rins, baço e intestinos dos animais submetidos à necropsia e observações anátomo-histopatológicas. Também não apresentaram problemas de ordem toxicológicas, ratos alimentados por várias gerações com levedura (*S. cerevisiae*) cultivada em melaço (COZZOLINO, 1982).

PEIXOTO & MATTOS (1972) substituíram 0, 1, 2, 4 e 8% da ração comercial de marrecos de um dia por lodo residual das dornas de fermentação não encontrando sintomas de intoxicação no coração, pulmões, fígado e intestino, quatro semanas após aplicação dos tratamentos.

O uso de níveis crescentes de levedura seca de destilaria de álcool (até 21%) em rações para porcas em gestação e lactação resultou numa variação inconstante nos ní-

veis plasmáticos de ácido úrico indicando que, ou as purinas não foram absorvidas, ou em caso positivo foram metabolizadas a outro produto, não havendo acúmulo de ácido úrico no sangue (MENTEN et alii, 1984).

Do exposto pode-se verificar que o uso da levedura como suplemento de rações para animais não apresentou problemas de natureza toxicológica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LEVEDURAS UTILIZADAS

Nos experimentos de fermentação alcoólica foram usadas as seguintes leveduras: prensada tipo Fleischmann obtida no comércio, Fleischmann multiplicada em laboratório e a linhagem M-300-A também multiplicada em laboratório.

A levedura tipo Fleischmann (*S. cerevisiae*), também conhecida como levedura de panificação, vem sendo bastante empregada nas destilarias de álcool brasileiras.

A linhagem M-300-A (levedura híbrida, IZ-671 x IZ-672, ambas *S. cerevisiae*) é uma levedura selecionada para alto teor de álcool e altas temperaturas (TAVARES, 1981). Também conhecida como TA-79 e Valusepe Zanitas, esta linhagem foi obtida no Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

3.2. MULTIPLICAÇÃO DAS LEVEDURAS

3.2.1. MOSTOS UTILIZADOS

Os mostos utilizados foram preparados a partir de xarope proveniente da Usina Barra Grande de Lençóis Pau-

lista, SP. O xarope foi diluído às concentrações de 2% e 4% de ART (g/100 ml), pH corrigido à 4,0 com ácido sulfúrico. Estes mostos foram esterilizados em autoclave a 120°C, 1,0 atmosfera de pressão durante 20 minutos.

Os teores de nutrientes minerais contidos no xarope e nos mostos 2% e 4% encontram-se nas Tabelas 5 e 6 respectivamente.

TABELA 5. Teores de nutrientes minerais no xarope.

Elementos	Xarope (ppm)
N	1250
P	69
K	6885
Ca	1188
Mg	669
Zn	1,5

Brix: 69,80%; ART : 62,70%; Sulfito: 421 ppm

3.2.2. DETERMINAÇÃO DO °BRIX NO XAROPE

As determinações de °Brix, (g/100 ml), foram feitas pela transformação da densidade, medida em densímetro digital Anton-Paar mod. DMA-46, em °Brix conforme AMORIM et alii (1982).

TABELA 6. Teores de nutrientes minerais nos mostos de xarope.

Elementos	Mosto 2% (ppm)	Mosto 4% (ppm)
N	40	80
P	2,3	4,6
K	222	443
Ca	38,4	67
Mg	21,3	42,8
Zn	0,047	0,095

3.2.3. DETERMINAÇÃO DE ART NO XAROPE E NOS MOSTOS

As concentrações (g/100 ml), de açúcares redutores totais (ART) no meio foram determinadas pelo método de Somogyi e Nelson adaptado por AMORIM et alii (1982).

3.2.4. DETERMINAÇÃO DE SULFITO NO XAROPE

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

* BASSO, L.C. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP). Comunicação pessoal, 1986.

3.2.5. DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS MINERAIS NO XAROPE E NOS MOSTOS

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

O fósforo foi analisado segundo CATANI & JACINTHO (1974) após digestão nitroperclórica das amostras.

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

3.2.6. SUPLEMENTAÇÃO DE SAIS NOS MOSTOS

Considerando o nível ótimo de nutrientes para multiplicação da levedura aquele estabelecido por ZAGO (1982), após esterilizados, os mostos receberam as seguintes suplementações:

- 400 ppm de N na forma de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- 85 ppm de P na forma de fosfato monobásico de potássio, KH_2PO_4 ;
- 120 ppm de Mg na forma de sulfato de magnésio, MgSO_4 ;
- 3 ppm de Zn na forma de sulfato de zinco heptahidratado, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.2.7. DETERMINAÇÃO DO pH NOS MOSTOS

O pH foi medido em pHmetro digital modelo 601, da Orion Research.

3.2.8. CONDUÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO

A multiplicação foi realizada em erlenmeyers de 6 litros, mantidos parcialmente imersos em banho-maria a 32°C. O sistema de arejamento foi o descrito por ZAGO (1982).

A primeira etapa constitui-se na transferência da levedura contida em dois tubos de cultura (M-300-A) ou 0,20 g de levedura prensada (Fleischmann) para erlenmeyers contendo 300 ml de mosto corrigido e esterilizado. Após 8 horas de multiplicação adicionou-se 600 ml de mosto a 4% de ART. A partir daí, volumes de mosto a 4% foram adicionados a cada 3 horas, mantendo o meio de multiplicação numa concentração de aproximadamente 2% de ART, até atingir a massa celular desejada.

O desenvolvimento da multiplicação foi acompanhado periodicamente através de determinações de viabilidade celular e contaminação bacteriana por contagem ao microscópio, conforme AMORIM et alii (1986).

3.3. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA COM SANGRIA DE CÉLULAS DE LEVEDURA

3.3.1. CARACTERIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Cada experimento ~~constituía-se~~ de 2 blocos de 7 ciclos fermentativos consecutivos (Tabelas 36 a 45 - Apêndice).

Os tratamentos aplicados aos experimentos consistiram em retirar diferentes porcentagens de células em volume, ciclo a ciclo (sangria), conforme descrito a seguir.

O Experimento 1, caracterizado na Tabela 7, foi realizado com o objetivo de comparar a influência do meio de multiplicação nas características fermentativas da levedura tipo Fleischmann durante os 7 ciclos estudados, afim de tornar possível sua comparação com a levedura M-300-A, obrigatóriamente multiplicada em laboratório. Neste experimento comparou-se a levedura tipo Fleischmann prensada como obtida no comércio e Fleischmann multiplicada em laboratório conforme descrito no item 3.2.

Nos experimentos 2, 3, 4 e 5 foram realizadas sangrias de 5, 10, 15 e 20% (v/v) de células entre os ciclos. A levedura, o substrato e a temperatura usadas em cada experimento encontram-se na Tabela 7.

TABELA 7. Caracterização dos experimentos de fermentação alcoólica realizadas com sangria de células (v/v) de levedura.

Experimento	Levedura (<i>S. cerevisiae</i>)	Substrato	Temperatura (°C)
1	Fleischmann prensada Fleischmann multiplicada	Mosto xarope	30
2	Fleischmann prensada	Mosto xarope	30
3	Fleischmann prensada	Mosto xarope	33
4	Fleischmann prensada	Mosto melaço	33
5	M-300-A	Mosto xarope	33

3.3.2. MOSTOS UTILIZADOS

Os mostos de xarope foram preparados a partir do xarope usado para a multiplicação de leveduras (item 3.2.1) cujas características encontram-se na Tabela 5.

Os mostos de melaço foram preparados a partir de melaço proveniente da Usina Santa Elisa S.A., Sertãozinho-SP. Os teores de nutrientes minerais contidos no melaço, encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8. Teores de nutrientes minerais no melaço.

Elementos	Melaço (ppm)
N	2910
P	443
K	19890
Ca	1918
Mg	2320
Zn	5,1

Brix: 86,20%; ART: 66,80%; Sulfito: 52 ppm

O xarope e o melaço foram diluídos às concentrações de 15,00 a 15,50% de ART e os pH corrigidos a aproximadamente 3,50 (Tabelas 36 a 45 - Apêndice). Estes mostos foram esterilizados durante 20 minutos em autoclave a 120°C e 1,0 atmosfera de pressão.

Devido ao grande volume de mosto necessário para todo o projeto, os mostos foram preparados para cada experimento e armazenados em congelador vertical. Os mostos, entretanto, foram originados da mesma matéria prima, ou seja, do mesmo xarope e melaço.

3.3.3. ANÁLISES DO MELAÇO E MOSTOS DE XAROPE E DE MELAÇO

As determinações de °Brix, ART, sulfito e pH

no melaço e mostos (xarope e melaço) e as análises de nutrientes minerais no melaço foram realizadas como em 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 e 3.2.7, respectivamente.

3.3.4. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS (FERMENTADORES)

As fermentações foram conduzidas em tubos graduados de vidro, de 45 mm de diâmetro por 170 mm de comprimento, com tampas de borracha perfuradas onde foram inseridos tubos de vidro para a passagem dos gases.

A temperatura foi mantida constante ($\pm 0,2^{\circ}\text{C}$) por banho-maria termostatizado, modelo MW-1120A-1, Blue-M.

O álcool arrastado pelo gás carbônico desprendido da fermentação foi recuperado pelo borbulhamento em erlenmeyers contendo 70 ml de água destilada e determinado posteriormente.

3.3.5. CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

De uma suspensão de células de levedura de concentração conhecida, determinada pela medida do volume ocupado pelas células (MALLETE, 1969), foram pipetados volumes correspondentes a 10 ml de células de levedura e transferidos para os tubos de fermentação (10 tubos). Esta suspensão foi centrifugada a 1900 rpm (686 x g) em centrífuga modelo PR-2, IEC, durante 20 minutos, desprezando-se a água sobrenadante. Em seguida o volume de células remanescente (10 ml) foi com-

pletado até cerca de 19 ml com água destilada esterilizada com a finalidade de manter o volume de inóculo sempre constante em todos os tubos, independentemente do nível de sangria a que foi submetido no decorrer dos ciclos fermentativos. Em cada tubo, contendo cerca de 19 ml de suspensão de células, foram adicionados 20 ml de mosto, homogeneizados e colocados para fermentar em banho-maria a 30 ou 33°C conforme o experimento (Tabela 7). Após 2 horas de fermentação foram acrescentados mais 20 ml de mosto, repetindo-se o procedimento outras duas vezes em intervalos de 2 horas, totalizando 80 ml de mosto a ser fermentado.

Terminada a fermentação, caracterizada pela paralisação visual da liberação de gás carbônico, o volume final foi medido, e completado à 100 ml com água destilada esterilizada. Deste meio de fermentação foram pipetados 0,7 ml para as determinações do número de células de levedura, carga bacteriana, viabilidade e brotamento celulares. O material restante foi centrifugado a 1900 rpm (686 x g) durante 20 minutos resultando na separação das células do vinho.

No vinho delevurado foram determinados: teor alcoólico, pH e o teor de açúcares residuais (AR).

As células foram lavadas por ressuspensão em um volume de água ácida a pH 2,5 (acidulada com ácido sulfúrico concentrado) até cerca de 80 ml, centrifugadas e desprezado o sobrenadante. Novamente as células foram ressuspensas em água ácida até um volume final (células + água) de 100 ml. Desta suspensão foram removidos, com pipeta volumétrica, 5,

10, 15 ou 20% (v/v) de células e mais 1 ml para determinação da matéria seca presente no tubo de fermentação. A suspensão remanescente no tubo foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. O material celular foi novamente completado à aproximadamente 19 ml com água e recebeu 4 alíquotas de 20 ml de mosto em intervalos de 2 horas, iniciando desta maneira um no vo ciclo fermentativo. O mesmo procedimento foi repetido durante os 7 ciclos fermentativos.

3.3.6. TEMPO DE FERMENTAÇÃO

Para facilidade dos trabalhos em laboratório, as fermentações foram conduzidas por um tempo mínimo de 20 horas (Tabelas 36 a 45 - Apêndice).

3.3.7. PORCENTAGENS DE CÉLULA, EM VOLUME, REMOVIDAS ENTRE OS CICLOS FERMENTATIVOS (SANGRIAS)

Conforme descrito em 3.3.5, após a lavagem das células, estas foram ressuspensas em meio aquoso até 100 ml, homogeneizadas, e deste volume pipetados 5, 10, 15 ou 20 ml equivalentes a 5%, 10%, 15% ou 20% (v/v) de células. A valida de desse método, usado para quantificar a sangria de células, foi investigada através do seguinte experimento: mostos de melaço, melaço clarificado por aquecimento durante 20 minutos e xarope, com 15,0% de ART, foram fermentados com levedura tipo Fleischmann à aproximadamente 10% (v/v). Terminada a

fermentação, 10 ml da suspensão (vinho + células) foi centrifugada a 2500 rpm (734 x g) durante 15 minutos, em centrífuga Berse, modelo 208N. As células foram lavadas por ressuspensão em água e o seu peso seco determinado após secagem em estufa a $80^{\circ}\text{C} \pm 0,05$ até peso constante. Do mesmo meio de fermentação foram pipetados outros 10 ml, as células lavadas por ressuspensão, centrifugadas novamente ressuspensas em água até 10 ml. Desta suspensão de células perfeitamente homogeneizada foram pipetados, 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 ml e determinado o peso seco da massa celular correspondente.

Os resultados obtidos, quando a fermentação foi conduzida em mosto de xarope, mostraram uma boa correspondência entre as porcentagens de célula, em volume, removidas e o teor de matéria seca esperado (Figura 3). Porém, em melaço, principalmente o não clarificado, os desvios foram maiores, por tratar-se de uma matéria prima que contém, além da levedura, maior teor de sólidos solúveis que provavelmente interferiram nas medidas.

3.3.8. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE MATÉRIA SECA

A determinação do teor de matéria seca presente no tubo de fermentação após cada ciclo foi feita pela medida da turbidez da suspensão aquosa do microrganismo em colôrimetro Klett-Summerson usando filtro vermelho nº 66 e relacionando-a com o peso da massa celular conforme procedimento analítico descrito por PELCZAR et alii (1981). Apesar das

FIGURA 3. Relação entre matéria seca (g) e porcentagem de células (v/v) para levedura tipo Fleischmann suspensa em água.

limitações do método, particularmente devido a presença de par tículas que não leveduras, o método foi escolhido por poder ser realizado com pequenos volumes de suspensão, condição esta necessária à testemunha.

3.3.9. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS

Uma amostra da suspensão de células a ser analisada foi diluída com volumes de corante (azul de metileno e citrato de sódio) de modo a ajustar a concentração de células para 40 a 60 células por campo do microscópio, conforme PIERCE (1970). Em uma lâmina de vidro (26 x 76 mm) foram colocados 2 microlitros de amostra, previamente diluída e homogeneizada e em seguida colocada uma lamínula sobre este material de modo a não formar bolhas. Com a lâmina assim preparada procedeu-se a observação ao microscópio com a objetiva de imersão nº 100, contando-se 50 campos por lâmina. Na determinação do número total de células foram relacionados o número de células vivas e em brotamento, para cálculos posteriores de viabilidade e brotamento celulares.

O número de células foi calculado através da seguinte equação:

$$\frac{\text{células}}{\text{mililitro}} = \text{Fator do microscópio} \times \frac{1}{\text{volume da amostra}} \times \frac{\text{células totais}}{\text{nº de campos}} \times \text{fator de diluição}$$

3.3.10. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E BROTAMENTO CELULARES

A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao número total de células, conforme descrito em 3.3.9.

O brotamento celular foi calculado em relação ao número de células vivas.

3.3.11. DETERMINAÇÃO DA CARGA BACTERIANA

O número de bactérias (bastonetes/ml) do meio de fermentação foi determinado pela coloração das células com azul de metileno e sulfato azul de Nilo, cujo procedimento analítico foi descrito por AMORIM et alii (1982).

3.3.12. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO NO VINHO

O vinho delevurado foi destilado em microdestilador Kjeldahl adaptado para álcool e a densidade da mistura hidroalcoólica foi medida em densímetro digital Anton-Paar modelo DMA-46, segundo AMORIM et alii (1982).

3.3.13. DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO NA ÁGUA DE RECUPERAÇÃO DO ÁLCOOL ARRASTADO PELO GÁS CARBÔNICO

Uma alíquota de 50 ml da amostra foi destilada

em microdestilador Kjeldahl até o volume de destilado atingir 10 ml. A densidade da mistura hidroalcoólica foi medida como descrita no item 3.3.12.

3.3.14. DETERMINAÇÃO DO pH NO VINHO

A determinação do pH no vinho delevurado foi feita de acordo com técnica descrita em 3.2.7.

3.3.15. DETERMINAÇÃO DE AR NO VINHO

As análises de açúcares redutores residuais (AR) foram realizadas pelo método de Somogyi e Nelson adaptado por AMORIM et alii (1982).

3.3.16. DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO

Determinados os parâmetros, teor de ART do mosto, teor alcoólico do vinho, teor alcoólico da água de recuperação do álcool arrastado pelo gás carbônico e considerado o rendimento teórico (100 kg de ART produzem no máximo 64,75 l de álcool, 100% puro a 20°C), foram calculados os rendimentos das fermentações em função dos tratamentos (diferentes níveis de sangria).

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada segundo modelo matemático para o delineamento em parcelas subdivididas ("split-plot") em blocos casualizados descrito por GOMES (1985).

O esquema de análise de variância adotado para os experimentos estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

TABELA 9. Esquema de análise de variância para o delineamento em parcelas subdivididas em blocos casualizados (Experimento 1).

Causas de variação	G.L.
Blocos	1
Tratamentos	3
Resíduo (a)	11
Parcelas	15
Ciclos fermentativos	6
Interação Tratamentos x Ciclos	18
Resíduo (b)	72
Sub-parcelas (total)	111

TABELA 10. Esquema de análise de variância para o delineamento em parcelas subdivididas em blocos casualizados (Experimentos 2, 3, 4 e 5).

Causas de variação	G.L.
Blocos	1
Tratamentos	4
Resíduo (a)	14
Parcelas	19
Ciclos fermentativos	6
Interação Tratamentos x Ciclos	24
Resíduo (b)	90
Sub-parcelas (total)	139

Quando a interação Tratamentos x Ciclos foi estatisticamente significativa, procedeu-se o desdobramento dos fatores, sendo que para comparações de ciclos dentro de tratamentos usou-se o quadrado médio e o número de graus de liberdade do resíduo (b).

Para comparações de tratamentos dentro de ciclos foram utilizados os seguintes parâmetros:

$$QMRb' = \frac{QMR(a) + (K-1) \times QMR(b)}{K}$$

onde K é o número de tratamentos secundários.

O número de graus de liberdade (n) apropriado para esse resíduo foi obtido pela fórmula de SATTERTHWAITTE de acordo com GOMES (1985).

$$n = \frac{[\text{QMR}(a) + (K-1) \times \text{QMR}(b)]^2}{\frac{[\text{QMR}(a)]^2}{n_a} + \frac{(K-1)^2 \times [\text{QMR}(b)]^2}{n_b}}$$

onde n_a e n_b indicam os números de graus de liberdade dos resíduos a e b respectivamente.

As regressões foram avaliadas pelo coeficiente de determinação R^2 escolhendo-se o de maior grau de significância, tendo como limite o 3º grau.

Usou-se o teste F para as análises estatísticas e o teste de Tukey para as comparações entre as médias dos tratamentos, segundo GOMES (1985).

A análise dos dados e a confecção dos gráficos foram realizadas em microcomputador MICROTEC XT 2002 pertencente à FERMENTEC Ltda. Assessoria em Fermentação Alcoólica, Piracicaba, SP.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. COMPARAÇÃO DO EFEITO DA SANGRIA DE LEVEDURA SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, DURANTE 7 CICLOS, CONDUZIDA COM AS LEVEDURAS TIPO FLEISCHMANN PRENSADA E TIPO FLEISCHMANN MULTIPLICADA, EM MOSTO DE XAROPE A 30°C. (EXPERIMENTO 1).

4.1.1. VIABILIDADE CELULAR

As porcentagens de viabilidade celular em cada ciclo fermentativo encontram-se nas Tabelas 36 e 37 (Apêndice).

A análise de variância (Tabela 46 - Apêndice) mostrou que a interação "Tratamentos x Ciclos" foi significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, indicando uma influência significativa dos ciclos sobre os tratamentos o que determinou a comparação da viabilidade ciclo a ciclo. As médias apresentadas na Tabela 11, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, evidenciaram que a viabilidade celular da testemunha não diferiu significativamente da sangria de 20% (v/v) tanto para a levedura prensada

TABELA 11. Comparações das médias de viabilidade celular (%) das leveduras tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)			
	Levedura prensada		Levedura multiplicada	
	Test.	20%	Test.	20%
1	96,72 A a	96,31 A a	75,59 B a	76,45 B a
2	95,56 A a	94,03 A ab	69,89 B ab	70,42 B a
3	90,47 A ab	90,67 A ab	63,63 B bc	61,57 B b
4	87,26 A bc	88,83 A b	57,54 B c	56,65 B b
5	81,00 A c	81,45 A c	48,57 B d	47,68 B c
6	68,79 A d	64,38 A d	41,24 B e	39,43 B d
7	61,00 A e	59,00 A d	37,25 B e	39,80 B d
Média geral	82,97	82,09	56,24	56,00

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 6,54

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 6,86

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

como para a multiplicada durante os 7 ciclos fermentativos. As diferenças de viabilidade celular entre a levedura prensada e a levedura multiplicada deveram-se principalmente à diferença da viabilidade média dos inóculos utilizados na primeira fermentação, respectivamente, iguais a 97,61% e 80,51%.

A viabilidade decresceu, ciclo a ciclo, para ambas as leveduras. Para a testemunha prensada o decréscimo foi significativo a partir do ciclo 3 e para a testemunha multiplicada a partir do ciclo 2. Com 20% (v/v) de sangria a queda na viabilidade tornou-se estatisticamente significativa também a partir do ciclo 3 para a levedura prensada e a partir do ciclo 2 para a levedura multiplicada.

4.1.2. BROTAMENTO CELULAR

O brotamento celular (%) determinado em cada ciclo encontra-se nas Tabelas 36 e 37 (Apêndice). Os dados experimentais de brotamento foram transformados para $\arcsin \sqrt{y/100}$ afim de normalizá-los. A análise de variância desses dados mostrou que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F (Tabela 47 - Apêndice) o que indicou um comportamento semelhante, ciclo a ciclo, para todos os

tratamentos. Em razão disto, foram comparadas, mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, somente as médias gerais dos tratamentos (Tabela 12). Para maior clareza, os dados apresentados na Tabela 12 referem-se aos experimentais.

Segundo as médias dos tratamentos, a aplicação de 20% (v/v) de sangria não causou efeito estatisticamente significativo no brotamento celular de ambas as leveduras. Verificou-se que o brotamento celular da levedura multiplicada em laboratório foi significativamente maior que o da levedura prensada. A levedura multiplicada mostrou um brotamento maior que 20% já no ciclo 1, enquanto que a levedura prensada somente brotou significativamente nos ciclos 6 e 7. Considerando que a levedura prensada é mais rica em reservas, uma vez que foi produzida para resistir a certo período de armazenamento, e que encontrava-se com uma viabilidade celular alta, somente aumentou significativamente o seu brotamento quando diminuiu significativamente o seu número de células em atividade.

Por outro lado, a levedura multiplicada já adaptada ao meio e com menor viabilidade desde o ciclo 1 e menor população em atividade, apresentou um brotamento mais elevado.

4.1.3. NÚMERO DE CÉLULAS

Nas Tabelas 36 e 37 (Apêndice) encontram-se o

TABELA 12. Comparação das médias de brotamento celular (%) das leveduras tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)			
	Levedura prensada		Levedura multiplicada	
	Test.	20%	Test.	20%
1	0,65	0,69	25,02	23,41
2	0,55	0,58	26,48	28,97
3	0,66	0,93	30,01	32,28
4	0,76	1,14	32,12	33,78
5	0,78	1,33	33,11	31,97
6	1,27	1,55	43,69	42,04
7	2,07	17,64	46,01	39,33
Média geral	0,96 B	3,41 B	33,78 A	33,11 A
DMS 5% para média dos tratamentos como $\arcsen \sqrt{y/100}$: 0,04				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

número de células (células/mililitro) determinado em cada ciclo.

A análise de variância desses dados mostrou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 48 - Apêndice) indicando que o comportamento dos tratamentos foi significativamente influenciado pelos ciclos. Em razão disto, o número de células foi comparado ciclo a ciclo, mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 13).

As comparações das médias demonstrou que a aplicação de 20% (v/v) de sangria tornou menor o número de células em todos os ciclos para ambas as leveduras.

Comparando-se a sangria de 20%(v/v) para as duas leveduras, observou-se que, embora a levedura multiplicada tenha partido de um número de células menor, este tornou-se estatisticamente igual ao da levedura prensada a partir do ciclo 4 evidenciando a maior multiplicação das células da levedura multiplicada em laboratório.

O número de células das duas leveduras diminuiu com os ciclos em todos os tratamentos. Este decréscimo foi estatisticamente significativo a partir do ciclo 5 para a testemunha prensada e a partir do ciclo 3 para a testemunha multiplicada. Com a aplicação de 20% (v/v) de sangria o decréscimo no número de células/ml foi significativo a partir do ciclo 2 para ambas as leveduras.

TABELA 13. Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) das leveduras tipo Fleisch - mann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)			
	Levedura prensada		Levedura multiplicada	
	Test.	20%	Test.	20%
1	1,573 A a	1,310 C a	1,552 B a	1,290 D a
2	1,570 A ab	1,307 C a	1,548 B ab	1,285 D a
3	1,568 A abc	1,040 C b	1,545 B ab	1,025 C b
4	1,563 A abc	1,035 C b	1,537 B bc	1,017 D b
5	1,565 A abc	0,771 C c	1,530 B cd	0,761 C c
6	1,560 A bc	0,766 C c	1,523 B de	0,754 C c
7	1,558 A c	0,508 C d	1,515 B e	0,503 C d
Média geral	1,565	0,962	1,536	0,948

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,017

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,011

Letras maiúsculas determinam comparações de Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações de Ciclos dentro de Tratamentos

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

4.1.4. MATÉRIA SECA

A quantidade de matéria seca (g/100 ml) presente no tubo de fermentação após cada ciclo fermentativo, encontra-se nas Tabelas 36 e 37 (Apêndice).

A influência dos ciclos sobre os tratamentos foi demonstrada pela análise de variância (Tabela 49 - Apêndice) onde a interação "Tratamentos x Ciclos" foi significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Desse modo, o teor de matéria seca foi comparado ciclo a ciclo através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

As médias comparadas, mostradas na Tabela 14, evidenciaram que a sangria de 20% (v/v) provocou uma queda estatisticamente significativa no teor de matéria seca de ambas as leveduras durante os 7 ciclos fermentativos.

Os teores de matéria seca sob sangria de 20% (v/v) da levedura prensada e da levedura multiplicada mantiveram-se estatisticamente iguais entre si em todos os ciclos. Este resultado demonstrou maior poder de recuperação das células da levedura multiplicada, uma vez que esta apresentou menor teor de matéria seca no primeiro ciclo.

O teor de matéria seca de ambas as testemunhas aumentou ciclo a ciclo. Estatisticamente, estes acréscimos foram significativos a partir do ciclo 3 para as testemunhas prensada e multiplicada. A retirada de 20% (v/v) de células provocou uma diminuição no teor de matéria seca, estatística-

TABELA 14. Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para levedura tipo Fleischmann prensada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)			
	Levedura prensada		Levedura multiplicada	
	Test.	20%	Test.	20%
1	4,0084 A c	2,9596 C a	3,4840 B d	2,7224 C a
2	4,0958 A bc	2,3728 C b	3,6089 B d	2,4602 C a
3	3,9460 A c	2,0232 B c	3,6713 A cd	1,9733 B b
4	4,3081 A ab	1,9233 C c	3,9085 B bc	1,8484 C bc
5	4,2956 A ab	1,5112 B d	4,1208 A ab	1,6736 B c
6	4,3830 A a	1,3989 B de	4,1833 A a	1,3864 B d
7	4,4080 A a	1,2366 B e	4,2082 A a	1,3239 B d
Média geral	4,2064	1,9179	3,8836	1,9126

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,2992

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,2643

Letras maiúsculas determinam comparações de Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações de Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

mente significativa a partir do ciclo 1 para a levedura prensada e do ciclo 2 para a levedura multiplicada.

4.1.5. RENDIMENTO DE FERMENTAÇÃO

Nas Tabelas 36 e 37 (Apêndice) encontram-se os teores alcoólicos do vinho e da água de recuperação do álcool, e os valores de rendimento (%) calculados a partir destes.

A análise de variância dos dados de rendimento (Tabela 50 - Apêndice) indicou que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F, o que determinou a comparação das médias gerais dos tratamentos (Tabela 15) mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 15, a aplicação de 20% (v/v) de sangria diminuiu significativamente o rendimento da fermentação de ambas as leveduras.

Os rendimentos obtidos com a testemunha prensada e com a testemunha multiplicada não diferiram estatisticamente entre si e foram respectivamente iguais a 92,16% e 91,45%. Os rendimentos resultantes da sangria de 20% (v/v) das leveduras prensada e multiplicada também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si e foram respectivamente iguais a 90,47% e 89,81%. O nível de contaminação (bastonetes/ml) não diferiu acentuadamente para ambas as leveduras. O teor de AR indicou um consumo quase to-

TABELA 15. Comparação das médias de rendimento de fermentação (%) conduzida com levedura tipo Fleischmann pren-sada e multiplicada em função da sangria de células (Experimento 1).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)			
	Levedura prensada		Levedura multiplicada	
	Test.	20%	Test.	20%
1	93,47	92,33	92,71	91,45
2	91,23	90,09	90,77	88,80
3	91,89	89,89	91,01	89,23
4	93,41	89,90	92,37	89,68
5	92,33	91,64	92,32	90,76
6	91,42	90,03	90,50	89,83
7	91,40	89,40	90,50	88,93
Média geral	92,16 A	90,47 B	91,45 A	89,81 B
DMS 5% para médias de Tratamentos: 0,73				

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

tal de açúcar para testemunha e sangria de 20% de ambas as leveduras (Tabelas 36 e 37 - Apêndice).

A demonstração de um comportamento semelhante entre a levedura prensada e a levedura multiplicada em todos os parâmetros estudados e principalmente no rendimento da fermentação, determinou a escolha da levedura tipo Fleischmann obtida no comércio como microrganismo de trabalho para os demais experimentos, eliminando deste modo a multiplicação em laboratório. Estes mesmos resultados tornaram válida a sua comparação com a linhagem M-300-A, obrigatoriamente multiplicada em laboratório.

O tempo de fermentação (Tabelas 36 e 37 - Apêndice) foram iguais para ambas as leveduras. A levedura prensada, rica em reservas e com alta porcentagem de células vivas estava provavelmente com uma atividade metabólica normal e sem grande demanda energética. Por outro lado, a levedura multiplicada, já adaptada ao meio, com menor competição pelo substrato e nutrientes e baixa porcentagem de células ativas apresentou alto índice de brotamento o que, teoricamente, indica alta demanda energética. Como em laboratório essas células encontravam-se em anaerobiose, a energia necessária somente poderia ser obtida através da fermentação.

De um modo geral a produção de etanol por célula foi maior para a levedura multiplicada do que para a levedura prensada. Para uma elucidação segura do fato, necessário seria fazer um estudo cinético do processo fermentativo em questão.

4.2. EFEITO DA SANGRIA DE LEVEDURA SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, DURANTE 7 CICLOS, CONDUZIDA COM LEVEDURA TIPO FLEISCHMANN PRENSADA, EM MOSTO DE XAROPE A 30°C (EXPERIMENTO 2)

4.2.1. VIABILIDADE CELULAR

As porcentagens de viabilidade celular obtidas em função dos diferentes níveis de sangria em cada ciclo encontram-se nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice).

A análise de variância desses dados (Tabela 51 - Apêndice) mostrou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, o que indicou uma influência significativa dos ciclos fermentativos sobre os tratamentos e determinou a comparação da viabilidade celular ciclo a ciclo.

Na Tabela 16 encontram-se os valores médios de viabilidade, comparados mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As viabilidades celulares da testemunha e da sangria de 5% (v/v) não foram significativamente diferentes até o ciclo 6. No ciclo 7, a sangria de 5% (v/v) apresentou uma viabilidade estatisticamente maior que a da testemunha. As viabilidades celulares médias das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) foram estatisticamente iguais a da testemunha até o ciclo 4 e significativamente superiores a partir deste ciclo.

TABELA 16. Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	97,19 A a	97,21 A a	97,46 A a	97,44 A a	97,37 A a
2	92,90 A ab	93,64 A a	94,20 A ab	95,43 A ab	96,27 A a
3	86,43 A bc	85,44 A b	88,40 A bc	90,05 A bc	91,07 A a
4	81,26 A c	80,32 A b	83,26 A cd	84,15 A cd	83,58 A b
5	71,10 B d	69,33 B c	78,11 A d	82,75 A d	82,46 A b
6	54,78 C e	57,17 BCd	58,87ABCe	63,72 ABe	64,02 A c
7	44,49 C f	54,32 B d	55,15 B e	55,20 B f	67,27 A c
Média geral	75,45	76,77	79,35	81,25	83,15
DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 6,57					
DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 7,29					

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Comparando-se os níveis de sangria entre si verificou-se que do ciclo 1 ao ciclo 4 as sangrias de 5% a 20% (v/v) de células não diferiram significativamente entre si. No ciclo 5, a sangria de 5% apresentou uma viabilidade celular significativamente menor que a dos demais tratamentos, os quais não diferiram entre si. Nos ciclos 6 e 7 a viabilidade da sangria de 5% (v/v) foi significativamente menor que a da sangria de 20% (v/v), porém não diferiu das sangrias de 10% e 15% (v/v). As viabilidades relativas às sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) não diferiram entre si, exceto no ciclo 7, onde a sangria de 20% (v/v) foi significativamente superior. Embora não se tenha observado um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular em função do aumento do nível de sangria em todos os ciclos, verificou-se uma tendência a este comportamento na maior parte deles para sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v).

Durante os 7 ciclos fermentativos a viabilidade celular decresceu para todos os tratamentos. O seu comportamento ciclo a ciclo foi explicado pela equação de 1º grau conforme mostrado na Figura 4. Comparando-se os coeficientes angulares das respectivas retas verificou-se que quanto maior o nível de sangria, menos acentuado foi o decréscimo na viabilidade celular durante os 7 ciclos fermentativos. Considerando que a sangria de células implica na remoção de células vivas e mortas e que as células vivas irão se multiplicar, quando a taxa de multiplicação for maior que a taxa de morte a porcentagem de células vivas irá aumentar. Quanto mais célu-

FIGURA 4. Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 30°C.

las foram removidas, maior foi o volume de água ácida adicionado para ressuspensão das mesmas, uma vez que os volumes finais foram iguais. Portanto, maiores níveis de sangria de células permitiram maior aeração do meio e consequentemente maior multiplicação celular.

O comportamento da viabilidade celular obtido coincidiu com observações feitas em unidades industriais onde um aumento na viabilidade das células do processo muitas vezes indicou perda elevada de levedura no vinho centrifugado.

4.2.2. BROTAMENTO CELULAR

As porcentagens de brotamento celular obtidas em cada ciclo em função dos diferentes níveis de sangria encontram-se nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice).

A análise de variância dos dados, transformados para $\arcsin \sqrt{y/100}$ com a finalidade de normalizá-los, encontra-se na Tabela 52 (Apêndice), a qual indicou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Devido a influência significativa dos ciclos no comportamento dos tratamentos as médias de brotamento celular foram comparadas ciclo a ciclo, utilizando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 17).

As médias, referentes aos dados experimentais, mostradas na Tabela 17 evidenciaram que o brotamento celular da testemunha foi estatisticamente igual ao da sangria de 5% (v/v) até o ciclo 5, ao da sangria de 10% (v/v) até o ciclo

TABELA 17. Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	0,28 A b	0,35 A b	0,36 A c	0,33 A c	0,39 A b
2	0,36 A ab	0,36 A b	0,33 A c	0,37 A c	0,37 A b
3	0,47 A ab	0,56 A b	0,51 A c	0,47 A c	0,90 A b
4	0,57 B ab	0,94 B b	1,50 B bc	8,79 A b	10,26 A a
5	0,70 B ab	1,26 B b	13,94 A a	12,62 A ab	11,95 A a
6	1,22 B ab	6,84 A a	11,60 A a	6,30 A b	14,35 A a
7	3,40 C a	13,46 A a	5,38 BCab	18,14 A a	12,17 ABa
Média geral	1,00	3,39	4,80	6,72	7,20

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos como arc sen $\sqrt{y/100}$: 0,12

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos como arc sen $\sqrt{y/100}$: 0,13

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

4 e as das sangrias de 15% e 20% (v/v) até o ciclo 3. A partir dos ciclos acima considerados, o brotamento celular da testemunha tornou-se estatisticamente menor que o das respectivas sangrias. Observou-se que o brotamento celular foi primeiramente estimulado para os níveis de sangria mais elevados.

Comparando-se as sangrias entre si verificou-se que o brotamento referente à sangria de 5% (v/v) diferiu significativamente da sangria de 10% (v/v) somente nos ciclos 5 e 7. O brotamento da sangria de 10% (v/v) foi estatisticamente inferior ao das sangrias de 15% e 20% (v/v) no ciclo 4. No ciclo 7, a sangria de 10% (v/v) apresentou um brotamento significativamente menor que o obtido com 15% (v/v) de sangria. Os brotamentos celulares das sangrias de 15% e 20% (v/v) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. De um modo geral, o brotamento celular foi primeiramente estimulado para os níveis de sangria mais elevados.

O comportamento do brotamento celular durante os ciclos fermentativos está representado pelas curvas mostradas na Figura 5, obtidas por equações de regressão polinomial até o 3º grau. O aumento no brotamento celular da testemunha ocorreu durante os 7 ciclos fermentativos, porém, somente os ciclos 1 e 7 diferiram estatisticamente entre si (Tabela 17). As sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) mostraram um aumento estatisticamente significativo no brotamento celular, respectivamente, a partir dos ciclos 5, 4, 3, 3. Portanto, quanto maior a sangria mais rápida e intensamente o brotamento celular au-

FIGURA 5. Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C.

mentou, provavelmente devido a menor competição da levedura pelo substrato, e também a maior quantidade de oxigênio no tratamento ácido, levado pelo maior volume de água nos tratamentos de maior sangria.

4.2.3. NÚMERO DE CÉLULAS

Os dados experimentais do número de células (células/mililitro) em cada ciclo encontra-se nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice).

A análise de variância mostrada na Tabela 53 (Apêndice) indicou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F evidenciando uma influência significativa dos ciclos sobre os tratamentos, o que determinou a comparação do número de células em cada ciclo. Os valores médios do número de células em cada ciclo foram comparados pela aplicação do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 18). Estatisticamente, o número de células relativo à testemunha foi constante e superior aos números de células resultantes das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) durante os 7 ciclos fermentativos.

No ciclo 1, o número de células para sangria de 5% (v/v) foi significativamente maior que o das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v). No ciclo 2, as sangrias de 5% a 20% (v/v) não diferiram significativamente entre si quanto ao número de células. Do ciclo 3 ao ciclo 6, a sangria de 5% (v/v) foi significativamente superior às sangrias de 10%, 15% e

TABELA 18. Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	1,545 A a	1,535 B a	1,277 C a	1,280 C a	1,275 C a
2	1,545 A a	1,275 B b	1,275 B a	1,273 B b	1,267 B b
3	1,545 A a	1,270 B bc	1,015 C b	1,015 C c	1,015 C c
4	1,545 A a	1,265 B c	1,007 C c	1,013 C c	1,007 C d
5	1,545 A a	1,010 B d	0,754 C d	0,756 C d	0,753 C e
6	1,545 A a	1,003 B e	0,750 C de	0,753 C d	0,752 C e
7	1,545 A a	0,749 B f	0,746 B e	0,499 C e	0,498 C f
Média geral	1,545	1,158	0,975	0,941	0,938

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,008

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,007

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamento dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 6. Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células, para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C.

20% (v/v) com relação ao número de células. No ciclo 7, as sangrias de 5% e 10% (v/v) não diferiram entre si, porém, foram significativamente superiores às sangrias de 15% e 20% (v/v). O número de células das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) foram estatisticamente iguais entre si durante os 6 primeiros ciclos. No ciclo 7 a sangria de 10% (v/v) foi estatisticamente superior às sangrias de 15% e 20% (v/v) as quais não diferiram entre si.

O comportamento do número de células nos tratamentos, ciclo a ciclo, ajustou-se às equações de regressão do 1º grau mostradas na Figura 6. A testemunha manteve-se constante durante todos os ciclos não demonstrando qualquer multiplicação celular; resultado este concordante com AIBA et alii (1968) que considera 10^8 células/mililitro o limite para o crescimento celular na fermentação alcoólica.

De um modo geral verificou-se que as sangrias 5% a 20% (v/v) provocaram uma redução significativa no número de células. A análise das médias em cada ciclo mostradas na Tabela 18 e o comportamento dentro dos tratamentos (Figura 6), evidenciaram que o número de células decresceu menos acentuadamente para sangria de 5% (v/v) e praticamente na mesma proporção para as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v).

4.2.4. MATÉRIA SECA

A matéria seca (g/100 ml) presente nos tubos de fermentação após cada ciclo fermentativo encontra-se nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice).

A análise de variância desses dados, apresentada na Tabela 54 (Apêndice) indicou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, razão pela qual a matéria seca foi comparada ciclo a ciclo.

As médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e mostradas na Tabela 19 evidenciaram que a matéria seca da testemunha foi estatisticamente superior à das sangrias de 5% a 20% (v/v) durante os 7 ciclos. Verificou-se que a matéria seca diminuiu significativamente com o aumento do nível de sangria em todos os ciclos. Este resultado não foi concordante com o obtido para o número de células (item 4.2.3.) onde as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) não diferiram entre si. Este fato está relacionado à metodologia de contagem do número de células/ml, provavelmente não detectando pequenas diferenças no número de células para os diferentes níveis de sangria.

O comportamento da matéria seca nos tratamentos foi ajustado às equações do 2º grau, obtidas por regressão. Observando-se a Tabela 19 e a Figura 13 verificou-se que a matéria seca da testemunha aumentou com os ciclos. A sangria de 5% (v/v) provocou um decréscimo na matéria seca nos 4 primeiros ciclos fermentativos. A partir do ciclo 5 ocorreu uma recuperação das células e a matéria seca novamente aumentou. As sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) apresentaram uma queda significativa nas suas respectivas matéria seca, ciclo a ciclo, durante os 7 ciclos.

TABELA 19. Comparações das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	3,6716 A c	3,4341 B a	3,1968 C a	3,0345 C a	2,7723 D a
2	3,8087 A bc	3,3966 B ab	3,0845 C a	2,7037 D b	2,3104 E b
3	3,8336 A bc	3,2218 B abc	2,6849 C b	2,4227 D c	1,9607 E c
4	3,7712 A c	3,0720 B c	2,5101 C bc	1,9982 D d	1,5737 E d
5	3,8361 A bc	3,1469 B c	2,4727 C bc	1,8983 D d	1,4488 E d
6	4,0209 A b	3,2093 B bc	2,4227 C c	1,8609 D d	1,5363 E d
7	4,2457 A a	3,2718 B abc	2,4102 C c	1,8733 D d	1,4051 E d
Média geral	3,8840	3,2503	2,6831	2,2559	1,8582

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,2012

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,2150

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos: dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 7. Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann, em mosto de xarope a 30°C.

Observou-se que o número de células da testemunha manteve-se constante enquanto que a sua matéria seca aumentou significativamente a partir do ciclo 5. Vários fatores podem ser considerados para explicar esta discrepância observada nos resultados de matéria seca e número de células. Considerando que as células mudam de tamanho, pode-se ter para um mesmo número de células, uma quantidade maior de matéria seca devido ao maior tamanho das mesmas. Para determinação do número de células (3.3.9) a amostra foi retirada do meio de fermentação, porém, somente as células de levedura foram computadas. Na determinação do teor de matéria seca (3.3.8) a alíquota considerada continha além das células, outros sólidos em suspensão remanescentes da lavagem e centrifugação que interferiram na turbidez da suspensão e conseqüentemente, foram computados como matéria seca.

A diferença na precisão dos métodos e os fatores acima citados dificultaram qualquer conclusão segura quanto ao crescimento da população de levedura durante os 7 ciclos fermentativos.

4.2.5. RENDIMENTO DE FERMENTAÇÃO

As porcentagens de rendimento alcoólico obtidas em cada ciclo encontram-se nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice).

De acordo com a análise de variância desses dados (Tabela 55 - Apêndice) a interação "Tratamentos x Ciclos"

não foi significativa pelo teste F, indicando que os ciclos não tiveram influência significativa sobre os tratamentos. Em razão disto não foram realizados desdobramentos, mas comparadas somente as médias gerais para cada tratamento (Tabela 20).

As comparações obtidas pela aplicação do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade evidenciaram que o rendimento alcoólico da testemunha (93,54%) foi estatisticamente superior ao das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v), respectivamente iguais a 92,70%, 92,27%, 91,46% e 91,34%. Comparando as sangrias entre si verificou-se que a sangria de 5% (v/v) não diferiu estatisticamente da sangria de 10% (v/v), assim como a sangria de 15% (v/v) não diferiu da sangria de 20% (v/v), quanto ao rendimento da fermentação alcoólica. Verificou-se que o tempo de fermentação do ciclo 1 ao ciclo 7 variou igualmente para testemunha e sangria de 5% (v/v) (21 a 22 horas) porém foi menor para a sangria de 10% (v/v) (21 a 28 horas) conforme mostrado nas Tabelas 38 e 39 (Apêndice). Comportamento semelhante foi observado entre as sangrias de 15% e 20% (v/v) cujo tempo de fermentação variou de 21 a 28 horas e de 21 a 43 horas, respectivamente. Observou-se que o tempo de fermentação foi igual a 21 horas para todos os tratamentos até o ciclo 4, ciclo até o qual a viabilidade celular manteve-se estatisticamente igual para todos os tratamentos.

Embora as sangrias de 5% e 10% (v/v) tenham reduzido igualmente o rendimento, a produtividade (ml álcool/

TABELA 20. Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 30°C (Experimento 2).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	93,73	93,67	93,24	93,01	93,27
2	93,50	92,59	92,33	91,67	91,21
3	93,72	93,28	92,61	90,79	90,58
4	94,95	93,95	93,49	92,78	92,35
5	93,51	92,35	92,57	91,45	91,67
6	92,58	91,65	91,16	90,05	90,05
7	92,80	91,42	90,50	90,48	90,24
Média geral	93,54 A	92,70 B	92,27 B	91,46 C	91,34 C
DMS 5% para médias dos Tratamentos: 0,44					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

hora) foi reduzida a partir do ciclo 4 para a sangria de 10% (v/v). Comportamento semelhante foi observado entre as sangrias de 15% e 20% (v/v) nos ciclos 6 e 7 (Tabelas 38 e 39 - Apêndice).

O comportamento do rendimento alcoólico dentro dos tratamentos durante os 7 ciclos fermentativos com as respectivas equações às quais os dados melhor se ajustaram são mostrados na Figura 8. Os rendimentos alcoólicos obtidos com a testemunha foram superiores aos demais tratamentos durante os 7 ciclos fermentativos.

Embora sem comparações estatísticas, verificou-se que não ocorreu diferenças acentuadas entre a testemunha e os demais tratamentos com relação ao teor de AR no vinho. Do mesmo modo não observou-se diferenças acentuadas na população bacteriana (Tabelas 38 e 39 - Apêndice). Considerando que com sangria de 5% (v/v) já ocorreram reduções estatisticamente significativas no número de células e na matéria seca, com consequente estímulo do brotamento, pode-se concluir que a queda no rendimento está diretamente relacionada com o uso de ART para a produção de massa celular em detrimento da produção de álcool nas condições deste experimento.

FIGURA 8. Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria células, para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 30°C.

4.3. EFEITO DA SANGRIA DE LEVEDURA SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, DURANTE 7 CICLOS, CONDUZIDA COM LEVEDURA TIPO FLEISCHMANN PRENSADA, EM MOSTO DE XAROPE A 33°C (EXPERIMENTO 3)

4.3.1. VIABILIDADE CELULAR

As porcentagens de viabilidade em cada ciclo, obtidas em função dos diferentes níveis de sangria, encontram-se nas Tabelas 40 e 41 (Apêndice).

A análise de variância (Tabela 56 - Apêndice) permitiu constatar que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F, indicando que os ciclos influenciaram igualmente todos os tratamentos. Dessa forma, foram comparadas somente as médias de cada tratamento, utilizando o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 21).

As médias gerais mostradas na Tabela 21 indicaram que a viabilidade celular da testemunha (73,64%) não diferiu estatisticamente das sangrias de 5% e 10% (v/v) porém foi significativamente inferior às das sangrias de 15% e 20% (v/v).

As viabilidades médias das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) foram respectivamente iguais a 73,38%, 74,12%, 75,16%, 76,56%. Estatisticamente, as sangrias de 5% e 10%, 10% e 15%, 15 e 20% (v/v) não diferiram significativamente entre si quanto à viabilidade.

TABELA 21. Comparações das médias de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	97,94	97,60	97,02	97,59	97,40
2	95,75	94,81	94,92	95,24	96,89
3	84,02	85,19	88,04	89,97	91,59
4	70,97	72,50	74,27	76,21	77,28
5	62,66	60,18	63,04	63,85	66,50
6	54,95	52,98	53,13	54,64	56,87
7	49,22	50,37	48,44	48,60	49,41
Média geral	73,64 C	73,38 C	74,12 BC	75,16 AB	76,56 A

DMS 5% para médias dos Tratamentos: 1,48

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 9. Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C.

Durante os 7 ciclos fermentativos, a viabilidade celular decresceu para todos os tratamentos (Figura 9). Os coeficientes angulares das respectivas retas, obtidas por análises de regressão, quantificaram o decréscimo da viabilidade celular entre os ciclos. À temperatura de 33°C observou-se uma queda na viabilidade celular semelhante para todos os tratamentos. Este fato deveu-se, provavelmente, ao aumento do metabolismo à temperatura mais elevada, ou seja, a 33°C a fermentação foi mais rápida, o brotamento foi maior (item 4.3.2), porém a taxa de morte também foi maior. Consequentemente, foi necessário uma sangria mais drástica (15% e 20% (v/v)) para observar-se o efeito positivo da mesma sobre a viabilidade, isto é, para torná-la significativamente superior à testemunha.

4.3.2. BROTAMENTO CELULAR

Nas Tabelas 40 e 41 (Apêndice) encontram-se os dados originais do brotamento celular (%) em cada ciclo.

Os dados de brotamento foram transformados para $\arcsin \sqrt{y/100}$ com a finalidade de normalizá-los. A análise de variância desses dados mostrou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% pelo teste F (Tabela 57 - Apêndice) o que determinou o estudo do brotamento ciclo a ciclo.

A Tabela 22 contém os valores experimentais de brotamento e as comparações, realizadas mediante utilização

TABELA 22. Comparações das médias de brotamento celular (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	0,30 A a	0,39 A b	0,32 A c	0,35 A c	0,47 A d
2	0,46 A a	0,58 A b	0,61 A c	0,63 A c	0,46 A d
3	0,53 A a	0,58 A b	0,54 A c	0,57 A c	1,17 A d
4	0,85 B a	0,81 B b	0,77 B c	1,03 B c	6,88 A c
5	0,82 B a	0,91 B b	5,65 B b	23,33 A b	20,16 A b
6	1,02 B a	21,27 A a	30,20 A a	26,02 A ab	14,51 A ab
7	3,51 B a	31,84 A a	38,36 A a	39,71 A a	34,77 A a
Média geral	1,07	8,05	10,92	13,09	11,20

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos como arc sen $\sqrt{y/100}$: 0,14

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos como arc sen $\sqrt{y/100}$: 0,15

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamento dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, referentes aos dados transformados.

De acordo com a Tabela 22, o brotamento celular da testemunha e das sangrias de 5% e 10% (v/v) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si até o ciclo 5. A partir deste, os brotamentos celulares para ambos os níveis de sangria tornaram-se estatisticamente superiores ao da testemunha. Com relação às sangrias de 15% e 20% (v/v) esta superioridade foi significativa a partir dos ciclos 4 e 3 respectivamente.

A comparação do brotamento celular resultante dos diferentes níveis de sangria mostrou os seguintes resultados: sangrias de 5% e 10% (v/v) não diferiram estatisticamente entre si; sangria de 10% (v/v) foi significativamente inferior à sangria de 15% (v/v) no ciclo 5 e à sangria de 20% (v/v) nos ciclos 4 e 5. A sangria de 15% (v/v) mostrou-se significativamente inferior à sangria de 20% (v/v) no ciclo 4. Nos demais ciclos as sangrias de 5% a 20% (v/v) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos resultados de brotamento celular.

Verificou-se que quanto maior o nível de sangria mais cedo o brotamento foi estimulado, ou seja, o brotamento celular tornou-se significativamente maior em relação ao da testemunha em ciclos anteriores.

Observando-se a Tabela 22 e a Figura 10 verificou-se que a testemunha mostrou um aumento linear com os ciclos, porém não significativo estatisticamente. O brotamento

FIGURA 10. Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C.

celular referente às sangrias de 5% e 10% (v/v) aumentou com os ciclos segundo equação do 2º grau. De acordo com a Tabela 22, aumento significativo ocorreu, respectivamente, a partir dos ciclos 5 e 4. Para as sangrias de 15% e 20% (v/v) o aumento do brotamento com os ciclos obedeceu à equação de 3º grau e estatisticamente foi significativo a partir dos ciclos 4 e 3, respectivamente.

Comparando-se as Tabelas 17 e 22 verificou-se que a 33°C o brotamento celular foi acentuadamente maior que o observado a 30°C. Este fato está relacionado com o aumento do metabolismo das células à temperatura mais elevada.

4.3.3. NÚMERO DE CÉLULAS

O número de células (células/mililitro) em cada ciclo encontra-se nas Tabelas 40 e 41 (Apêndice).

A análise de variância, mostrada na Tabela 58 (Apêndice) evidenciou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, o que determinou a comparação do número de células em todos os ciclos (Tabela 23).

A comparação entre as médias, apresentadas na Tabela 23, foram realizadas segundo o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O número de células da testemunha mostrou-se constante e significativamente maior que o das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) em todos os ciclos. No ciclo 1, o número de células relativo à sangria de 5% (v/v) foi

TABELA 23. Comparações das médias de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	1,550 A a	1,543 B a	1,285 C a	1,285 C a	1,285 C a
2	1,550 A a	1,280 B b	1,280 B a	1,280 B a	1,277 B b
3	1,550 A a	1,273 B c	1,017 C b	1,020 C b	1,020 C c
4	1,550 A a	1,267 B c	1,013 C b	1,015 C b	1,015 C c
5	1,550 A a	1,010 B d	0,757 C c	0,758 C c	0,757 C d
6	1,550 A a	1,002 B e	0,753 C cd	0,754 C c	0,754 C d
7	1,550 A a	0,748 B f	0,749 B d	0,507 C d	0,499 C e
Média geral	1,550	1,160	0,979	0,946	0,944

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,007

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,007

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 11. Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C.

estatisticamente superior ao das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) as quais não diferiram entre si. No ciclo 2, as sangrias de 5% a 20% (v/v) não diferiram entre si. Do ciclo 3 ao ciclo 6, a sangria de 5% (v/v) apresentou um número de células significativamente maior que o das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) os quais estatisticamente não diferiram entre si. No ciclo 7, as sangrias de 5% e 10% (v/v) mostraram igual número de células, porém superiores ao das sangrias de 15% e 20% (v/v), as quais não diferiram entre si.

As variações no número de células, ciclo a ciclo, para os tratamentos ajustaram-se às equações de regressão do 1º grau, mostradas na Figura 11. A testemunha mostrou-se constante durante os 7 ciclos, evidenciando a não multiplicação das células. Para os demais tratamentos ocorreu uma redução do número de células ciclo a ciclo. De acordo com os valores dos coeficientes angulares das respectivas retas verificou-se que o decréscimo ciclo a ciclo foi semelhante para todos os níveis de sangria. Numa análise geral, o número de células da sangria de 5% (v/v) foi superior ao das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) os quais não diferiram entre si.

4.3.4. MATÉRIA SECA

Nas Tabelas 40 e 41 (Apêndice) encontram-se os teores de matéria seca (g/100 ml) presentes nos tubos de fermentação após cada ciclo fermentativo.

Verificou-se uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 59 (Apêndice). Em razão desta interação, o teor médio de matéria seca foi comparado ciclo a ciclo, mediante a utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 24). O teor de matéria seca relativo à testemunha foi estatisticamente maior que o das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v). Comparando as sangrias entre si verificou-se que a matéria seca diminuiu com o aumento do nível de sangria. Entre as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) ficou evidente diferenças estatisticamente significativas, o que não foi observado na determinação do número de células, onde os três níveis de sangria não diferiram estatisticamente entre si.

A análise de regressão polinomial até o 3º grau resultou nas curvas apresentadas na Figura 12, as quais mostraram o comportamento da matéria seca, ciclo a ciclo, para os diferentes tratamentos. A matéria seca relativa à testemunha aumentou com os ciclos, evidenciando uma pequena multiplicação não detectada através do número de células (item 4.3.3.) o qual manteve-se constante durante os 7 ciclos fermentativos. Esta discrepância de resultados, também observada no Experimento 2, está relacionada com o tamanho das células e com a amostragem, conforme discutido em 4.2.4.

Para 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de sangria verificou-se um decréscimo no teor de matéria seca com os ciclos com tendência à estabilização nos três ciclos finais para todos os tratamentos.

TABELA 24. Comparação das médias de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com . levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	3,3717 A d	3,1968 B a	2,9721 C a	2,8223 D a	2,5101 E a
2	3,4466 A cd	3,0970 B ab	2,7474 C b	2,4851 D b	2,1418 E b
3	3,4841 A cd	2,9971 B b	2,5476 C c	2,2479 D c	1,8484 E c
4	3,5590 A bc	2,8223 B c	2,2354 C d	1,7984 D d	1,5237 E d
5	3,5902 A bc	2,8098 B c	2,1543 C d	1,6986 D de	1,3114 E e
6	3,6838 A ab	2,7723 B c	2,0981 C d	1,5799 D e	1,2241 E e
7	3,8087 A a	2,8098 B c	2,0731 C d	1,5612 D e	1,1981 E e
Média geral	3,5634	2,9293	2,4040	2,0276	1,6797

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,1485

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,1656

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 12. Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de cé-
lulas para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C.

4.3.5. RENDIMENTO DE FERMENTAÇÃO

Nas Tabelas 40 e 41 (Apêndice) encontram-se os valores de rendimento (%) em cada ciclo fermentativo.

A análise de variância mostrou uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, indicando que o comportamento do rendimento nos tratamentos sofreu influência significativa (Tabela 60 - Apêndice).

As comparações das médias em cada ciclo, feitas mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, apresentadas na Tabela 25 evidenciaram que os valores de rendimento relativos à testemunha foram estatisticamente iguais aos obtidos para sangria de 5% (v/v) em todos os ciclos. O rendimento da testemunha e sangria de 10% (v/v) diferiram significativamente nos ciclos 4 e 6, ciclos nos quais o rendimento da testemunha foi estatisticamente maior que o da sangria de 10% (v/v). Nos demais ciclos, os rendimentos mantiveram-se estatisticamente iguais entre si. Comparando-se a testemunha e sangria de 15% (v/v) verificou-se que o rendimento da primeira foi estatisticamente superior do ciclo 2 ao ciclo 6; nos ciclos 1 e 7 os tratamentos não diferiram entre si. Os mesmos resultados foram obtidos para sangria de 20% (v/v).

As comparações entre os rendimentos relativos às sangrias de 5% a 20% (v/v) mostraram os seguintes resultados: sangria de 5% (v/v) não diferiu estatisticamente da san-

TABELA 25'. Comparações das médias de rendimento da fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	91,09 A a	91,08 A a	91,08 A a	90,21 A a	90,23 A a
2	91,30 A a	90,42 ABa	89,98 ABab	89,32 B ab	89,10 B ab
3	90,86 A a	90,42 A a	89,54 A ab	87,79 B bc	87,35 B c
4	91,08 A a	90,20 AB a	88,88 BC bc	88,23 C bc	87,79 C bc
5	88,66 A b	87,79 AB b	87,35 AB c	87,30 B c	87,32 B c
6	89,10 A b	87,78 AB b	87,57 B c	87,31 B c	87,31 B c
7	88,24 A b	88,01 A b	87,76 A c	87,33 A c	87,33 A c
Média geral	90,05	89,38	88,88	88,21	88,06

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 1,34

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 1,54

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

gria de 10% (v/v) durante os 7 ciclos; sangria de 10% (v/v) foi estatisticamente superior às sangrias de 15% e 20% (v/v) somente no ciclo 3 e igual às mesmas nos demais ciclos; sangrias de 15% e 20% (v/v) não diferiram entre si em qualquer ciclo; sangria de 5% (v/v) foi estatisticamente superior às sangrias de 15% e 20% (v/v) nos ciclos 3 e 4, mantendo-se igual às mesmas nos demais ciclos.

Verificou-se que no ciclo 7 os rendimentos tornaram-se estatisticamente iguais. É possível que em ciclos posteriores ao ciclo 7 os rendimentos mantivessem esta igualdade devido à tendência de queda no rendimento da testemunha e a estabilização dos rendimentos relativos aos níveis de sangria. Entretanto, este estudo não foi realizado porque nas condições do experimento a não reposição de células resultaria na extinção das mesmas, o que não é verificado em escala industrial.

O tempo de fermentação (Tabelas 40 e 41 - Apêndice) foi igual a 21 horas para testemunha e sangria de 5% (v/v). Nos ciclos 6 e 7 o tempo de fermentação aumentou para 22 horas (sangria de 10% (v/v)) e 23 horas (sangrias de 15% e 20% (v/v)).

Com a utilização da análise de regressão até o 3º grau foram obtidas as curvas que melhor representaram o comportamento do rendimento dentro dos tratamentos (Figura 13). De acordo com a Tabela 25 e Figura 13 verificou-se um decréscimo linear no rendimento de fermentação com os ciclos para a testemunha e para sangrias de 5% e 10% (v/v), estatisticamen

FIGURA 13. Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C.

te significativos a partir do ciclo 4 para testemunha e sangria de 5% (v/v), e do ciclo 3 para sangria de 10% (v/v). Para as sangrias de 15% e 20% (v/v) observou-se um decréscimo significativo no rendimento a partir do ciclo 2 e uma tendência à estabilização nos ciclos 5, 6 e 7. Este comportamento veio corroborar com a hipótese dos tratamentos tornarem-se iguais a partir do ciclo 7, sob as condições deste experimento.

De acordo com as Tabelas 40 e 41 (Apêndice), não ocorreram diferenças acentuadas entre a testemunha e os demais tratamentos com relação à carga bacteriana (bastonetes/ml). Os teores de AR no vinho evidenciaram um consumo quase que total do açúcar para todos os tratamentos.

Em uma análise geral verificou-se que com sangria de 5% (v/v) a viabilidade celular não diferiu significativamente da testemunha, o brotamento celular foi estatisticamente maior apenas nos ciclos 6 e 7, e o número de células e teor de matéria seca foram estatisticamente inferiores ao da testemunha. Considerando que o rendimento da sangria de 5% (v/v) e o da testemunha não foram estatisticamente diferentes em qualquer dos ciclos pode-se afirmar que, nas condições deste experimento, foi possível uma sangria de 5% (v/v) das células sem afetar o rendimento da fermentação.

Embora a sangria de 10% (v/v) tenha apresentado resultados de viabilidade, brotamento, número de células e matéria seca semelhantes aos obtidos com sangria de 5% (v/v) de células, a afirmação de uma possível sangria para este ní-

vel depende de maiores estudos, ou seja, aumentar o número de ciclos fermentativos, e de investigar a aplicação da sangria a cada 2 ciclos em lugar de fazê-la ciclo a ciclo.

As sangrias de 15% e 20% (v/v) apresentaram uma viabilidade celular significativamente menor que a da testemunha, maior brotamento celular a partir dos ciclos 4 e 3 respectivamente, número de células e matéria seca inferiores à testemunha e à sangria de 5% (v/v), e rendimento estatisticamente inferior à testemunha do ciclo 2 ao ciclo 6.

A discordância de resultados entre o Experimento 2 (30°C) e o Experimento 3 (33°C) provavelmente ocorreu porque o efeito da temperatura tornou menos efetivo, ou, mascarou o efeito da sangria, uma vez que diminuiu a viabilidade celular, aumentou o brotamento e diminuiu o rendimento da fermentação da testemunha e dos demais níveis de sangria. Parece que ocorreu uma aceleração no metabolismo da levedura com a temperatura, tornando-a menos eficiente em todos os aspectos.

4.4. EFEITO DA SANGRIA DE LEVEDURA SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, DURANTE 7 CICLOS, CONDUZIDA COM LEVEDURA TIPO FLEISCHMANN PRENSADA, EM MOSTO DE MELAÇO A 33°C (EXPERIMENTO 4)

4.4.1. VIABILIDADE CELULAR

As porcentagens de células vivas nos ciclos, referentes aos diferentes níveis de sangria, encontram-se nas Tabelas 42 e 43 (Apêndice).

A análise de variância mostrada na Tabela 61 (Apêndice) mostrou uma interação "Tratamentos x Ciclos" não significativa pelo teste F indicando que os tratamentos comportaram-se igualmente durante todos os ciclos. Em razão disto, foram comparadas somente as médias gerais dos tratamentos (Tabela 26) mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A Tabela 26 evidenciou que a viabilidade celular média da testemunha (66,77%) foi estatisticamente inferior às viabilidades resultantes das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v), respectivamente iguais a 69,23%, 70,81%, 72,49% e 73,86%.

Comparando as sangrias entre si observou-se que a viabilidade celular das sangrias de 5% e 10%, 10% e 15%, 15% e 20% (v/v) não diferiram estatisticamente entre si. A viabilidade celular das sangrias de 5% e 10% (v/v) foram estatisticamente inferiores a da sangria de 20% (v/v).

O comportamento da viabilidade celular durante os 7 ciclos fermentativos para os 5 tratamentos encontra-se representado na Figura 14. A viabilidade celular decresceu com os ciclos para todos os tratamentos. Os coeficientes angulares das respectivas retas indicaram que a aplicação de 20% (v/v) de sangria resultou em uma queda menos acentuada da viabilidade celular durante os 7 ciclos, quando comparado aos demais tratamentos.

TABELA 26. Comparação das médias de viabilidade celular (%) para diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada, em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	91,43	92,38	93,64	95,28	95,16
2	84,06	85,47	86,44	89,10	90,46
3	75,29	78,43	79,80	81,12	82,30
4	67,29	70,75	72,18	73,44	74,96
5	58,92	61,79	64,35	65,77	66,59
6	48,97	53,20	54,43	56,65	58,70
7	41,48	42,60	44,87	46,07	48,87
Média geral	66,78 D	69,23 C	70,81 BC	72,49 AB	73,86 A
DMS 5% para médias dos Tratamentos: 1,95					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 14. Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melaço a 33°C.

4.4.2. BROTAMENTO CELULAR

O brotamento celular (%) obtido em cada ciclo fermentativo encontra-se nas Tabelas 42 e 43 (Apêndice).

Os valores de brotamento celular foram transformados para $\arcsin \sqrt{y/100}$ para a normalização dos mesmos. A análise de variância (Tabela 62 - Apêndice) permitiu constatar uma interação "Tratamentos x Ciclos" significativa ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, o que determinou a comparação do brotamento em todos os ciclos.

Na Tabela 27 encontram-se as médias dos dados experimentais do brotamento celular, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O brotamento celular da sangria de 5% (v/v) mostrou-se estatisticamente superior ao da testemunha a partir do ciclo 3. O mesmo comportamento foi verificado para as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) a partir do ciclo 2.

Comparando-se as sangrias entre si, verificou-se que o brotamento para sangria de 5% (v/v) foi estatisticamente inferior ao da sangria de 20% (v/v) nos ciclos 3 e 6. Nos demais ciclos o brotamento foi estatisticamente igual para todos os tratamentos.

A variação do brotamento, ciclo a ciclo, encontra-se representada pelas equações de regressão e pelas respectivas curvas apresentadas na Figura 15. Durante os 7 ciclos, observou-se que o brotamento celular aumentou. Aumentos estatisticamente significativos ocorreram a partir do ci-

TABELA 27. Comparação das médias de brotamento celular (%) para diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	0,22 A c	0,21 A e	0,23 A d	0,20 A d	0,26 A c
2	0,23 A c	0,53 A de	0,38 A d	0,70 A d	0,80 A c
3	0,54 C bc	1,52 BCcd	2,96 ABc	3,28 ABc	4,27 A b
4	1,32 Babc	3,33 A bc	4,42 A bc	4,48 A c	4,74 A b
5	1,87 B ab	6,12 A ab	6,04 A abc	6,32 A bc	6,85 A ab
6	2,41 C a	6,06 B ab	7,04 ABab	8,70 ABab	9,78 A a
7	3,10 B a	7,35 A a	7,78 A a	10,25 A a	9,77 A a
Média Geral	1,38	3,59	4,12	4,85	5,21

DMS 5% para Tratamento dentro de Ciclos para arc sen
 $\sqrt{y/100}$: 0,07

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos para arc sen
 $\sqrt{y/100}$: 0,07

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 15. Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melão a 33°C.

clo 4 para a testemunha e do ciclo 2 para os demais tratamentos. Embora não estatisticamente significativo, verificou-se que o brotamento aumentou com o aumento do nível de sangria (Tabela 27; Figura 15).

No Experimento 4 a multiplicação das células de levedura foi mais intensa, ou seja, ocorreu mais cedo relativamente ao Experimento 3, devido a maior quantidade de sais presentes no melaço

4.4.3. NÚMERO DE CÉLULAS

O número de células (células/mililitro) em cada ciclo encontra-se nas Tabelas 42 e 43 (Apêndice).

A análise de variância, mostrada na Tabela 63 (Apêndice), evidenciou que a interação "Tratamentos x Ciclos" foi significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, determinando a comparação do número de células em cada ciclo.

As médias apresentadas na Tabela 28 foram comparadas mediante utilização do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Através destas comparações constatou-se que o número de células referente à testemunha, estatisticamente, foi maior que o dos demais tratamentos em todos os ciclos fermentativos.

Entre os níveis de sangria observou-se que no ciclo 2 o número de células foi estatisticamente igual para todos os tratamentos e no ciclo 7 a sangria de 5% (v/v) foi

TABELA 28. Comparações das médias do número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4).

		Nível de sangria (v/v)			
Ciclos	Test.	5%	10%	15%	20%
1	1,460 A a	1,445 B a	1,210 C a	1,208 C a	1,205 C a
2	1,460 A a	1,198 B b	1,200 B b	1,200 B b	1,200 B b
3	1,460 A a	1,193 B c	0,956 C c	0,954 C c	0,954 C c
4	1,460 A a	1,185 B d	0,951 C d	0,949 C d	0,949 C d
5	1,460 A a	0,944 B e	0,709 C e	0,708 C e	0,708 C e
6	1,460 A a	0,940 B f	0,704 C ef	0,704 C e	0,704 C e
7	1,460 A a	0,701 B g	0,700 B f	0,467 C f	0,467 C f
Média geral	1,460	1,086	0,918	0,884	0,884

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,005

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,004

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 16. Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melão a 33°C.

igual à sangria de 10% (v/v) e superior às de 15% e 20% (v/v). Nos demais ciclos, o número de células para sangria de 5% (v/v) foi estatisticamente superior ao das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) as quais não diferiram entre si.

O comportamento dos tratamentos ciclo a ciclo foi mostrado pelas equações de regressão e pelas respectivas curvas apresentadas na Figura 16. O número de células da testemunha manteve-se constante durante os 7 ciclos. Para os demais tratamentos, o número de células decresceu significativamente a partir do ciclo 1 (Tabela 28). A diferença entre o número de células para sangrias de 10% (v/v) e 15% e 20% (v/v) foi significativa somente no ciclo 7. Portanto, como verificado no Experimento 3, a sangria igual ou maior a 5% (v/v) provocou um decréscimo estatisticamente significativo no número de células do processo.

4.4.4. MATÉRIA SECA

O teor de matéria seca (g/100 ml) presente no tubo de fermentação após cada ciclo, encontra-se nas Tabelas 42 e 43.

Segundo a análise de variância mostrada na Tabela 64 (Apêndice) ocorreu uma influência significativa dos ciclos sobre os tratamentos ao nível de 1% pelo teste F.

As médias de matéria seca, comparadas ciclo a ciclo pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, apresentadas na Tabela 29, permitiram constatar que a testemunha

TABELA 29. Comparações das médias do teor de matéria seca (g/100 ml) para diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	3,7337 A d	3,4715 B c	3,3092 BCab	3,0969 CD a	2,8847 D a
2	3,7712 A d	3,3467 B c	3,0096 C c	2,6850 D bc	2,3103 E b
3	3,9460 A d	3,4216 B c	3,0845 C bc	2,8098 D abc	2,4227 E b
4	4,4080 A c	3,7712 B b	3,3217 C ab	2,9721 D ab	2,5476 E b
5	4,8075 A b	4,0709 B a	3,4091 C a	2,9596 D ab	2,4102 E b
6	4,7576 A b	2,9210 B ab	3,4341 C a	2,6850 D bc	2,4227 E b
7	5,1821 A a	4,0459 B ab	3,3342 C ab	2,5851 D c	2,0109 E c
Média geral	4,3723	3,7212	3,2718	2,8276	2,4299

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,2581

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,2941

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos.

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 17. Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melão a 33°C.

foi estatisticamente superior aos demais tratamentos durante os 7 ciclos fermentativos.

Entre as sangrias verificou-se que o teor de matéria seca decresceu com o aumento do nível de sangria.

Analisando-se a Tabela 29 e a Figura 17 verificou-se que entre os ciclos a testemunha apresentou um acrêscimo na matéria seca, estatisticamente significativo a partir do ciclo 3. As sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) apresentaram uma variação irregular, ou seja, o teor de matéria seca decresceu em um ciclo e se se recuperou logo no ciclo posterior. As curvas apresentadas na Figura 17 evidenciaram que com melaço o teor de matéria seca não decresceu nos ciclos sucessivos como nos Experimentos 2 e 3, devido a maior quantidade de sais e outros componentes para a multiplicação da levedura. Na Figura 17 estão apresentadas as curvas que mostram o comportamento do teor de matéria seca durante os 7 ciclos fermentativos por análise de regressão até o 3º grau.

4.4.5. RENDIMENTO DE FERMENTAÇÃO

Nas Tabelas 42 e 43 (Apêndice) encontram-se os valores de rendimento da fermentação (%) em cada ciclo.

A análise de variância (Tabela 65 - Apêndice) evidenciou que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F. Devido ao mesmo comportamento ciclo a ciclo para todos os tratamentos, foram comparadas somente as médias gerais para cada um deles (Tabela 30).

TABELA 30. Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para diferentes níveis de sangria com levedura tipo Fleischmann prensada em mosto de melão a 33°C (Experimento 4).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	92,05	92,05	92,05	90,94	90,71
2	91,16	90,72	88,94	88,50	88,50
3	91,41	90,73	89,38	88,71	88,71
4	91,16	89,61	88,49	87,07	86,81
5	90,27	88,49	88,05	87,33	87,61
6	90,27	88,71	88,71	88,49	88,49
7	89,83	89,38	89,16	88,94	88,49
Média geral	90,88 A	89,96 B	89,26 C	88,64 D	88,48 D

DMS 5% para médias dos Tratamentos: 0,39

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

As comparações, obtidas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, permitiram constatar que o rendimento relativo à testemunha (90,88%) foi estatisticamente superior ao das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) os quais foram respectivamente iguais a 89,96%, 89,26%, 88,64% e 88,48%.

Comparando-se os níveis de sangria entre si verificou-se que, estatisticamente, o rendimento com sangria de 5% (v/v) foi superior ao da sangria de 10% (v/v) que por sua vez foi maior que o das sangrias de 15% e 20% (v/v) os quais não diferiram entre si.

Neste experimento, os tempos de fermentação foram constantes e iguais a 20 horas em todos os ciclos, independente do nível de sangria (Tabelas 42 e 43 - Apêndice), fato este que corroborou com as observações feitas para a recuperação da massa celular (item 4.4.4).

Na Figura 18 encontram-se as equações de regressão às quais os dados melhor se ajustaram, e suas respectivas curvas, demonstrando o comportamento do rendimento alcoólico nos diferentes tratamentos. A testemunha apresentou um decréscimo muito pouco acentuado no rendimento durante os 7 ciclos fermentativos. Com as sangrias de 5% a 20% (v/v) observou-se que o rendimento decresceu até o ciclo 5 com uma tendência a recuperar-se nos ciclos 6 e 7. Ciclos posteriores ao ciclo 7 provavelmente mostrariam mais claramente o comportamento do rendimento neste experimento.

FIGURA 18. Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para levedura tipo Fleischmann em mosto de melão a 33°C.

As porcentagens de AR no vinho (Tabelas 42 e 43 - Apêndice) indicaram que o açúcar foi quase que totalmente consumido em todos os ciclos para todos os tratamentos.

A carga bacteriana (bastonetes/ml), embora sem comparações estatísticas, não mostrou diferenças acentuadas entre os níveis de sangria e a testemunha (Tabelas 42 e 43 - Apêndice).

Em resumo, a sangria de células provocou aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular, aumento no brotamento, redução significativa no número de células/ml e no teor de matéria seca, bem como uma queda estatisticamente significativa no rendimento da fermentação.

As variações neste experimento foram pouco acentuadas devido provavelmente ao efeito "protetor" do mosto de melaço. Consequentemente, uma sangria de 5% (v/v) foi o suficiente para reduzir significativamente o rendimento da fermentação em relação à testemunha. Este resultado foi concordante com o obtido no Experimento 2, o qual foi conduzido em mosto de xarope, porém, à temperatura mais baixa e igual a 30°C.

4.5. EFEITO DA SANGRIA DE LEVEDURA SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, DURANTE 7 CICLOS, CONDUZIDA COM A LINHAGEM M-300-A (*S. cerevisiae*) EM MOSTO DE XAROPE A 33°C (EXPERIMENTO 5)

4.5.1. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular (%) em cada ciclo, referente aos diferentes níveis de sangria, encontra-se nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

De acordo com a Tabela 66 (Apêndice), a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F, indicando o mesmo comportamento, ciclo a ciclo, para todos os tratamentos. Em razão deste resultado foram comparadas somente as médias gerais (Tabela 31) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A comparação entre as médias gerais evidenciou que, a viabilidade celular da testemunha e das sangrias de 5%, 10% e 20% (v/v) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si e foram respectivamente iguais a 73,15%, 72,50%, 72,13% e 72,55%. A viabilidade celular da sangria de 15% (v/v) foi estatisticamente menor em relação a da testemunha e igual a 71,84%.

As sangrias de 5% a 20% (v/v) apresentaram viabilidades celulares que não diferiram estatisticamente entre si.

TABELA 31. Comparações das médias de viabilidade celular (%) para diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	83,13	83,01	83,13	82,70	82,35
2	76,80	76,37	76,66	77,28	77,80
3	78,38	78,56	78,16	78,51	78,80
4	74,03	72,33	71,41	70,67	72,81
5	72,02	71,38	71,56	70,75	71,70
6	63,45	62,94	61,91	61,30	62,78
7	64,26	62,89	62,05	61,70	61,64
Média geral	73,15 A	72,50 AB	72,13 AB	71,84 B	72,55 AB

DMS 5% para médias dos Tratamentos: 1,16

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

TABELA 19. Viabilidade celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

O comportamento da viabilidade celular, ciclo a ciclo, nos tratamentos encontra-se representado na Figura 19. A viabilidade celular decresceu linearmente com os ciclos para todos os tratamentos.

Verificou-se neste experimento, ao contrário do Experimento 3, que mesmo uma sangria de 20% (v/v) não produziu um efeito significativo sobre a viabilidade celular, provavelmente devido ao menor poder de multiplicação da linhagem de M-300-A, em relação à levedura tipo Fleischmann.

4.5.2. BROTAMENTO CELULAR

Os dados experimentais de brotamento (%) obtidos nos ciclos fermentativos encontram-se nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

A análise de variância dos dados, transformados em $\arcsin \sqrt{y/100}$ para normalização, indicou que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F (Tabela 67 - Apêndice) o que indicou que os ciclos influenciaram igualmente todos os tratamentos. Deste modo comparou-se estatisticamente, através do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, apenas as médias gerais de cada tratamento (Tabela 32).

A comparação das médias permitiu constatar que a testemunha e as sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre si e foram respectivamente iguais a 6,64%, 6,90%, 7,18%, 7,04% e 6,60%.

TABELA 32. Comparações das médias de brotamento celular (%) para diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	3,61	3,46	3,44	3,44	3,52
2	3,69	3,84	3,94	3,96	3,42
3	4,01	4,03	4,36	4,13	4,53
4	4,64	5,40	5,67	5,64	4,84
5	5,33	5,51	5,53	5,59	5,36
6	12,86	13,31	13,88	13,95	11,91
7	12,37	12,76	13,47	12,59	12,65
Média geral	6,64 A	6,90 A	7,18 A	7,04 A	6,60 A

DMS 5% para médias dos Tratamentos transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$: 0,01.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 20. Brotamento celular (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

O brotamento celular aumentou com os ciclos em todos os tratamentos obedecendo equações de regressão do 2º grau, conforme mostrado na Figura 20. Verificou-se que o brotamento celular foi da ordem de 3,0% já no ciclo 1 (Tabela 32), devido à sua multiplicação em laboratório (ver Experimento 1). Entretanto, o brotamento foi intensamente estimulado apenas nos dois últimos ciclos independente do nível de sangria. No Experimento 3, a porcentagem de células em brotamento (Tabela 22) da levedura tipo Fleischmann aumentou primeiro e mais acentuadamente que a levedura tipo M-300-A neste experimento. ZAGO (1982) em ensaios de multiplicação, verificou que a linhagem M-300-A apresentou menor porcentagem de brotamento que a levedura tipo Fleischmann, comportamento este concordante com o obtido neste trabalho.

4.5.3. NÚMERO DE CÉLULAS

O número de células (células/mililitro) em cada ciclo, para os diferentes níveis de sangria, encontra-se nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

A interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F, de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 68 (Apêndice) o que determinou as comparações das médias gerais (Tabela 33).

As médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, evidenciaram que o número de células médio da testemunha ($1,406 \times 10^9$ células/ml) foi

TABELA 33. Comparações das médias de número de células (células/mililitro $\times 10^9$) para diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	1,425	1,397	1,405	1,398	1,405
2	1,418	1,398	1,280	1,270	1,275
3	1,413	1,388	1,152	1,148	1,155
4	1,405	1,260	1,030	1,022	1,033
5	1,400	1,023	0,908	0,901	0,910
6	1,395	1,015	0,897	0,893	0,890
7	1,390	1,006	0,880	0,871	0,867
Média geral	1,406 A	1,212 B	1,079 B	1,072 B	1,077 B
DMS 5% para médias dos Tratamentos: 0,143					

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 21. Número de células (células/mililitro) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

estatisticamente superior ao das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v), e respectivamente iguais a 1,212, 1,079, 1,072 e $1,077 \times 10^9$ células/ml.

Estatisticamente, as diferenças do número de células relativo aos diferentes níveis de sangria não foram significativas.

O comportamento do número de células, ciclo a ciclo, em cada tratamento está representado pelas equações de regressão do 1º grau mostradas na Figura 21. O número de células relativo à testemunha apresentou um pequeno decréscimo no decorrer dos ciclos fermentativos conforme mostrado na Tabela 30.

Com a aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria verificou-se um decréscimo linear do número de células com os ciclos (Figura 21).

4.5.4. MATÉRIA SECA

A matéria seca (g/100 ml) presente no tubo de fermentação após cada ciclo encontra-se nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

A interação "Tratamentos x Ciclos" mostrou-se significativa ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F, de acordo com a análise de variância mostrada na Tabela 69 (Apêndice), indicando que os ciclos influenciaram significativamente o comportamento dos diferentes tratamentos. Desse modo, o teor de matéria seca foi comparado, mediante utili-

zação do teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, em todos os ciclos (Tabela 34).

A análise da Tabela 34 mostrou que o teor de matéria seca da testemunha foi estatisticamente superior ao das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) durante os 7 ciclos fermentativos.

A comparação entre as sangrias permitiu constatar que a matéria seca decresceu significativamente com o aumento do nível de sangria em todos os ciclos.

Na Figura 22 encontram-se representadas as variações, ciclo a ciclo, do teor de matéria seca para todos os tratamentos. A testemunha mostrou um aumento estatisticamente significativo a partir do ciclo 2 (Tabela 34), evidenciando uma multiplicação celular entre os ciclos. Este resultado foi discordante do obtido em 4.5.3 onde observou-se um ligeiro decréscimo no número de células. Considerações sobre essas variações, obtidas também nos demais experimentos, encontram-se no item 4.2.4 (Experimento 2).

A matéria seca resultante da sangria de 5% (v/v) decresceu significativamente até o ciclo 5 e mostrou certa tendência à recuperação nos ciclos 6 e 7 (Tabela 34; Figura 22). Para sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) o teor de matéria seca decresceu com os ciclos.

TABELA 34. Comparações das médias do teor de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C (Experimento 5).

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	4,5838 A bcd	4,3413 B a	4,1268 C a	3,8560 D a	3,5420 E a
2	4,2125 A e	3,8702 B bc	3,4560 C b	3,0850 D b	2,6575 E b
3	4,4267 A d	3,9273 B b	3,3848 C b	2,9430 D b	2,4433 E c
4	4,5410 A cd	3,8275 B bc	3,1710 C c	2,6718 D c	2,1725 E d
5	4,6123 A bc	3,7278 B c	3,0428 C c	2,4575 D d	1,8868 E ef
6	4,7405 A b	3,8560 B bc	3,0253 C c	2,3720 D de	1,9725 E e
7	5,1128 A a	3,7990 B bc	2,8218 C d	2,2580 D e	1,7582 E f
Média geral	4,6042	3,9070	3,2898	2,8062	2,3475

DMS 5% para Tratamentos dentro de Ciclos: 0,1695

DMS 5% para Ciclos dentro de Tratamentos: 0,1674

Letras maiúsculas determinam comparações Tratamentos dentro de Ciclos

Letras minúsculas determinam comparações Ciclos dentro de Tratamentos.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

FIGURA 22. Matéria seca (g/100 ml) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

4.5.5. RENDIMENTO DE FERMENTAÇÃO

O rendimento de fermentação (%) em cada ciclo encontra-se nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice).

A análise de variância, mostrada na Tabela 70 (Apêndice) mostrou que a interação "Tratamentos x Ciclos" não foi significativa pelo teste F. Como os ciclos influenciaram igualmente o comportamento do rendimento em qualquer dos tratamentos comparou-se somente as médias gerais desses tratamentos (Tabela 35).

As médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, evidenciaram que a não retirada de células (testemunha) resultou na maior porcentagem de rendimento relativamente à aplicação de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de sangria. Os valores médios de rendimento foram respectivamente iguais a 85,40%, 84,78%, 84,60%, 84,14% e 84,00%.

Estatisticamente, o rendimento de fermentação para sangrias de 5% e 10%, 10% e 15%, 15% e 20% (v/v) não diferiram significativamente entre si. A sangria de 5% (v/v) foi estatisticamente superior às sangrias de 15% e 20% (v/v) e a sangria de 10% (v/v) superior à sangria de 20% (v/v). Este resultado foi discordante do obtido com a levedura tipo Fleischmann (Experimento 3) onde verificou-se que 5% (v/v) de sangria pode ser aplicada sem diminuir significativamente o rendimento. Por outro lado, as comparações dos rendimentos entre testemunha e os níveis de sangria foram semelhantes aos apresentados pela levedura tipo Fleischmann, em mosto de xaró

TABELA 35. Comparações das médias de rendimento de fermentação (%) para diferentes níveis de sangria com a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

Ciclos	Nível de sangria (v/v)				
	Test.	5%	10%	15%	20%
1	87,85	86,92	86,71	86,28	85,61
2	86,32	85,62	85,41	84,09	84,06
3	86,67	85,57	84,94	84,55	84,06
4	85,14	84,26	84,02	83,61	83,61
5	84,01	83,55	83,55	83,58	84,05
6	83,32	83,30	83,30	83,07	83,07
7	84,48	84,28	84,25	83,80	83,55
Média geral	85,40 A	84,78 B	84,60 BC	84,14 CD	84,00 D

DMS 5% para médias dos Tratamentos: 0,59

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

pe a 30°C (Experimento 2) e em mosto de melaço a 33°C (Experimento 4) provavelmente devido ao fato da levedura M-300-A ser uma linhagem selecionada para altas temperaturas e por isso mais resistente ao seu efeito, o que não foi verificado para Fleischmann em mosto de xarope a 33°C (Experimento 3).

Nas Tabelas 44 e 45 (Apêndice) encontram-se os tempos de fermentação em cada ciclo. Até o ciclo 4 o tempo de fermentação variou de 21 a 22 horas para todos os tratamentos. Do ciclo 5 ao ciclo 7, os tempos de fermentação da testemunha e das sangrias de 5% e 10% (v/v) mantiveram-se iguais a 22 horas e os das sangrias de 15% e 20% (v/v) variaram de 23 horas a 43 horas.

Com a utilização das análises de regressão até o 3º grau foram obtidas as curvas que melhor mostraram o comportamento do rendimento ciclo a ciclo nos diferentes tratamentos (Figura 23). Os rendimentos da testemunha e da sangria de 20% (v/v) decresceram linearmente com os ciclos. Para 5%, 10% e 15% (v/v) de sangria os rendimentos decresceram segundo equações de regressão do 2º grau, com os rendimentos mostrando uma tendência à recuperação no último ciclo.

De acordo com as Tabelas 44 e 45 (Apêndice) os teores de AR foram baixos, indicando um consumo de açúcar quase que total e não diferiram acentuadamente entre os tratamentos. Embora sem comparações estatísticas, observou-se que a população de bactérias (bastonetes/ml) foi maior em alguns ciclos, chegando a atingir $1,30 \times 10^6$ bastonetes/ml para uma po

FIGURA 23. Rendimento de fermentação (%) em função dos diferentes níveis de sangria de células para a linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.

pulação de levedura igual a $1,40 \times 10^9$ células/ml (Tabelas 44 e 45 - Apêndice).

Em uma análise geral verificou-se que a viabilidade celular da testemunha e das sangrias de 5%, 10% e 20% (v/v) foram estatisticamente iguais, o brotamento celular da testemunha e demais níveis de sangria também não diferiram estatisticamente entre si, o número de células e a matéria seca da testemunha foram estatisticamente superiores, e o rendimento da fermentação foi significativamente diminuído com a aplicação de sangrias de 5% a 20% (v/v) para a linhagem M-300-A, em mosto de xarope a 33°C.

Frente aos resultados obtidos faz-se necessário dar continuidade ao presente trabalho afim de determinar se níveis de sangria entre 0 e 5% (v/v) interferem no rendimento da fermentação alcoólica, bem como estudar o efeito destes níveis em condições microaerófilas e durante maior número de ciclos.

Uma redução de 0,5% no rendimento da fermentação nas condições deste trabalho representará uma perda de 2500 litros de álcool para uma destilaria que produz 500.000 litros de álcool por dia.

Portanto, quanto maior o volume de álcool produzido, maior será a perda, o que justifica a continuação desta pesquisa.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos em escala de laboratório permitiram concluir que a aplicação de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de sangria produziu os seguintes principais efeitos:

- 5.1. No experimento conduzido com mosto de xarope a 30°C, a aplicação de 5% (v/v) de sangria provocou um aumento estatisticamente significativo na viabilidade das células da levedura de panificação tipo Fleischmann no ciclo 7. Com as sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v) esse efeito ocorreu nos ciclos 5, 6 e 7. À temperatura de 33°C, a viabilidade celular foi significativamente maior apenas para as sangrias de 15% e 20% (v/v).
- 5.2. Em mosto de melaço, à temperatura de 33°C, a viabilidade celular da levedura tipo Fleischmann foi significativamente maior para todos os níveis de sangria aplicados.
- 5.3. A linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*), ao contrário da levedura tipo Fleischmann, não apresentou variações

significativas em sua viabilidade com a aplicação dos diferentes níveis de sangria, no experimento realizado com mosto de xarope à temperatura de 33°C.

- 5.4. A aplicação de 5% a 20% (v/v) de sangria aumentos significativamente o brotamento celular da levedura tipo Fleischmann em fermentações conduzidas com mostos de xarope e de melão, às temperaturas de 30°C e 33°C.
- 5.5. Os níveis de sangria testados não causaram qualquer efeito significativo no brotamento celular da linhagem M-300-A (*S. cerevisiae*) em mosto de xarope a 33°C.
- 5.6. O número de células e o teor de matéria seca foram significativamente reduzidos em função das sangrias de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) nos experimentos conduzidos com a levedura tipo Fleischmann em mostos de xarope e melão, a 30°C e 33°C e com a linhagem M-300-A em mosto de xarope a 33°C.
- 5.7. O rendimento da fermentação alcoólica sofreu uma redução estatisticamente significativa com a aplicação de 5%, 10%, 15% e 20% (v/v) de sangria no experimento conduzido com a levedura tipo Fleischmann tanto em mosto de xarope a 30°C como em mosto de melão a 33°C e para M-300-A em mosto de xarope a 33°C.
- 5.8. As fermentações conduzidas com a levedura tipo Fleischmann em mosto de xarope a 33°C mostraram um rendi-

mento significativamente menor em função das sangrias de 10%, 15% e 20% (v/v). Entretanto, a aplicação de 5% (v/v) de sangria, não reduziu significativamente o rendimento da fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, 10: 845-64, 1968.
- ALMEIDA, J.R. Curso sobre Fermentação Alcoólica, Piracicaba, Instituto Zimotécnico, ESALQ, 1960. v.2. p.254-60.
- AMORIM, H.V. & MATTOS, W.R.S. Novas matérias primas. Os subprodutos da agroindústria. O Proálcool e a produção de levedura e vinhaça. Perspectivas do momento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA INDÚSTRIA DE RAÇÃO, 1., São Paulo, 1982. Anais. São Paulo, ANFAR, 1982. p.191-203.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; ZAGO, E.A. Fermentação descontínua: otimização do processo de Melle-Boinot. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, "JAYME ROCHA DE ALMEIDA", 4., Piracicaba, 1985. Anais. Piracicaba, ESALQ/STAB, 1985. p. 114-21.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica e aparelhos de destilação. Piracicaba, ESALQ - FERMENTEC, 1986. 71p.

- BERGAMASCHINE, A.F. Efeito do tratamento físico, físico-químico e do tempo de armazenamento na composição da fração nitrogenada da levedura líquida de destilaria (*Saccharomyces cerevisiae*). Piracicaba, 1985. 77p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BERTO, D.A. Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces* spp.) na alimentação de leitões em recria. Piracicaba, 1985. 133p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BHATTACHARJEE, J.K. Microorganisms as potential sources of food. Advances in Applied Microbiology, New York, 13: 139-61, 1970.
- BOUCOURT, R. Protein supplementation with yeasts in live or dead forms in final molasses diets for growing - finishing pigs. 1. Effect on fermentative indices. Nutrition Abstracts and Reviews. Aberdeenshire, 50: 590, 1980.
- BOWMAN, G.L. & VEUM, T.L. *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture in growing finishing swine diets. Journal of Animal Science, Albany, 37(1): 72-4, 1973.
- BRAUDE, R. Dried yeast as fodder for livestock. Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 39: 206-17, 1942.
- BRITO, R. Em cinco empresas, uma síntese da região. Revista do Alcool, São Paulo, 4(28): 20-9, 1985.
- CAMPOS, J. Tabelas para cálculos de rações. 2. ed., Viçosa, UFV, Imprensa Universitária, 1981. 64p.

- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W.M. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition fermentative ability and alcohol production. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 48(3): 639-46, 1984.
- CATANI, R.A. & JACINTHO, A.O. Avaliação da fertilidade do solo. Métodos de análises. Piracicaba, Livroceres, 1974. 61p.
- COZZOLINO, S.M.F. Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*. Estudo de gerações sucessivas de ratos. São Paulo, 1982. 133p. (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas).
- D'ARCE, R.D. & MACHADO, P.F. Resíduos agroindustriais da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. In: D'Arce, R. D.; Boin, C.; Mattos, W.R.S. Coord. Utilização de resíduos agroindustriais da cana-de-açúcar na alimentação de ruminantes. Piracicaba, FEALQ, 1985. p.1-17.
- DESMONTS, R. Tecnologia da produção dos fermentos secos de destilaria. Boletim Informativo da APM, Piracicaba, 8: 1-11, 1966.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. Pediatria Prática, São Paulo, 39: 7-18, 1968.
- EDDY, A.A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A.H., ed. The chemistry and biology of yeasts. New York, Academic Press, 1958. Cap. 5, p.157-240.
- EM DEZ anos, o proálcool conquistou seu lugar na economia brasileira. Revista do Alcool, São Paulo, 4(32): 4-19, 1985.
- GAMBIRÁSIO, A. Fermentos auxiliam indústria. Química & Derivados, São Paulo, 2(16): 43-6, 1967.

GERMEK, H.A. Uso de dornas fechadas com recuperação de álcool e produção de proteína. Álcool & Açúcar, São Paulo, 5(27): 48-1, 1986.

GERMEK, H.A. & KATZ, G.M. Produção de levedura seca para utilização na composição de ração animal. Boletim Informativo Conger, São Paulo, p.23-8, s.d.

GILLILAND, R.B. Yeast reproduction during fermentation. Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 68: 271 - 75, 1962.

GILLILAND, R.B. Brewing yeast. In: POLLOCK, J.R.A., ed. Brewing Science. London, Academic Press, 1981. v.2, cap. 1, p.1-60.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 11. ed. Piracicaba, Nobel, 1985. 466p.

GRACHEVA, I.M. & GAVRILOVA, N.N. Effect of the number of inoculated yeast cells, *Saccharomyces carlsbergensis* XI, and the number of generations on the accumulation of yeast biomass and the production of higher alcohols. Mikrobiologiya, 41: 287-91, 1972. Apud Microbiology Abstracts, London, 7(9): 9, 1972. (Resumo)

GRACHYOVA, I.M. & NISMAN, L.I. Relation of the formation of higher alcohols by brewers' yeast and the fermentation temperature and concentration of dry substances in the must. Prikl. Biokhim. Mikrobiologiya, 7: 526-32, 1971. Apud Microbiology Abstracts, London, 7(2): 19, 1972. (Resumo).

HARRISON, J.S. Yeast production. Progress in Industrial Microbiology, London, 10: 129-77, 1971.

HEYMANS, J.A. Nutritive value of yeast. Brass. Malt. Belg., p.283-90, 1952. Apud Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 58: 379-80, 1952 (Resumo).

HORII, J. Condução de processos fermentativos. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ALCOOL, 1., Piracicaba, 1980. Anais. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1980. p.37-1.

HOUGH, J.S. Efficiency of fermentation of yeast. Proc. Eur. Brew. Conv., Viena, 1961. Apud Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 68: 364-65, 1962. (Resumo)

HSU, W. Protein from sugar in Taiwan. Sugar y Azucar, New York, 56: 33-6, 1961.

JACQUOT, R. Valor nutritivo das leveduras: sua utilização prática na alimentação humana. Boletim Informativo da APM, Piracicaba, 8(1): 1-13, 1943.

JARDIM, W.R. Alimentos e alimentação do gado bovino. São Paulo, Agronômica Ceres, 1976. 338p.

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

KELLNER, O. Dried yeast as fodder. Wochensch. Braw., 27: 409, 1910. Apud Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 16: 689, 1910 (Resumo).

KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 26: 427-85, 1972.

KRETZSCHMAR, H. Levaduras y alcoholes. Barcelona, Reverté, 1961. 602p.

LIMA, G.J.M.M. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação. Piracicaba, 1983. 139p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

LIPINSKY, E.S. & LITCHFIELD, J.H. Single cell protein in perspective. Food Technology, Chicago, 28(5): 16-3, 1974.

MALIK, V.K. Development of technology for improvement in energy balance in production of ethil alcohol from sugarcane molasses. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ALCOHOL FUELS TECHNOLOGY, 1., Guarujá, 1980. Proceedings, São Paulo, IPT, 1980. p.119-22.

MALLETTE, M.F. Evaluation of growth by physical and chemical means. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W., ed. Methods in microbiology. London, Academic Press, 1969. v.1., p.542.

MARIATH, J.G.R. & ZUCAS, S.M. Valor nutricional da proteína isolada do resíduo de cerveja. Alimentação - ABIA, São Paulo, 65: 25-35, 1983.

MARILLER, C. Distillerie agricole et industrielli. Paris, Nouvelle Encyclopédie Agricole, 1951. 632p.

MATTOZ, W.R.S.; D'ARCE, R.D.; MACHADO, P.F.; MARCOS, A.C.M. Avaliação da qualidade da proteína de levedura seca (*Saccharomyces* sp.). In: REUNIÃO ANUAL DA S.B.Z., 20., Pelotas, 1983. Anais. Pelotas, S.B.Z., 1983. p.119.

MENTEN, J.F.M.; LIMA, G.J.M.M.; PACKER, I.U.; MIYADA, V.S.; LAVORENTI, A. Níveis de uréia e ácido úrico no sangue de porcas alimentadas com rações contendo levedura seca. In: REUNIÃO ANUAL DA S.B.Z., 21., Belo Horizonte, 1984. Anais. Belo Horizonte, S.B.Z.; 1984. p.204.

MIYADA, V.S. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1978. 106p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MOURA, E.C.V. & ZUCAS, S.M. Single cell protein from *Saccharomyces* sp, nutritive value and some biochemical parameters in rat feeding. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON YEAST, 5., and INTERNATIONAL FERMENTATION SYMPOSIUM, 5., 1980. Proceedings, Canadá, 1980.

NAGODAWITHANA, T.W. & STEINKRAUS, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". Applied and Environmental Microbiology, Washington, 31(2): 158 - 62, 1976.

NAUMAN, R.V.; WEST, P.W. & TRON, F. A spectrophotometric study of Schiff reaction as applied to the quantitative determination of sulfur dioxide. Analytical Chemistry, Washington, 32(10): 1307-11, 1960.

NEVES, L.B. Technologia da fabricação do álcool. São Paulo, Revista Brasileira de Química, 1938. 314p.

OS DEZ anos do Proálcool. Química & Derivados, São Paulo, 21(229): 14-4, 1985.

- OURA, E. Energetics of yeast growth under different intensities of aeration. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ADVANCES IN MICROBIAL ENGINEERING, 1., Mariánské, Lázně, 1972. Proceedings. New York, Biotechnology and Bioengineering Symposium, 1973. 4; 117-127.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentation. Process Biochemistry, London, 12(3): 19-35, 1977.
- PEIXOTO, A.M. & MATTOS, W.R.S. Observações sobre o valor alimentar do lodo residual das dornas de fermentação alcoólica em usinas de açúcar. O Solo, Piracicaba, 64: 33-9, 1972..
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. v.1.
- PEPPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. The yeasts. London, Academic Press, 1970. Cap. 8., p.421-57.
- PIERCE, J.S. Institute of Brewing: analysis committee measurement of yeast viability. Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 76(5): 442-43, 1970.
- PINNOTI, R.F. Ração: um novo subproduto da cana. Meios & Métodos. Micronal, São Paulo, 6(39): 10-2, 1983.
- PINNOTI, R.F. Aproveitamento da levedura de fermentação alcoólica para rações. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 3., e CONVENÇÃO DA ACTALAC, 5., São Paulo, 1984. Anais. São Paulo, STAB, 1984. p.461-65.

- SALES, A.M.; MENEZES, T.J.B.; OKADA, M.; ARAKAKI, T.; LAMO, P.R. Produção e avaliação nutricional de biomassa protéica de levedura em melaço. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, 8: 443-55, 1977.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análise química em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
- SCHACKLADY, C.A.; WALKER, T.; GATUMEL, E. Leveduras cultivadas sobre alcanos. Seguridad de empleo y utilization en alimentacion animal. Zootechinia, Madrid, 22: 31-42, 1973.
- SCRIMSHAW, N.S. Single-cell protein for human consumption-an overview. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. Single-cell protein II. Massachusetts, M.I.T. Press, 1975. p.24-5.
- SEARLE, B.A. & KIRSOP, B.H. Sugar utilization by a brewing yeast in relation to the growth and maintenance phases of metabolism. Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 85: 342-45, 1979.
- STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. Biotechnology Letters, Manchester, 5(2): 135-40, 1983.
- STUPIELLO, J.P. & HORII, J. Fundo de dorna de fermentação: um fator de eficiência industrial. STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba, 1(1): 34-6, 1982.
- STYCZŃSKI, H. Effect of feeding live yeast on rumen volatile fatty acid levels and milk fat content in cows. Acta Agr. Silvest., Ser. Zotech., 6(2): 55-97, 1966. Apud Dairy Science Abstract, Shinfield, 31(6): 341, 1969. (Resumo).

- SUBRAHMANYAN, V.; SUR, G.; SWAMINATHAN. Food yeast. Journal of the Institute of Brewing, Cambridge, 61: 343-44, 1955.
- TAVARES, F.C.A. Genetic engineering for ethanol production. In: GENETIC ENGINEERING FOR BIOTECHNOLOGY, 1., Piracicaba, 1981. Proceedings. Piracicaba, PROMOCET-ESALQ, 1981. p.3-6.
- TOMLINSON, J.E.; MCGEE, W.H.; FUQUAY, J.W. Brewers condensed solubles and liquid brewers yeast as feedstuffs for lacting dairy cows. Journal of Dairy Science, 60: 144, 1977. Apud Dairy Science Abstract, Shinfield, 39(11): 705, 1977. (Resumo).
- TUSÉ, D. Single-cell protein: current status and future prospects. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Flórida, 19(4): 273-325, 1984.
- VANANUVAT, P. Value of yeast for poultry feeds. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Cleveland, 9 (4): 325-43, 1977.
- WASLEIN, C.I. Unusual sources of protein for man. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Cleveland, 6 (1): 77-151, 1975.
- WHITE, J. & MUNNS, D.J. Influence of temperature on yeast growth and fermentation. Journal of Institute of Brewing, Cambridge, 57: 280-4, 1951.
- ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

A P E N D I C E

TABELA 36. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann; prensada e previamente multiplicada. Mosto: xarope (Brix: 14,80%; ART: 15,30%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C (Experimento 1 - Bloco I).

Tipo de levedura	Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Cél. / ml x10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. /ml x 10 ⁵	Álcool(v/v)(%)		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
							Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	3,3966	1,57	97,27	0,46	1,60	7,14	0,054	90,57	3,73	0,093
Multiplicada	20%	3,3916	1,57	97,03	0,55	3,10	7,14	0,050	90,53	3,77	0,091
	Test.	3,3217	1,55	74,63	26,28	3,10	7,28	0,050	92,30	3,69	0,092
	20%	3,3966	1,55	73,15	30,73	4,70	7,28	0,054	92,33	3,70	0,092
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	4,0458	1,58	96,50	0,65	3,10	7,46	0,054	94,60	3,64	0,098
Multiplicada	20%	2,7723	1,31	95,46	0,72	3,10	7,28	0,054	92,33	3,65	0,096
	Test.	3,6713	1,55	69,56	32,46	4,70	7,34	0,054	93,09	3,81	0,096
	20%	2,9471	1,30	71,79	30,01	1,60	7,28	0,054	92,33	3,78	0,098
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	4,0458	1,58	94,84	0,50	1,60	7,28	0,054	92,33	3,75	0,099
Multiplicada	20%	2,1480	1,30	92,19	0,55	3,10	7,17	0,047	90,94	3,72	0,094
	Test.	3,7712	1,54	63,64	30,82	4,70	7,28	0,050	92,30	3,74	0,096
	20%	2,5975	1,29	65,38	33,65	3,10	7,10	0,054	90,12	3,54	0,096
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	3,6963	1,57	89,57	0,77	4,70	7,28	0,054	92,33	3,86	0,096
Multiplicada	20%	1,7984	1,04	90,67	1,23	6,30	7,17	0,050	90,97	3,73	0,095
	Test.	3,6463	1,54	58,43	30,25	6,30	7,28	0,054	92,33	3,66	0,095
	20%	1,9982	1,03	56,13	31,69	7,90	7,14	0,050	90,53	3,62	0,095

Cont.

TABELA 36. Continuação.

Tipo de levedura	Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Cél. / ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. /ml x 10 ⁵	Álcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
							Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 21h											
Prensada	Test. 20%	4,1707	1,56	86,69	0,84	3,10	7,52	0,054	95,36	3,80	0,096
Multiplicada	Test. 20%	1,8234	1,03	88,99	1,63	4,70	7,28	0,054	92,33	3,62	0,096
	Test. 20%	4,0210	1,53	54,78	25,66	7,90	7,46	0,054	94,60	3,61	0,096
	Test. 20%	1,8983	1,02	54,53	28,49	6,30	7,28	0,054	92,33	3,51	0,960
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 21h											
Prensada	Test. 20%	4,3206	1,57	82,46	0,88	-	7,28	0,054	92,33	3,87	0,098
Multiplicada	Test. 20%	1,4738	0,77	82,75	1,81	-	7,28	0,047	92,27	3,67	0,097
	Test. 20%	4,1957	1,52	50,34	24,08	-	7,21	0,050	92,30	3,67	0,096
	Test. 20%	1,7984	0,76	49,72	22,23	-	7,21	0,047	91,39	3,57	0,098
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 22h (Testemunha); 44h (20% sangria)											
Prensada	Test. 20%	4,3705	1,56	71,97	1,06	3,10	7,28	0,054	92,33	3,85	0,095
Multiplicada	Test. 20%	1,4987	0,77	68,78	1,65	3,10	7,28	0,047	92,27	3,66	0,095
	Test. 20%	4,2457	1,52	42,17	30,42	4,70	7,28	0,047	92,27	3,64	0,096
	Test. 20%	1,5487	0,76	38,72	32,30	3,10	7,28	0,050	92,30	3,64	0,096
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Testemunha); 44h (20% sangria)											
Prensada	Test. 20%	4,3705	1,55	62,83	2,35	-	7,28	0,047	92,27	3,93	0,091
Multiplicada	Test. 20%	1,3239	0,51	60,42	2,03	-	7,14	0,050	90,53	3,72	0,090
	Test. 20%	4,2956	1,51	39,53	30,16	-	7,14	0,047	90,50	3,61	0,092
	Test. 20%	1,3739	0,50	38,90	31,72	-	7,21	0,047	90,89	3,74	0,091

TABELA 37. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann; prensada e previamente multiplicada. Mosto: xarope (Brix: 14,80%; ART: 15,30%; pH: 3,60). Temperatura: 30°C (Experimento I - Bloco II).

Tipo de levedura	Nível de Matéria sangria (v/v)	Cél. / ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot... (%)	Baston. /ml x 10 ⁵	Alcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)	
						Vinho	Recup.				
Início - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	3,3841	1,57	98,32	0,33	-	6,74	0,050	85,55	3,60	0,069
Multiplicada	20%	3,4216	1,58	97,85	0,49	-	6,74	0,047	85,52	3,65	0,067
	Test.	3,2967	1,56	87,42	19,25	-	7,07	0,050	89,65	3,71	0,068
	20%	3,3467	1,56	86,87	17,58	-	7,07	0,050	89,65	3,75	0,069
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	3,9709	1,57	96,93	0,65	3,10	7,28	0,054	92,33	3,69	0,068
Multiplicada	20%	3,1469	1,31	97,15	0,64	4,70	7,28	0,054	92,33	3,73	0,067
	Test.	3,2967	1,56	81,61	17,57	1,60	7,28	0,054	92,33	3,85	0,069
	20%	2,4976	1,30	81,11	16,81	3,10	7,14	0,054	90,57	3,85	0,068
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	4,1458	1,56	96,26	0,59	4,70	7,10	0,054	90,12	3,68	0,067
Multiplicada	20%	2,5975	1,30	95,86	0,59	3,10	7,03	0,054	89,24	3,69	0,070
	Test.	3,4466	1,55	76,12	22,13	6,30	7,03	0,054	89,24	3,71	0,070
	20%	3,3228	1,29	75,46	24,28	6,30	6,89	0,054	87,47	3,58	0,070
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 20h											
Prensada	Test.	4,1957	1,56	91,37	0,56	4,70	7,21	0,054	91,45	3,81	0,070
Multiplicada	20%	2,2479	1,04	90,66	0,63	6,30	7,00	0,054	88,80	3,70	0,070
	Test.	3,6963	1,55	68,81	29,76	6,30	7,07	0,054	89,68	3,71	0,072
	20%	1,9483	1,03	67,01	32,86	7,90	6,93	0,054	87,92	3,61	0,071

Cont.

TABELA 37. Continuação.

Tipo de levedura	Nível de Matéria sangria (v/v)	Cél. / ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. /ml x 10 ⁵	Alcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 21h										
Prensada	Test. 20%	4,4454	1,56	87,82	0,68	4,70	7,21	0,054	91,45	3,82 0,071
Multiplicada	Test. 20%	2,0150	1,03	88,66	0,64	4,70	6,89	0,054	87,47	3,68 0,070
		3,7962	1,54	60,29	38,57	6,30	7,10	0,054	90,12	3,71 0,070
		1,7984	1,02	58,76	39,07	6,30	6,86	0,054	87,03	3,61 0,072
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 21h										
Prensada	Test. 20%	4,2706	1,56	79,53	0,68	-	7,28	0,054	92,33	3,91 0,073
Multiplicada	Test. 20%	1,5487	0,77	80,14	0,84	-	7,17	0,054	91,01	3,71 0,072
		4,0459	1,54	46,80	42,14	-	7,28	0,054	92,33	3,73 0,074
		1,5487	0,76	46,64	41,70	-	7,10	0,054	90,12	3,69 0,073
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 22h (Testemunha); 44h (20% sangria)										
Prensada	Test. 20%	4,3955	1,56	65,60	1,48	4,70	7,14	0,047	90,50	3,76 0,074
Multiplicada	Test. 20%	1,2990	0,77	59,97	1,43	4,70	6,93	0,040	87,79	3,67 0,076
		4,1208	1,53	40,30	56,96	6,30	7,00	0,047	88,74	3,59 0,074
		1,2241	0,76	40,12	51,78	6,30	6,89	0,040	87,35	3,62 0,075
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Testemunha); 44h (20% sangria)										
Prensada	Test. 20%	4,4454	1,56	59,17	1,78	-	7,14	0,050	90,53	3,88 0,078
Multiplicada	Test. 20%	1,1492	0,51	57,57	33,24	-	6,96	0,043	88,26	3,64 0,075
		4,1208	1,52	34,96	61,85	-	7,14	0,047	90,50	3,73 0,073
		1,2740	0,50	40,69	46,93	-	6,86	0,047	86,97	3,58 0,072

TABELA 38. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto: xarope (Brix: 14,90%; ARF: 15,00%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C (Experimento 2 - Bloco I).

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Alcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,4466	1,54	99,42	0,18	1,60	6,86	0,047	88,71	3,51	0,085
05%	3,4465	1,53	99,17	0,34	1,60	6,86	0,043	88,68	3,52	0,090
10%	3,4466	1,53	98,92	0,37	3,10	6,86	0,047	88,71	3,49	0,095
15%	3,4466	1,53	99,17	0,34	3,10	6,86	0,047	88,71	3,50	0,098
20%	3,4266	1,53	99,44	0,34	1,60	6,86	0,043	88,68	3,49	0,100
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,6213	1,54	98,13	0,28	3,10	7,21	0,054	93,28	3,46	0,081
05%	3,4466	1,53	97,72	0,41	3,10	7,21	0,047	93,22	3,44	0,082
10%	3,1469	1,27	97,95	0,41	1,60	7,14	0,047	92,31	3,43	0,082
15%	3,1219	1,27	97,87	0,35	3,10	7,10	0,050	91,89	3,47	0,081
20%	2,7473	1,27	97,59	0,38	1,60	7,14	0,054	92,38	3,48	0,082
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,7462	1,54	97,19	0,34	4,70	7,24	0,057	93,75	3,64	0,083
05%	3,3966	1,27	96,82	0,32	3,10	7,14	0,054	92,38	3,61	0,084
10%	3,0470	1,27	97,67	0,32	3,10	7,10	0,047	91,86	3,61	0,082
15%	2,7099	1,26	98,08	0,38	1,60	7,03	0,050	90,99	3,59	0,083
20%	2,3727	1,26	97,73	0,38	4,70	7,00	0,047	90,51	3,57	0,084
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,9460	1,54	93,84	0,55	1,60	7,28	0,054	94,18	3,75	0,084
05%	3,2218	1,27	94,05	0,59	1,60	7,24	0,054	93,73	3,72	0,080
10%	2,6974	1,01	94,86	0,45	4,70	7,21	0,054	93,28	3,68	0,081
15%	2,4477	1,01	94,67	0,53	3,10	7,03	0,054	91,03	3,64	0,080
20%	2,0232	1,01	95,45	0,71	3,10	7,07	0,054	91,48	3,61	0,082

Cont.

TABELA 38 - Continuação.

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,8211	1,54	85,09	0,65	-	7,28	0,054	94,18	3,74	0,081
05%	3,1968	1,26	85,97	1,34	-	7,24	0,054	93,73	3,74	0,082
10%	2,6475	1,00	91,12	2,26	-	7,21	0,050	93,25	3,69	0,080
15%	2,1480	1,00	87,35	9,12	-	7,14	0,047	92,31	3,62	0,080
20%	1,7235	1,00	85,79	7,19	-	7,07	0,047	91,41	3,47	0,081
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 2lh (Test. e 5% sangria); 22h (10, 15 e 20% sangria)										
Test.	3,9959	1,54	77,69	0,87	-	7,28	0,054	94,18	3,83	0,083
05%	3,2967	1,01	78,44	1,39	-	7,21	0,054	93,28	3,77	0,085
10%	2,5975	0,75	86,45	4,16	-	7,21	0,054	93,28	3,71	0,082
15%	1,9982	0,75	85,99	9,32	-	7,10	0,054	91,93	3,57	0,084
20%	1,5237	0,75	85,20	10,06	-	7,10	0,054	91,93	3,48	0,084
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 2lh (Test. e 5% sangria); 22h (10%); 28h (15%); 43h (20% sangria)										
Test.	3,9959	1,54	58,60	1,71	4,70	7,21	0,054	93,23	3,77	0,085
05%	3,1718	1,00	60,99	6,04	3,10	7,10	0,047	91,86	3,64	0,084
10%	2,4227	0,74	63,15	5,77	4,70	7,07	0,040	91,35	3,50	0,085
15%	1,9233	0,74	68,26	5,99	3,10	7,00	0,043	90,48	3,53	0,085
20%	1,5737	0,75	69,74	11,05	6,30	7,00	0,050	90,54	3,61	0,084
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. e 5% sangria); 28h (10 e 15% sangria); 43h (20% sangria)										
Test.	3,7457	1,54	44,67	4,31	3,10	7,21	0,050	93,22	3,68	0,085
05%	3,2468	0,75	57,11	6,53	3,10	7,14	0,040	92,25	3,53	0,085
10%	2,2729	0,74	60,18	2,99	4,70	7,00	0,043	90,48	3,69	0,085
15%	1,7984	0,49	59,90	8,21	4,70	7,00	0,040	90,45	3,62	0,086
20%	1,3739	0,49	74,28	7,68	6,30	7,00	0,036	90,42	3,55	0,086

TABELA 39. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto : xarope (Brix: 14,90%; AT: 15,00%; pH: 3,57). Temperatura: 30°C (Experimento 2 - Bloco II)

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,4965	1,55	98,11	0,22	3,10	6,86	0,047	88,71	3,48	0,086
05%	3,4465	1,54	98,44	0,28	3,10	6,86	0,047	88,71	3,47	0,082
10%	3,4965	1,55	98,69	0,34	1,60	6,86	0,043	88,68	3,47	0,085
15%	3,4465	1,54	99,14	0,31	1,60	6,86	0,047	88,71	3,46	0,085
20%	3,4715	1,54	98,78	0,22	3,10	6,86	0,047	88,71	3,45	0,085
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,7217	1,55	96,25	0,28	4,70	7,28	0,054	94,18	3,45	0,086
05%	3,4215	1,54	96,69	0,28	3,10	7,28	0,047	94,11	3,45	0,082
10%	3,2468	1,28	96,96	0,31	3,10	7,28	0,054	94,18	3,46	0,084
15%	2,9471	1,28	97,00	0,31	3,10	7,28	0,047	94,11	3,45	0,084
20%	2,7973	1,28	97,14	0,41	1,60	7,28	0,050	94,15	3,46	0,086
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,8711	1,55	88,61	0,38	4,70	7,21	0,050	93,25	3,63	0,085
05%	3,3966	1,28	90,47	0,40	3,10	7,17	0,050	92,80	3,63	0,085
10%	3,1219	1,28	90,72	0,34	3,10	7,17	0,054	92,80	3,63	0,085
15%	2,6974	1,28	92,78	0,36	1,60	7,14	0,050	92,34	3,62	0,085
20%	2,2479	1,27	94,79	0,35	1,60	7,10	0,050	91,91	3,60	0,085
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,7212	1,55	79,01	0,38	4,70	7,21	0,050	93,25	3,70	0,076
05%	3,2218	1,27	76,82	0,52	3,10	7,17	0,054	92,83	3,71	0,082
10%	2,6724	1,02	81,93	0,56	1,60	7,10	0,054	91,23	3,68	0,084
15%	2,3977	1,02	85,42	0,41	1,60	7,00	0,050	90,54	3,66	0,082
20%	1,9482	1,02	86,69	1,07	3,10	6,93	0,054	89,67	3,60	0,082

Cont.

TABELA 39. Continuação.

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	3,7212	1,55	77,43	0,49	-	7,40	0,054	95,72	3,93	0,096
05%	2,9971	1,26	74,80	0,54	-	7,28	0,054	94,18	3,86	0,096
10%	2,3727	1,01	75,39	0,74	-	7,24	0,054	93,73	3,81	0,095
15%	1,8483	1,02	80,95	8,45	-	7,21	0,050	93,25	3,77	0,096
20%	1,4238	1,01	81,36	13,33	-	7,21	0,054	93,28	3,67	0,096
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 21h (Test. e 5% sangria); 22h (10, 15 e 20% sangria)										
Test.	3,6763	1,55	64,51	0,52	-	7,17	0,054	92,83	3,81	0,084
05%	2,9970	1,01	60,22	1,13	-	7,07	0,047	91,41	3,75	0,083
10%	2,3478	0,76	69,76	23,71	-	7,10	0,047	91,86	3,70	0,085
15%	1,7984	0,76	79,50	15,92	-	7,03	0,047	90,96	3,57	0,085
20%	1,3739	0,75	79,71	13,83	-	7,07	0,047	91,41	3,55	0,083
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 21h (Test. e 5% sangria); 22h (10% sangria); 28h (15% sangria); 43h (20% sangria)										
Test.	4,0458	1,55	50,94	0,72	3,10	7,10	0,054	91,93	3,52	0,093
05%	3,2467	1,00	53,34	7,63	4,70	7,07	0,050	91,44	3,46	0,088
10%	2,4277	0,75	54,59	17,42	4,70	7,03	0,047	90,96	3,38	0,088
15%	1,7984	0,76	59,17	6,60	3,10	6,93	0,047	89,61	3,29	0,083
20%	1,4899	0,75	58,29	17,64	3,10	6,93	0,040	89,55	3,36	0,088
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. e 5% sangria); 28h (10 e 15% sangria); 43h (20% sangria)										
Test.	4,2456	1,55	44,31	2,48	6,30	7,14	0,054	92,38	3,48	0,081
05%	3,2967	0,75	51,53	20,39	4,70	7,00	0,054	90,58	3,36	0,081
10%	2,5475	0,75	50,11	7,76	4,70	7,00	0,047	90,51	3,28	0,083
15%	1,9482	0,50	50,50	28,07	3,10	7,00	0,047	90,51	3,38	0,083
20%	1,4363	0,50	60,25	16,65	9,40	6,96	0,050	90,06	3,28	0,083

TABELA 40. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto : xarope (Brix: 14,90%; ART: 15,40%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 3 - Bloco I)

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston.. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (°)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,1968	1,55	99,51	0,24	1,60	6,86	0,047	86,41	3,45	0,082
05%	3,1968	1,54	98,47	0,31	1,60	6,86	0,047	86,41	3,43	0,088
10%	3,1968	1,54	97,83	0,25	3,10	6,89	0,047	86,84	3,43	0,082
15%	3,1968	1,54	97,74	0,31	1,60	6,86	0,047	86,41	3,43	0,082
20%	3,1968	1,54	98,59	0,25	3,10	6,86	0,050	86,44	3,42	0,082
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,2967	1,55	98,36	0,28	1,60	7,24	0,057	91,32	3,53	0,082
05%	3,1469	1,54	97,36	0,25	1,60	7,24	0,054	91,29	3,51	0,078
10%	2,8972	1,28	96,93	0,25	3,10	7,24	0,054	91,29	3,52	0,079
15%	2,7474	1,28	98,10	0,25	1,60	7,17	0,057	90,44	3,44	0,081
20%	2,4726	1,28	96,99	0,41	3,10	7,17	0,060	90,47	3,48	0,081
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,1716	1,55	98,11	0,28	3,10	7,21	0,054	90,86	3,67	0,081
05%	3,0470	1,28	95,29	0,45	1,60	7,14	0,054	89,98	3,66	0,080
10%	2,6974	1,27	95,75	0,64	1,60	7,07	0,054	89,10	3,62	0,081
15%	2,4477	1,28	95,32	0,52	3,10	7,03	0,054	88,66	3,59	0,080
20%	2,1355	1,27	97,50	0,34	1,60	7,00	0,054	88,22	3,56	0,081
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,4216	1,55	89,14	0,41	3,10	7,21	0,054	90,86	3,70	0,074
05%	2,9721	1,27	90,84	0,34	1,60	7,14	0,054	89,98	3,69	0,074
10%	2,4477	1,01	93,03	0,33	3,10	7,07	0,054	89,10	3,63	0,074
15%	2,1480	1,02	93,98	0,46	1,60	6,96	0,054	87,78	3,56	0,074
20%	1,5987	1,02	95,23	1,73	4,70	6,89	0,054	86,91	3,53	0,074

Cont.

TABELA 40. Continuação

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,3217	1,55	76,60	0,43	3,10	7,28	0,054	91,73	3,79	0,076
05%	2,6724	1,26	78,17	0,55	3,10	7,17	0,054	90,42	3,72	0,075
10%	2,1230	1,01	81,18	0,61	1,60	7,07	0,054	89,10	3,66	0,074
15%	1,6985	1,01	85,02	0,77	3,10	7,07	0,054	89,10	3,60	0,074
20%	1,2989	1,01	85,80	6,78	4,70	7,00	0,054	88,22	3,52	0,074
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,5090	1,55	63,10	0,81	-	7,07	0,054	88,22	3,78	0,081
05%	2,6974	1,01	61,41	0,91	-	6,96	0,054	87,78	3,71	0,080
10%	2,0606	0,75	65,69	8,24	-	6,93	0,054	87,35	3,61	0,080
15%	1,6236	0,76	67,10	30,58	-	6,93	0,047	87,28	3,52	0,079
20%	1,2740	0,75	71,51	24,77	-	6,93	0,050	87,31	3,45	0,079
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 2lh (Test. e 5% sangria); 22h (10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)										
Test.	3,5465	1,55	54,28	1,00	-	7,07	0,054	89,10	3,76	0,082
05%	2,6974	1,00	53,25	23,03	-	6,93	0,054	87,35	3,67	0,082
10%	2,0481	0,75	54,37	27,61	-	6,93	0,054	87,35	3,64	0,080
15%	1,5112	0,75	57,06	20,60	-	6,93	0,054	87,35	3,56	0,081
20%	1,1492	0,75	59,25	18,92	-	6,93	0,054	87,35	3,48	0,080
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 2lh (Test. e 5% sangria); 22h (10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)										
Test.	3,7462	1,55	45,59	5,86	1,60	6,86	0,057	86,49	3,71	0,075
05%	2,8222	0,74	45,58	41,60	3,10	6,89	0,054	86,91	3,66	0,075
10%	2,0731	0,75	42,92	51,79	1,60	6,86	0,054	86,47	3,55	0,075
15%	1,5737	0,50	42,45	54,42	1,60	6,86	0,054	86,47	3,43	0,073
20%	1,1981	0,50	43,06	50,11	3,10	6,86	0,054	86,47	3,40	0,074

TABELA 41. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto: xarope (Brix: 14,90%; ARI: 15,40%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 3 - Bloco II)

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,3966	1,55	99,06	0,15	1,60	6,86	0,050	86,44	3,37	0,075
05%	3,3966	1,55	99,27	0,12	1,60	6,86	0,047	86,41	3,37	0,074
10%	3,4216	1,55	99,36	0,21	3,10	6,86	0,050	86,44	3,36	0,075
15%	3,3966	1,55	99,24	0,09	1,60	6,86	0,050	86,44	3,36	0,074
20%	3,3966	1,55	98,66	0,18	3,10	6,86	0,050	86,44	3,36	0,074
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,4466	1,55	97,51	0,31	1,60	7,21	0,054	90,86	3,41	0,080
05%	3,2468	1,54	97,83	0,53	1,60	7,21	0,054	90,86	3,42	0,076
10%	3,0470	1,29	97,10	0,38	1,60	7,21	0,054	90,86	3,43	0,076
15%	2,8971	1,29	97,07	0,44	3,10	7,14	0,054	89,98	3,41	0,080
20%	2,5476	1,29	97,80	0,53	3,10	7,14	0,054	89,98	3,44	0,078
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,5215	1,55	93,39	0,64	1,60	7,28	0,054	91,73	3,59	0,077
05%	3,1469	1,28	94,33	0,71	1,60	7,21	0,054	90,86	3,58	0,079
10%	2,7973	1,28	94,09	0,58	1,60	7,21	0,054	90,86	3,59	0,077
15%	2,5226	1,28	95,15	0,74	3,10	7,14	0,054	89,98	3,57	0,078
20%	2,1480	1,28	96,26	0,57	3,10	7,14	0,054	89,98	3,56	0,081
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 2lh										
Test.	3,5465	1,55	78,90	0,65	3,10	7,21	0,054	90,86	3,67	0,078
05%	3,0220	1,27	79,54	0,81	1,60	7,21	0,054	90,86	3,64	0,078
10%	2,6475	1,02	83,05	0,74	1,60	7,14	0,054	89,98	3,58	0,078
15%	2,3478	1,02	85,96	0,68	3,10	6,96	0,054	87,78	3,55	0,078
20%	2,0980	1,02	87,95	0,59	3,10	6,96	0,054	87,78	3,56	0,079

Cont.

TABELA 41. Continuação.

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool (v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	3,7962	1,55	65,33	1,25	3,10	7,17	0,054	90,42	3,72	0,077
05%	2,9721	1,27	66,83	1,06	3,10	7,14	0,054	89,98	3,63	0,079
10%	2,3478	1,01	67,36	0,91	3,10	7,03	0,054	88,66	3,58	0,079
15%	1,8983	1,02	67,39	1,28	1,60	6,93	0,054	87,35	3,55	0,077
20%	1,7485	1,02	68,76	6,96	3,10	6,93	0,054	87,35	3,49	0,079
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	3,6713	1,55	62,21	0,83	-	7,07	0,054	89,10	3,70	0,077
05%	2,9221	1,01	58,94	0,89	-	6,96	0,054	87,78	3,66	0,080
10%	2,2479	0,76	60,39	3,04	-	6,93	0,054	87,35	3,59	0,077
15%	1,7734	0,76	60,59	16,07	-	6,93	0,050	87,31	3,51	0,078
20%	1,3489	0,76	61,49	15,55	-	6,93	0,050	87,31	3,45	0,077
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 21h (Test. e 5% sangria); 22h (10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)										
Test.	3,8211	1,55	55,60	1,04	-	7,07	0,054	89,10	3,72	0,077
05%	2,8472	1,00	52,70	19,51	-	7,00	0,054	88,22	3,69	0,079
10%	2,1480	0,75	51,89	32,79	-	6,96	0,054	87,78	3,58	0,079
15%	1,6486	0,75	52,22	31,42	-	6,93	0,047	87,28	3,47	0,077
20%	1,2990	0,76	54,47	30,09	-	6,93	0,047	87,28	3,46	0,077
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 21h (Test. e 5% sangria); 22h (10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)										
Test.	3,8711	1,55	52,85	1,14	3,10	7,14	0,054	89,98	3,77	0,083
05%	2,7973	0,75	55,16	22,08	4,70	7,07	0,054	89,10	3,69	0,083
10%	2,0731	0,75	53,95	24,93	4,70	7,03	0,047	89,04	3,63	0,084
15%	1,5487	0,51	54,73	24,98	1,60	7,00	0,050	88,19	3,55	0,081
20%	1,1981	0,50	55,74	19,43	3,10	7,00	0,050	88,19	3,47	0,080

TABELA 42. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto: melaço (Brix: 19,80%; AR: 15,20%; pH: 3,60). Temperatura: 33°C (Experimento 4 - Bloco I).

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,6213	1,46	97,64	0,16	1,60	6,86	0,054	87,61	3,99	0,276
05%	3,6463	1,45	98,05	0,29	1,60	6,86	0,054	87,61	3,99	0,276
10%	3,6463	1,45	98,15	0,23	1,60	6,86	0,054	87,61	3,98	0,275
15%	3,6463	1,46	98,15	0,16	3,10	6,86	0,054	87,61	3,99	0,276
20%	3,6213	1,45	98,80	0,26	3,10	6,86	0,054	87,61	3,98	0,275
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,8211	1,46	93,01	0,17	1,60	7,14	0,054	91,16	4,12	0,242
05%	3,6463	1,44	93,93	0,24	3,10	7,14	0,054	91,16	4,12	0,240
10%	3,4965	1,21	95,51	0,24	3,10	7,14	0,054	91,16	4,11	0,242
15%	3,2218	1,21	96,88	0,26	1,60	7,10	0,054	90,71	4,11	0,241
20%	2,9721	1,21	96,15	0,27	3,10	7,07	0,054	90,27	4,10	0,241
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,7962	1,46	83,24	0,23	3,10	7,14	0,054	91,16	4,12	0,229
05%	3,3966	1,19	83,99	0,27	1,60	7,14	0,054	91,16	4,11	0,242
10%	3,0970	1,20	85,13	0,31	3,10	6,86	0,054	87,61	4,09	0,242
15%	2,7224	1,20	88,62	0,22	3,10	6,86	0,054	87,61	4,08	0,240
20%	2,4227	1,20	90,06	0,29	1,60	6,86	0,054	87,61	4,06	0,246
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,9210	1,46	73,59	0,52	3,10	7,17	0,060	91,66	4,11	0,255
05%	3,3217	1,19	76,25	1,26	3,10	7,14	0,057	91,19	4,09	0,260
10%	2,9970	0,95	76,61	3,31	1,60	7,07	0,054	90,27	4,06	0,258
15%	2,6974	0,95	78,58	3,47	1,60	7,00	0,054	89,38	4,03	0,258
20%	2,2729	0,95	79,88	5,16	3,10	7,00	0,054	89,38	4,01	0,259

Cont.

TABELA 42. Continuação

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml $\times 10^9$	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml $\times 10^5$	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	4,2956	1,46	64,35	1,40	-	7,17	0,054	91,60	4,07	0,291
05%	3,5964	1,18	69,19	4,33	-	7,14	0,054	91,16	4,05	0,265
10%	3,1718	0,95	70,55	7,09	-	7,00	0,054	89,38	3,96	0,264
15%	2,7723	0,95	71,90	6,39	-	6,89	0,054	88,05	3,89	0,261
20%	2,4476	0,95	72,01	5,89	-	6,89	0,054	88,05	3,86	0,264
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	4,6452	1,46	54,52	2,12	-	7,14	0,054	91,16	4,07	0,261
05%	3,9959	0,94	58,92	9,31	-	7,00	0,054	89,38	3,98	0,262
10%	3,3966	0,71	60,68	9,34	-	6,93	0,054	88,49	3,91	0,263
15%	2,8722	0,71	61,47	9,37	-	6,89	0,054	88,05	3,88	0,261
20%	2,3977	0,71	61,15	9,81	-	6,86	0,054	87,61	3,84	0,260
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	4,5703	1,46	47,98	2,88	3,10	7,14	0,054	91,16	4,00	0,257
05%	3,8461	0,93	51,85	8,57	4,70	7,00	0,054	89,38	3,96	0,255
10%	3,4465	0,70	52,78	9,85	3,10	7,00	0,054	89,38	3,85	0,251
15%	2,6974	0,70	54,29	12,22	3,10	7,00	0,054	89,38	3,82	0,251
20%	2,1730	0,70	54,90	13,49	4,70	7,00	0,054	89,38	3,81	0,251
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	5,1446	1,46	39,94	2,93	3,10	7,07	0,054	90,27	3,93	0,261
05%	3,9460	0,70	41,05	9,32	4,70	7,07	0,054	90,27	3,94	0,267
10%	3,2468	0,70	44,96	8,80	3,10	7,07	0,054	90,27	3,86	0,254
15%	2,5226	0,47	45,87	11,17	4,70	7,07	0,054	90,27	3,82	0,268
20%	1,9487	0,46	47,65	11,59	4,70	7,00	0,054	89,38	3,82	0,272

TABELA 43. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* tipo Fleischmann (prensada). Mosto: melão (Brix: 19,80%; ART: 15,20%; pH: 3,60). Temperatura: 33°C (Experimento 4 - Bloco II)

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston.. / ml x 10 ⁵	Alcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,2967	1,46	94,44	0,14	1,60	6,86	0,054	87,61	4,03	0,249
05%	3,2967	1,45	94,38	0,21	3,10	6,86	0,054	87,61	4,01	0,248
10%	3,2967	1,45	95,56	0,17	1,60	6,86	0,054	87,61	4,00	0,253
15%	3,2967	1,45	95,91	0,20	1,60	6,86	0,054	87,61	4,01	0,251
20%	3,2967	1,45	95,97	0,23	3,10	6,86	0,054	87,61	4,00	0,253
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,6463	1,46	89,85	0,25	-	7,28	0,054	92,94	4,11	0,253
05%	3,2967	1,44	90,83	0,18	-	7,28	0,054	92,94	4,10	0,253
10%	3,1219	1,21	91,77	0,21	-	7,28	0,054	92,94	4,09	0,250
15%	2,9721	1,20	93,67	0,14	-	7,14	0,054	91,16	4,09	0,249
20%	2,7973	1,20	94,16	0,24	-	7,14	0,054	91,16	4,07	0,253
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,7462	1,46	84,87	0,23	-	7,14	0,054	91,16	4,09	0,257
05%	3,2967	1,20	86,94	0,79	-	7,07	0,054	90,27	4,08	0,257
10%	2,9221	1,20	87,75	0,44	-	7,07	0,054	90,27	4,07	0,257
15%	2,6475	1,20	89,57	1,17	-	7,00	0,054	89,38	4,04	0,258
20%	2,1979	1,20	90,85	1,30	-	7,00	0,054	89,38	4,00	0,257
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 20h										
Test.	3,9709	1,46	76,98	0,54	3,10	7,14	0,054	91,16	4,06	0,253
05%	4,3715	1,19	80,61	1,79	3,10	7,00	0,054	90,27	4,04	0,257
10%	3,1718	0,96	82,98	2,61	4,70	6,93	0,054	88,49	3,94	0,257
15%	2,9221	0,95	83,65	3,07	3,10	6,89	0,054	88,05	3,89	0,257
20%	2,5725	0,95	84,72	3,38	4,70	6,89	0,054	88,05	3,87	0,257

Cont.

TABELA 43. Continuação.

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Alcool (v/v) % Vinho Recup.	Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 20h									
Test.	4,5203	1,46	70,22	1,29	3,10	7,10	0,054	4,00	0,262
05%	3,9460	1,19	72,30	2,32	4,70	6,89	0,054	3,90	0,258
10%	3,4715	0,95	73,81	1,74	3,10	6,86	0,054	3,82	0,257
15%	3,1718	0,95	74,98	2,56	4,70	6,74	0,054	3,80	0,255
20%	2,6475	0,95	76,54	3,58	4,70	6,70	0,054	3,74	0,257
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 20h									
Test.	4,9698	1,46	63,31	1,62	3,10	7,00	0,054	3,83	0,258
05%	4,1458	0,95	64,65	2,93	4,70	6,86	0,054	3,84	0,257
10%	3,4216	0,71	68,01	2,74	4,70	6,86	0,054	3,82	0,253
15%	3,0470	0,71	70,07	3,28	3,10	6,86	0,054	3,81	0,257
20%	2,4227	0,71	72,01	3,88	4,70	6,86	0,054	3,75	0,257
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 20h									
Test.	4,9449	1,46	49,95	1,42	4,70	7,00	0,054	3,84	0,259
05%	3,9959	0,94	54,59	3,54	4,70	6,89	0,054	3,86	0,260
10%	3,4216	0,71	56,07	4,22	3,10	6,89	0,054	3,87	0,260
15%	2,6724	0,70	59,00	5,17	3,10	6,86	0,054	3,84	0,260
20%	2,6725	0,70	62,49	6,06	4,70	6,86	0,054	3,82	0,259
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 20h									
Test.	5,2195	1,46	43,01	3,27	4,70	7,00	0,054	3,89	0,260
05%	4,1458	0,70	44,14	5,37	4,70	6,93	0,054	3,89	0,259
10%	3,4216	0,70	44,77	6,74	6,30	6,89	0,054	3,86	0,256
15%	2,6475	0,47	46,27	9,32	4,70	6,86	0,054	3,84	0,260
20%	2,0731	0,47	50,08	7,95	4,70	6,86	0,054	3,83	0,260

TABELA 44. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (média de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* linhagem M-300-A. Mosto: xarope (Brix: 14,98%; ART: 15,50%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C (Experimento 5 - Bloco I).

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	4,4270	1,42	90,13	3,38	3,10	7,24	0,054	90,70	3,86	0,082
05%	4,5120	1,41	90,49	3,74	4,70	7,21	0,060	90,32	3,84	0,082
10%	4,4840	1,41	89,58	3,89	3,10	7,21	0,057	90,29	3,82	0,081
15%	4,4270	1,39	89,97	3,34	6,30	7,21	0,060	90,32	3,80	0,084
20%	4,4840	1,40	90,50	3,87	1,60	7,21	0,057	90,29	3,80	0,085
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	4,5690	1,42	83,64	5,23	4,70	7,17	0,060	89,88	3,58	0,084
05%	4,3700	1,40	84,01	5,11	3,10	7,10	0,057	88,99	3,58	0,081
10%	4,1120	1,40	83,82	4,94	4,70	7,10	0,060	89,01	3,59	0,082
15%	3,7420	1,39	83,56	4,87	7,90	7,14	0,060	89,45	3,57	0,083
20%	3,4560	1,39	82,62	4,79	6,30	6,96	0,060	87,27	3,57	0,084
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 22h										
Test.	4,2270	1,41	71,80	5,15	7,30	6,96	0,060	87,27	3,53	0,082
05%	3,9130	1,39	71,60	5,26	7,80	6,93	0,054	86,78	3,53	0,080
10%	3,4560	1,16	72,40	5,33	8,00	6,93	0,057	86,81	3,47	0,080
15%	2,9990	1,15	73,54	5,15	8,00	6,86	0,060	85,96	3,40	0,080
20%	2,6570	1,15	74,01	4,74	6,80	6,86	0,057	85,93	3,39	0,079
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 22 h										
Test.	4,2550	1,40	78,79	4,57	9,40	7,28	0,060	91,19	3,48	0,084
05%	3,8840	1,39	80,04	4,41	11,00	7,17	0,060	89,88	3,48	0,084
10%	3,3420	1,15	78,73	4,36	7,90	7,07	0,066	88,63	3,44	0,084
15%	2,8860	1,14	79,38	3,80	6,30	7,00	0,069	87,79	3,43	0,084
20%	2,4000	1,15	79,97	4,95	11,00	6,93	0,063	86,86	3,39	0,084

Cont.

TABELA 44. Continuação

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml $\times 10^9$	Viab. (%)	Brot. (%)	Bastcn. / ml $\times 10^5$	Álcool (v/v) % Vinho Recup.	Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 22h									
Test.	4,5410	1,39	80,73	4,51	11,00	7,07	0,054	3,50	0,085
05%	3,8560	1,37	81,00	4,56	7,90	6,96	0,054	3,48	0,085
10%	3,1990	1,14	80,85	4,62	6,30	6,93	0,054	3,46	0,084
15%	2,2600	1,13	80,13	4,74	9,40	6,86	0,054	3,42	0,082
20%	2,1150	1,14	79,63	4,32	7,90	6,86	0,054	3,40	0,084
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. 5 e 10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)									
Test.	4,4270	1,39	82,65	4,37	9,50	6,89	0,054	3,49	0,081
05%	3,7420	1,36	82,14	4,41	8,10	6,86	0,054	3,47	0,083
10%	2,9430	1,13	82,45	4,77	7,00	6,86	0,054	3,46	0,080
15%	2,3150	1,12	82,13	4,32	7,60	6,86	0,054	3,46	0,082
20%	1,8010	1,13	82,99	4,39	6,90	6,86	0,054	3,44	0,081
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. 5 e 10% sangria); 43h (15 e 20% sangria)									
Test.	4,6550	1,39	78,58	16,79	1,20	6,82	0,047	3,50	0,081
05%	3,8270	1,35	78,82	16,85	7,00	6,82	0,047	3,47	0,083
10%	2,9360	1,12	77,22	18,51	12,00	6,82	0,047	3,44	0,081
15%	2,4000	1,11	76,24	18,82	9,30	6,78	0,047	3,42	0,083
20%	1,8010	1,12	78,30	17,27	8,00	6,82	0,047	3,41	0,082
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. 5 e 10% sangria); 43h (15 e 20% sangria)									
Test.	5,0560	1,38	78,05	17,91	13,00	6,93	0,054	3,60	0,084
05%	3,8560	1,34	77,52	18,10	7,90	6,89	0,054	3,57	0,084
10%	2,8140	1,11	77,13	18,60	11,00	6,89	0,054	3,51	0,088
15%	2,2860	1,10	76,66	18,78	9,40	6,82	0,054	3,51	0,084
20%	1,7150	1,11	77,19	18,05	7,90	6,78	0,054	3,50	0,084

TABELA 45. Efeito da sangria de levedura sobre a fermentação alcoólica durante 7 ciclos fermentativos (médias de duas repetições). Levedura: *S. cerevisiae* linhagem M-300-A. Mosto: xarope (Brix: 14,88%; ART: 15,00%; pH: 3,57). Temperatura: 33°C. (Experimento 5 - Bloco II).

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Início - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	4,0270	1,67	90,15	1,99	1,78	6,86	0,050	88,74	3,73	0,070
05%	4,0130	1,65	86,03	1,80	2,05	6,86	0,054	88,77	3,74	0,071
10%	4,0270	1,65	85,48	1,94	2,13	6,86	0,050	88,74	3,72	0,073
15%	4,0130	1,64	84,25	2,01	2,18	6,86	0,054	88,77	3,68	0,069
20%	4,0130	1,65	84,38	2,24	1,85	6,86	0,050	88,74	3,70	0,071
Ciclo 1 - Tempo de Fermentação: 21h										
Test.	4,5980	1,43	82,61	1,99	9,40	6,63	0,054	85,81	3,45	0,069
05%	4,3120	1,39	82,00	1,80	6,30	6,56	0,047	84,85	3,45	0,069
10%	4,1410	1,41	82,43	1,94	7,90	6,52	0,047	84,40	3,47	0,070
15%	3,9700	1,40	81,83	2,01	4,70	6,42	0,054	83,11	3,47	0,071
20%	3,6280	1,41	82,07	2,24	6,30	6,49	0,047	83,95	3,48	0,071
Ciclo 2 - Tempo de Fermentação: 22h										
Test.	4,1980	1,42	81,79	2,22	13,00	6,59	0,054	85,36	3,47	0,074
05%	3,8270	1,40	81,14	2,40	9,40	6,52	0,054	84,46	3,48	0,074
10%	3,4560	1,40	80,91	2,55	6,30	6,49	0,054	84,01	3,47	0,075
15%	3,1710	1,39	81,02	2,76	7,90	6,35	0,054	82,21	3,47	0,072
20%	2,6570	1,39	81,59	2,09	6,30	6,35	0,050	82,18	3,45	0,075
Ciclo 3 - Tempo de Fermentação: 22h										
Test.	4,5980	1,42	77,97	3,45	11,00	6,35	0,047	82,15	3,50	0,072
05%	3,9700	1,38	77,08	3,65	7,90	6,28	0,047	81,25	3,49	0,070
10%	3,4270	1,15	77,58	4,35	9,40	6,28	0,047	81,25	3,50	0,069
15%	3,0000	1,15	77,63	4,45	7,90	6,28	0,054	81,31	3,47	0,070
20%	2,4860	1,16	77,62	4,10	6,30	6,28	0,047	81,25	3,44	0,070

Cont.

TABELA 45. Continuação

Nível de sangria (v/v)	Matéria seca (g/100ml)	Células /ml x 10 ⁹	Viab. (%)	Brot. (%)	Baston. / ml x 10 ⁵	Álcool(v/v) %		Rend. (%)	pH vinho	AR vinho (%)
						Vinho	Recup.			
Ciclo 4 - Tempo de Fermentação: 22 h										
Test.	4,5410	1,41	67,32	4,76	11,00	6,31	0,054	81,76	3,58	0,073
05%	3,7990	1,14	63,66	6,24	6,10	6,28	0,054	81,31	3,57	0,073
10%	3,1420	0,91	61,97	6,72	7,30	6,28	0,047	81,25	3,56	0,073
15%	2,7430	0,91	61,21	6,54	7,80	6,28	0,054	81,31	3,52	0,071
20%	2,2290	0,92	65,98	5,35	6,30	6,28	0,054	81,31	3,49	0,070
Ciclo 5 - Tempo de Fermentação: 22h (Test., 5 e 10% sangria); 23h (15 e 20% sangria)										
Test.	4,7970	1,40	61,38	6,28	13,00	6,31	0,043	81,66	3,56	0,072
05%	3,7130	0,68	60,61	6,61	7,30	6,28	0,040	81,18	3,50	0,068
10%	3,1420	0,68	60,67	6,28	6,40	6,28	0,040	81,18	3,46	0,069
15%	2,6000	0,68	59,37	6,86	6,30	6,28	0,047	81,24	3,44	0,070
20%	1,9720	0,68	60,40	6,32	6,10	6,35	0,050	82,18	3,41	0,068
Ciclo 6 - Tempo de Fermentação: 22h (Test., 5 e 10% sangria); 43h (15 e 20% sangria)										
Test.	4,8260	1,40	48,31	8,92	11,00	6,28	0,050	81,28	3,47	0,070
05%	3,8840	0,68	47,05	9,78	7,80	6,28	0,047	81,25	3,46	0,070
10%	3,1140	0,67	46,59	9,24	7,80	6,28	0,047	81,25	3,50	0,069
15%	2,3430	0,67	46,36	9,08	7,30	6,28	0,050	81,28	3,58	0,070
20%	2,1440	0,65	47,24	6,55	6,30	6,28	0,050	81,28	3,50	0,068
Ciclo 7 - Tempo de Fermentação: 22h (Test. e 10% sangria); 43h (15 e 20% sangria)										
Test.	5,1690	1,39	50,45	6,82	11,00	6,35	0,050	82,18	3,48	0,071
05%	3,7420	0,67	48,26	7,42	7,90	6,35	0,054	82,21	3,47	0,070
10%	2,8290	0,65	46,97	8,32	7,90	6,35	0,047	82,15	3,54	0,070
15%	2,2290	0,64	46,74	6,40	11,00	6,35	0,050	82,18	3,59	0,070
20%	1,8010	0,62	46,08	7,23	6,30	6,35	0,050	82,18	3,42	0,070

TABELA 46. Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) em função da sangria de células (Experimento 1).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	77,6071	77,6071	3,1395ns	10,4082
Tratamentos	3	19543,3304	6514,4435	263,5296**	0,0000
Resíduo A	11	271,9196	24,7200		
Parcelas	15	19892,8571	1326,1905		
Ciclos	6	19185,0167	3197,5028	312,1138**	0,0000
Trat. x Ciclos	18	600,1926	33,3440	3,2548**	0,0192
Cic. d Trat. 1	6	4438,3778	739,7296	72,2063**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	5244,6906	874,1151	85,3239**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	5045,1177	840,8529	82,0771**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	5057,0233	842,8372	82,2708**	0,0000
Trat. d Cic. 1	3	1681,7988	560,5996	45,5307**	0,0000
Trat. d Cic. 2	3	2433,2656	811,0885	65,8749**	0,0000
Trat. d Cic. 3	3	3138,3506	1046,1169	84,9633**	0,0000
Trat. d Cic. 4	3	3838,7773	1279,5924	103,9257**	0,0000
Trat. d Cic. 5	3	4383,1074	1461,0358	118,6622**	0,0000
Trat. d Cic. 6	3	2802,0430	934,0143	75,8586**	0,0000
Trat. d Cic. 7	3	1866,1802	622,0601	50,5224**	0,0000
Resíduo B	72	737,6162	10,2447		
Total	111	40415,6826	364,1052		

Coef. Variação A: 7,1718

Coef. Variação B: 4,6169

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 12,312

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 69

Trat. 1: Test. prensada; Trat. 2: 20% sangria; Trat. 3: Test. multiplicada; Trat. 4: 20% sangria (v/v).

TABELA 47. Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$ em função da sangria de células (Experimento 1).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,0689	0,0689	21,2779**	0,0749
Tratamentos	3	6,9051	2,3017	710,9251**	0,0000
Resíduo A	11	0,0356	0,0032		
Parcelas	15	7,0096	0,4673		
Ciclos	6	0,4054	0,0676	8,5618**	0,0001
Trat. x Ciclos	18	0,1677	0,0093	1,1807ns	29,9864
Resíduo B	72	0,5683	0,0079		
Total	111	8,1511	0,0734		

Coef. Variação A: 15,5887

Coef. Variação B: 24,3393

TABELA 48. Análise da variância dos dados de número de células (células/mililitro x 10^9) em função da sangria de células (Experimento 1).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,0012	0,0012	3,1732ns	10,2450
Tratamentos	3	9,9342	3,3114	8607,9880**	0,0000
Resíduo A	11	0,0042	0,0004		
Parcelas	15	9,9397	0,6626		
Ciclos	6	2,2224	0,3704	13917,3900**	0,0000
Trat. x Ciclos	18	1,9654	0,1092	4102,7900**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0007	0,0001	4,4084**	0,0753
Cic. d Trat. 2	6	2,1330	0,3555	13358,0100**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	0,0046	0,0008	28,7201**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	2,0495	0,3416	12834,6300**	0,0000
Cic. d Trat. 5					
Trat. d Cic. 1	3	0,2772	0,0924	1188,2780**	0,0000
Trat. d Cic. 2	3	0,2777	0,0926	1190,0890**	0,0000
Trat. d Cic. 3	3	1,0987	0,3662	4709,4330**	0,0000
Trat. d Cic. 4	3	1,0991	0,3664	4711,1330**	0,0000
Trat. d Cic. 5	3	2,4456	0,8152	10482,7200**	0,0000
Trat. d Cic. 6	3	2,4437	0,8146	10474,4700**	0,0000
Trat. d Cic. 7	3	4,2576	1,4192	18249,1600**	0,0000
Resíduo B	72	0,0019	0,0000		
Total	111	14,1294	0,1273		

Coef. Variação A: 1,5656

Coef. Variação B: 0,4118

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 7,78 x 10^{-5}

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 21

Trat. 1: Test. pensada; Trat. 2: 20% sangria (v/v), Trat. 3: Test. multiplicada; Trat. 4: 20% sangria (v/v).

TABELA 49. Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) em função da sangria de células (Experimento 1).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	0,0257	0,0257	0,3078ns	59,0121
Tratamentos	3	128,4609	42,8203	512,7958**	0,0000
Resíduo A	11	0,9185	0,0835		
Parcelas	15	129,4052	8,6270		
Ciclos	6	3,0307	0,5051	33,2615**	0,0000
Trat. x Ciclos	18	15,3200	0,8511	56,0446**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,8374	0,1396	9,1904**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	8,8086	1,4681	96,6726**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	2,1291	0,3549	23,3666**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	6,5756	1,0959	72,1657**	0,0000
Trat. d Cic. 1	3	3,9401	1,3134	52,6487**	0,0000
Trat. d Cic. 2	3	8,7367	2,9122	116,7421**	0,0000
Trat. d Cic. 3	3	13,2666	4,4222	177,2722**	0,0000
Trat. d Cic. 4	3	20,0883	6,6961	268,4244**	0,0000
Trat. d Cic. 5	3	27,4840	9,1613	367,2478**	0,0000
Trat. d Cic. 6	3	33,4995	11,1665	447,6285**	0,0000
Trat. d Cic. 7	3	36,7657	12,2552	491,2721**	0,0000
Resíduo B	72	1,0934	0,0152		
Total	111	148,8493	1,3410		

Coef. Variação B: 4,1351

Coef. Variação A: 9,6966

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 0,0249

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 41

Trat. 1: Test. prensada; Trat. 2: 20% sangria; Trat. 3: Test. multiplicada; Trat. 4: 20% sangria. (v/v)

TABELA 50. Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) em função da sangria de células (Experimento 1).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	157,7857	157,7857	188,4556**	0,0000
Tratamentos	3	91,0179	38,3393	36,2366**	0,0005
Resíduo A	11	9,2098	0,8373		
Parcelas	15	258,0134	17,2009		
Ciclos	6	79,2321	13,2054	13,0108**	0,0000
Trat. x Ciclos	18	15,5446	0,8636	0,8509ns	63,6285
Resíduo B	72	73,0767	1,0150		
Total	111	425,8669	3,8366		
Coef. Variação A: 1,0058				Coef. Variação B: 1,1074	

TABELA 51. Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	2360,8571	2360,8571	290,3164**	0,0000
Tratamentos	4	1112,8607	278,2152	34,2123**	0,0000
Resíduo A	14	113,8482	8,1320		
Parcelas	19	3587,5661	188,8193		
Ciclos	6	32272,2366	5378,7061	459,0931**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	987,9692	41,1654	3,5136**	0,0008
Cic. d Trat. 1	6	9344,5773	1557,4295	132,9325**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	6934,3598	1155,7266	98,6457**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	6609,1062	1101,5177	94,0187**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	6148,2864	1024,7144	87,4633**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	4223,8761	703,9794	60,0873**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,2508	0,0627	0,0056ns	99,9934
Trat. d Cic. 2	4	29,4633	7,3658	0,6574ns	62,2975
Trat. d Cic. 3	4	89,7512	22,4378	2,0027ns	9,9640
Trat. d Cic. 4	4	43,5195	10,8799	0,9711ns	42,6745
Trat. d Cic. 5	4	629,2441	157,3110	14,0407**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	264,5273	66,1318	5,9025**	0,0257
Trat. d Cic. 7	4	1044,0736	261,0184	23,2970**	0,0000
Resíduo B	90	1054,4345	11,7159		
Total	139	37902,2064	272,6777		

Coef. Variação A: 3,6009 Coef. Variação B: 4,3222

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 11,204

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 103

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 52. Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{Y/100}$ para os diferentes níveis de sangria (Experimento 2).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	0,0533	0,0533	8,5615*	1,1059
Tratamentos	4	0,3521	0,0880	14,1365**	0,0080
Resíduo A	14	0,0872	0,0062		
Parceiras	19	0,4926	0,0259		
Ciclos	6	1,3736	0,2289	59,8341**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	0,5050	0,0210	5,4994**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0467	0,0078	2,0324ns	6,9358
Cic. d Trat. 2	6	0,3401	0,0567	14,8135**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	0,4043	0,0674	17,6118**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	0,5569	0,0928	24,2610**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	0,5306	0,0884	23,1128**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,0002	0,0001	0,0131ns	99,9654
Trat. d Cic. 2	4	0,0000	0,0000	0,0018ns	99,9993
Trat. d Cic. 3	4	0,0018	0,0004	0,1078ns	97,9559
Trat. d Cic. 4	4	0,2071	0,0518	12,4190**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	0,3173	0,0793	19,0261**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	0,1703	0,0426	10,2101**	0,0001
Trat. d Cic. 7	4	0,1604	0,0401	9,6181**	0,0001
Resíduo B	90	0,3443	0,0038		
Total	139	2,7155	0,0195		

Coef. Variação A: 46,1262 Coef. Variação B: 36,1568

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 4,17 x 10⁻³

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 99

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 53. Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro x 10⁹) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,0018	0,0018	33,5685**	0,0047
Tratamentos	4	7,4978	1,8744	35654,2700**	0,0000
Resíduo A	14	0,0007	0,0001		
Parcelas	19	7,5003	0,3948		
Ciclos	6	5,2772	0,8795	72510,7000**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	1,6235	0,0676	5576,9190**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0000	0,0000	0,0075ns	99,9995
Cic. d Trat. 2	6	1,5727	0,2621	21609,6400**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	1,3434	0,2239	18458,4900**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	2,0017	0,3336	27504,3300**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	1,9829	0,3305	27245,9100**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,3310	0,0828	4621,0500**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	0,2378	0,0594	3319,5190**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	0,8907	0,2227	12435,1700**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	0,9089	0,2272	12689,6800**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	1,8871	0,4718	26345,2000**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	1,8970	0,4742	26483,2800**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	2,9688	0,7422	41446,7300**	0,0000
Resíduo B	90	0,0011	0,0000		
Total	139	14,4021	0,1036		

Coef. Variação A: 0,6523 / Coef. Variação B: 0,3133

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 1,79 x 10⁻⁵

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 61

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 2%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 54. Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloco	1	0,1373	0,1373	11,2160**	0,4773
Tratamentos	4	72,0591	18,0148	1471,8650**	0,0000
Resíduo A	14	0,1714	0,0122		
Parceiras	19	72,3677	3,8088		
Ciclos	6	8,2024	1,3671	134,1256**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	7,3953	0,3081	30,2323**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,8717	0,1453	14,2538**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	0,4025	0,0671	6,5824**	0,0009
Cic. d Trat. 3	6	2,5661	0,4277	41,9611**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	5,3251	0,8875	87,0764**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	6,4323	1,0720	105,1812**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	1,9403	0,4851	46,2638**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	5,4534	1,3634	130,0315**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	8,4128	2,1032	200,5960**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	12,0678	3,0169	287,7439**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	14,6125	3,6531	348,4212**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	16,3962	4,0990	390,9506**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	20,5714	5,1429	490,5058**	0,0000
Resíduo B	90	0,9173	0,0102		
Total	139	88,8827	0,6394		

Coef. Variação A: 3,9706

Coef. Variação B: 3,6233

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 0,105

Graus de liberdade para comparação Trat. dentro Ciclos: 103

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 55. Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 2).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	0,0571	0,0571	0,1973ns	66,3688
Tratamentos	4	93,2179	23,3045	80,4699**	0,0000
Resíduo A	14	4,0545	0,2896		
Parcelas	19	97,3295	5,1226		
Ciclos	6	110,8857	18,4810	30,3985**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	17,8704	0,7446	1,2248ns	24,3339
Resíduo B	90	54,7160	0,6080		
Total	139	280,8016	2,0202		
Coef. Variação A: 0,5833				Coef. Variação B: 0,8451	

TABELA 56. Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	350,9714	350,9714	110,2090**	0,0000
Tratamentos	4	190,2643	47,5661	14,9363**	0,0059
Resíduo A	14	44,5844	3,1846		
Parcelas	19	585,8201	30,8326		
Ciclos	6	46262,5152	7710,4192	328,4469**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	223,7111	9,3213	0,3971ns	99,3981
Resíduo B	90	2112,7850	23,4754		
Total	139	49184,8314	353,8477		
Coef. Variação A: 2,3931				Coef. Variação B: 6,4973	

TABELA 57. Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados para arc sen $\sqrt{y/100}$, para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	0,0367	0,0367	19,4199**	0,0597
Tratamentos	4	0,7896	0,1974	104,5363**	0,0000
Resíduo A	14	0,0264	0,0019		
Parcelas	19	0,8527	0,0449		
Ciclos	6	4,6513	0,7752	138,8171**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	1,2256	0,0511	9,1446**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0382	0,0064	1,1388ns	34,6488
Cic. d Trat. 2	6	1,1960	0,1993	35,6947**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	1,6241	0,2707	48,4710**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	1,7264	0,2877	51,5245**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	1,2922	0,2154	38,5664**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,0005	0,0001	0,0248ns	99,8788
Trat. d Cic. 2	4	0,0006	0,0002	0,0298ns	99,8256
Trat. d Cic. 3	4	0,0029	0,0007	0,1438ns	96,5318
Trat. d Cic. 4	4	0,0970	0,0242	4,7954**	0,1416
Trat. d Cic. 5	4	0,6131	0,1533	30,3105**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	0,5972	0,1493	29,5289**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	0,7040	0,1760	34,8048**	0,0000
Resíduo B	90	0,5026	0,0056		
Total	139	7,2323	0,0520		

Coef. Variação A: 19,0255

Coef. Variação B: 32,7172

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 5,06 x 10⁻³

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 98

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 58. Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro x 1009) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,0007	0,0007	15,4764**	0,1498
Tratamentos	4	7,4967	1,8742	43770,9900**	0,0000
Resíduo A	14	0,0006	0,0000		
Parcelas	19	7,4980	0,3946		
Ciclos	6	5,3608	0,8935	77756,8800**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	1,6446	0,0685	5963,6020**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0000	0,0000	0,0613ns	99,9049
Cic. d Trat. 2	6	1,6074	0,2679	23314,2600**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	1,3622	0,2270	19758,4300**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	2,0067	0,3344	29106,3400**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	2,0292	0,3382	29432,2000**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,3277	0,0819	5131,5660**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	0,2344	0,0586	3670,0150**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	0,8919	0,2230	13966,1500**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	0,9070	0,2267	14201,6800**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	1,8945	0,4736	29664,3900**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	1,9111	0,4778	29925,0500**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	2,9748	0,7437	46579,8300**	0,0000
Resíduo B	90	0,0010	0,0000		
Total	139	14,5045	0,1043		

Coef. Variação A: 0,5864 Coef. Variação B: 0,3038

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: $1,596 \times 10^{-5}$

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro ciclos: 68

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v)

TABELA 59. Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,8545	0,8545	231,5116**	0,0000
Tratamentos	4	62,1113	15,5278	4207,1650**	0,0000
Resíduo A	14	0,0517	0,0037		
Paroullas	19	63,0174	3,3167		
Ciclos	6	9,2411	1,5402	254,6629**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	6,9804	0,2908	48,0903**	0,0000
Cic. d' Trat. 1	6	0,5284	0,0881	14,5618**	0,0000
Cic. d' Trat. 2	6	0,6759	0,1126	18,6254**	0,0000
Cic. d' Trat. 3	6	3,0206	0,5034	83,2395**	0,0000
Cic. d' Trat. 4	6	5,8726	0,9788	161,8332**	0,0000
Cic. d' Trat. 5	6	6,1241	1,0207	168,7641**	0,0000
Trat. d' Cic. 1	4	1,7840	0,4460	78,0903**	0,0000
Trat. d' Cic. 2	4	4,1602	1,0401	182,1069**	0,0000
Trat. d' Cic. 3	4	6,5110	1,6277	285,0091**	0,0000
Trat. d' Cic. 4	4	10,7104	2,6776	468,8310**	0,0000
Trat. d' Cic. 5	4	13,1350	3,2837	574,9643**	0,0000
Trat. d' Cic. 6	4	15,4035	3,8509	674,2637**	0,0000
Trat. d' Cic. 7	4	17,3876	4,3469	761,1169**	0,0000
Resíduo B	90	0,5443	0,0060		
Total	139	79,7833	0,5740		

Coef. Variação A: 2,4100 Coef. Variação B: 3,0851

Quadrado Médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 5,7112 x 10⁻³

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 102

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20 (v/v).

TABELA 60. Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 3).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	7,1429	7,1429	55,7214**	0,0003
Tratamentos	4	76,2714	19,0679	148,7483**	0,0000
Resíduo A	14	1,7946	0,1282		
Parcelas	19	85,2089	4,4847		
Ciclos	6	176,8839	29,4807	55,9668**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	26,1825	1,0909	2,0711**	0,7366
Cic. d Trat. 1	6	41,8510	6,9752	13,2418**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	50,7748	8,4625	16,0654**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	47,1688	7,8615	14,9244**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	31,3058	5,2176	9,9053**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	31,9660	5,3277	10,1142**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	3,5801	0,8950	1,9050ns	11,5818
Trat. d Cic. 2	4	12,4992	3,1248	6,6511**	0,0091
Trat. d Cic. 3	4	39,1832	9,7958	20,8503**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	30,2707	7,5677	16,1078**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	5,4430	1,3607	2,8963*	2,6006
Trat. d Cic. 6	4	8,8594	2,2148	4,7143**	0,1621
Trat. d Cic. 7	4	2,6184	0,6546	1,3933ns	24,2089
Resíduo B	90	47,4077	0,5268		
Total	139	335,6630	2,4150		

Coef. Variação A: 0,4027

Coef. Variação B: 0,8163

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 0,4698

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 96

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 61. Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	341,4857	341,4857	62,5902**	0,0002
Tratamentos	4	860,9036	215,2259	39,4483**	0,0000
Resíduo A	14	76,3826	5,4559		
Parceiras	19	1278,7719	67,3038		
Ciclos	6	37184,1259	6197,3543	1253,6550**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	61,2514	2,5521	0,5163ns	96,6423
Resíduo B	90	444,9086	4,9434		
Total	139	38969,0577	280,3529		
Coef. Variação A: 3,3069					Coef. Variação B: 3,1477

TABELA 62. Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{Y/100}$ para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	0,0647	0,0647	49,5956**	0,0007
Tratamentos	4	0,1720	0,0430	32,2760**	0,0001
Resíduo A	14	0,0187	0,0013		
Parcelas	19	0,2554	0,0134		
Ciclos	6	0,9342	0,1557	114,3079**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	0,0605	0,0025	1,8508*	1,9977
Cic. d Trat. 1	6	0,0648	0,0108	7,9345**	0,0001
Cic. d Trat. 2	6	0,1937	0,0323	23,7015**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	0,2111	0,0352	25,8337**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	0,2647	0,0441	32,3855**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	0,2603	0,0434	31,8561**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,0001	0,0000	0,0177ns	99,9376
Trat. d Cic. 2	4	0,0032	0,0008	0,5965ns	66,5975
Trat. d Cic. 3	4	0,0454	0,0113	8,3587**	0,0007
Trat. d Cic. 4	4	0,0270	0,0068	4,9776**	0,1036
Trat. d Cic. 5	4	0,0404	0,0101	7,4451**	0,0026
Trat. d Cic. 6	4	0,0601	0,0150	11,0602**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	0,0562	0,0141	10,3554**	0,0000
Resíduo B	90	0,1226	0,0014		
Total	139	1,3727	0,0099		

Coef. Variação A: 21,2631

Coef. Variação B: 21,4985

Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 1,36 x 10⁻³
Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 104

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 63. Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro x 10⁹) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,0001	0,0001	3,2338ns	9,3723
Tratamentos	4	6,7689	1,6922	56037,2300**	0,0000
Resíduo A	14	0,0004	0,0000		
Paroelas	19	6,7695	0,3563		
Ciclos	6	4,7697	0,7949	153086,4000**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	1,4626	0,0609	11735,8900**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	0,0000	0,0000	0,0831ns	99,7739
Cic. d Trat. 2	6	1,4100	0,2350	45255,3000**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	1,2175	0,2029	39076,3600**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	1,8069	0,3011	57993,3800**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	1,7979	0,2996	57704,8000**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	0,2886	0,0722	8232,2180**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	0,2174	0,0543	6200,2640**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	0,8053	0,2013	22968,6200**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	0,8185	0,2046	23345,0700**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	1,7031	0,4258	48576,6000**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	1,7211	0,4303	49091,0300**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	2,6775	0,6694	76370,4800**	0,0000
Resíduo B	90	0,0005	0,0000		
Total	139	13,0022	0,0935		

Coef. Variação A: 0,5251
 Coef. Variação B: 0,2177
 Quadrado médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 8,76 x 10⁻⁶
 Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 50
 Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 64. Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,2315	0,2315	35,9986**	0,0033
Tratamentos	4	64,5481	16,1370	2509,6250**	0,0000
Resíduo A	14	0,0900	0,0064		
Parcelas	19	64,8696	3,4142		
Ciclos	6	4,0151	0,6692	35,0929**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	9,1321	0,3805	19,9542**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	7,7829	1,2971	68,0243**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	2,2500	0,3750	19,6657**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	0,6274	0,1046	5,4835**	0,0071
Cic. d Trat. 4	6	0,8428	0,1405	7,3666**	0,0002
Cic. d Trat. 5	6	1,6441	0,2740	14,2694**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	1,7253	0,4313	24,9847**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	5,1476	1,2869	74,5457**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	5,4220	1,3555	78,5193	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	8,2783	2,0696	119,8831**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	14,0737	3,5184	203,8082**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	14,2893	3,5723	206,9315**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	24,7439	6,1860	358,3302**	0,0000
Resíduo B	90	1,7162	0,0191		
Total	139	79,7330	0,5736		

Coef. Variação A: 2,4120

Coef. Variação B: 4,1536

Quadrado Médio do resíduo para comparações Trat. dentro Ciclos: 1,726x10⁻²

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 98

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 65. Análise de variância dos dados de rendimento de fermentação (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 4).

Causas da Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	19,7143	19,7143	86,3464**	0,0000
Tratamentos	4	110,2214	27,5554	120,6894**	0,0000
Resíduo A	14	3,1964	0,2283		
Parcelas	19	133,1321	7,0070		
Ciclos	6	132,0571	22,0095	25,3855**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	31,0001	1,2917	1,4898ns	9,1929
Resíduo B	90	78,0312	0,8670		
Total	139	374,2205	2,6922		
Coef. Variação A: 0,5342				Coef. Variação B: 1,0411	

TABELA 66. Análise de variância dos dados de viabilidade celular (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	6217,2571	6217,2571	3162,6330**	0,0000
Tratamentos	4	27,2554	6,8138	3,4661*	3,6234
Resíduo A	14	27,5219	1,9658		
Parcelas	19	6272,0344	330,1071		
Ciclos	6	7292,8170	1215,4695	15,3691**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	41,7849	1,7410	0,0220ns	99,9999
Resíduo B	90	7117,6617	79,0851		
Total	139	20724,2979	149,0957		
Coef. Variação A: 1,9357				Coef. Variação B: 12,2774	

TABELA 67. Análise de variância dos dados de brotamento celular (%) transformados em arc sen $\sqrt{y/100}$ para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,1122	0,1122	471,5120**	0,0000
Tratamentos	4	0,0024	0,0006	2,5625ns	8,4617
Resíduo A	14	0,0033	0,0002		
Parcelas	19	0,1180	0,0062		
Ciclos	6	0,7042	0,1174	50,3379**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	0,0045	0,0002	0,0812ns	100,0000
Resíduo B	90	0,2098	0,0023		
Total	139	1,0365	0,0075		
Coef. Variação A: 6,1019		Coef. Variação B: 19,0989			

TABELA 68. Análise de variância dos dados de número de células (células/mililitro) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Bloos	1	1,0997	1,0997	37,1381**	0,0028
Tratamentos	4	2,3622	0,5906	19,9435**	0,0011
Resíduo A	14	0,4146	0,0296		
Parcelas	19	3,8765	0,2040		
Ciclos	6	3,1721	0,5287	22,3318**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	0,7972	0,0332	1,4030ns	12,8655
Resíduo B	90	2,1306	0,0237		
Total	139	9,9763	0,0718		
Coef. Variação A: 14,7173				Coef. Variação B: 13,1594	

TABELA 69. Análise de variância dos dados de matéria seca (g/100 ml) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	0,2649	0,2649	17,9421**	0,0831
Tratamentos	4	89,0184	22,2546	1507,3470**	0,0000
Resíduo A	14	0,2067	0,0148		
Parcelas	19	89,4900	4,7100		
Ciclos	6	13,2907	2,2151	358,2061**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	10,3137	0,4297	69,4931**	0,0000
Cic. d Trat. 1	6	1,8665	0,3111	50,3048**	0,0000
Cic. d Trat. 2	6	0,9722	0,1620	26,2028**	0,0000
Cic. d Trat. 3	6	4,4053	0,7342	118,7305**	0,0000
Cic. d Trat. 4	6	7,3090	1,2182	196,9899**	0,0000
Cic. d Trat. 5	6	9,0514	1,5086	243,9506**	0,0000
Trat. d Cic. 1	4	2,6533	0,6633	89,5211**	0,0000
Trat. d Cic. 2	4	6,0766	1,5191	205,0219**	0,0000
Trat. d Cic. 3	4	9,8141	2,4535	331,1273**	0,0000
Trat. d Cic. 4	4	13,9929	3,4982	472,1174**	0,0000
Trat. d Cic. 5	4	18,2349	4,5587	615,2418**	0,0000
Trat. d Cic. 6	4	20,1045	5,0261	678,3216**	0,0000
Trat. d Cic. 7	4	28,4559	7,1140	960,0951**	0,0000
Resíduo B	90	0,5566	0,0062		
Total	139	113,6510	0,8176		

Coef. Variação A: 3,5833 Coef. Variação B: 2,3191

Quadrado médio para comparações Trat. dentro Ciclos: 0,00074

Graus de liberdade para comparações Trat. dentro Ciclos: 87

Trat. 1: Test.; Trat. 2: 5%; Trat. 3: 10%; Trat. 4: 15%; Trat. 5: 20% (v/v).

TABELA 70. Análise de variância dos dados de rendimento alcoólico (%) para os diferentes níveis de sangria de células (Experimento 5).

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	NMS
Blocos	1	753,7143	753,7143	1500,7290**	0,0000
Tratamentos	4	34,7929	8,6982	17,3191**	0,0026
Resíduo A	14	7,0313	0,5022		
Parcelas	19	795,5384	41,8704		
Ciclos	6	160,5607	26,7601	25,6510**	0,0000
Trat. x Ciclos	24	18,4200	0,7675	0,7357ns	80,1991
Resíduo B	90	93,8917	1,0432		
Total	139	1068,4108	7,6864		
Coef. Variação A: 0,8379				Coef. Variação B: 1,2076	