



**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
E AGRÍCOLA**

**“Influência da Água de Maceração
de Milho na Produção de Leveduras
de Panificação”**

Ernani Sebastião Sant' Anna
Farmacêutico-Bioquímico

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de “MESTRE” em Ciência de Alimentos.

59i

48/BC

1979

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

Aos meus pais, que ensinaram-me a
encarar o futuro com naturalidade.

À minha esposa, fonte de estímulos,
amor e ternura.

INDICE

	Pág.
RESUMO	iii
SUMMARY	v
I. -INTRODUÇÃO	01
I.1.Objetivos	03
II. -REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
II.1.Histórico	04
II.2.Composição do meio de cultura	05
II.2.1.Água de maceração de milho	09
II.3.Aspectos nutricionais das leveduras	10
II.4.Fermentação	13
II.4.1.Aeração	13
II.4.2.Temperatura e pH	17
II.4.3.Anti-espumante	19
III.-MATERIAL E MÉTODOS	20
III.1.Microrganismo	20
III.1.1.Ativação	20
III.2.Substrato	20
III.2.1.Origem do melaço	20
III.2.2.Clarificação e desinfecção do melaço	21
III.2.3.Preparação do substrato	21
III.3.Nutrientes	21
III.4.Água de maceração de milho	22
III.4.1.Origem	22

III.4.2.Composição	22
III.5.Equipamentos	25
III.6.Fermentação	25
III.7.Experimentos realizados	26
III.8.Separação das células	28
III.9.Produção de gás	28
III.10.Técnicas de análises	29
IV. -RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
IV.1.Resultados	30
IV.1.1.Consumo de glicose	30
IV.1.2.Comportamento do pH durante a fermentação	30
IV.1.3.Biomassa produzida	31
IV.1.4.Produção de gás	32
IV.1.5.Etanol produzido	33
IV.2.Discussão dos resultados	34
IV.3.Índice de quadros, figuras, tabelas e anexos ...	39
V. -CONCLUSÕES	63
VI. -BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	65
AGRADECIMENTOS	72

RESUMO

A água de maceração de milho, produto obtido em processo no qual são removidas parte das substancias solúveis, contém em sua composição química os principais aminoácidos e nutrientes necessários para o desenvolvimento de leveduras de panificação.

A inclusão de água de maceração de milho nos meios de propagação de leveduras é estudada e relacionada com as necessidades nutricionais destes microrganismos.

Foi estudado o crescimento e produção de Saccharomyces cerevisiae, obtido a partir de fermento de panificação Flieschmann, a 30°C, pH 4,5 e agitação de 180 rpm com passo de 8 cm em 81 diferentes meios de cultura.

Quando melaço de cana é enriquecido com magnésio, fósforo, nitrogênio e suplementado com quantidades crescentes de água de maceração de milho, são observadas alterações benéficas na fermentação. Um bom rendimento de biomassa é encontrado, bem como uma minimização da produção de álcool e um aumento na capacidade de produção de gás pelas células produzidas.

Meios de crescimento, deficientes isoladamente, em magnésio, fósforo e nitrogênio são estudados e biomassa, álcool, produção de gás e pH atingem níveis ótimos com suplementação de 4,5% de água de maceração de milho. Quando qualquer destes tres elementos citados estão ausentes na composição de um único meio, resultados inferiores são obtidos.

A adição de fatores de crescimento como biotina, inositol e

ácido pantotênico foram estudados em meios com e sem água de maceração de milho e valores divergentes são encontrados mas que não podem ser atribuídos a deficiência do melaço de cana.

A capacidade de produção de gás pelas leveduras é estudada e comparada em meios contendo tiamina, citada como um estimulante, e em meios contendo tiamina e água de maceração de milho. Incrementos de 22,5 µg de tiamina por grama de açúcar, apresentam produção de gás da ordem de 71,5 ml/h por grama de levedura produzida.

SUMMARY

Corn steep liquor is a product obtained through a process in which the soluble parts are taken out. The product contains in the chemical composition the main amino acids and nutrients necessary to the development of bread yeast.

The inclusion of corn steep liquor in the environment for the propagation of yeast is studied and is related to the nutritional needs of these microorganisms.

The growth and procution of Saccharomyces cerevisiae, obtained from the yeast used to make dough Flieschmann, on 30°C, pH 4.5 and beating speed of 180 rpm, spaced 8 cm. from the other in 8l different kinds of culture are also studied.

When the cane-molasse is enriched with magnesium, phosphate, nitrogen, and supplemented with increasing amounts of corn steep liquor, beneficial alterations are observed in the fermentation process. A good working result of biomass, a minimization on alchool production as well as an increase in the capacity for gas production by the new-produced cells. Are foun: - the growth environment, which is deficient isolately, whem in magnesium, phosphate and nitrogen, is studied. Biomass, alcho-olgas production as well as the pH reached good levels with supplementation of 4.5% of corn steep liquor. Whenever any of the three elements named is not present in the composition of one environment, lower results are obtained.

The addition of growth-factors such as biotin, inositol -

and pantotenic acid, is studied in environments with or without corn steep liquor, and divergent values are found, but they cannot be attributed to the deficiency of cane molasse.

The gas production capacity by the yeast studied and compared in environment that contains tiamin, considered stimulant, and environment that contains tiamin and corn steep liquor. Increments of 22.5 $\mu\text{g/g}$ of sugar tiamin, present a gas production of 71.5 ml/h by gram of yeast produced.

I. INTRODUÇÃO

A história da utilização de leveduras de panificação tem seu início em 3000 A.C.. Daquela época, até os nossos dias os processos de obtenção das leveduras evoluíram de modo a suprir a crescente demanda do mercado consumidor.

Pesquisas nos campos de biologia, bioquímica, microbiologia e engenharia nos apresentam constantes inovações neste procedimento milenar: A fermentação de massas de panificação por Saccharomyces cerevisiae.

A busca constante de novas formas de substrato, que sejam abundantes e economicamente viáveis para a manufatura de leveduras de panificação, bem como uma melhor compreensão dos aspectos bioquímicos das leveduras tornam-se dia a dia prioridades para o desenvolvimento desta tecnologia.

A água de maceração de milho (AMM), subproduto do processamento da glicose, é encontrada com relativa abundância e tem demonstrado ser uma boa fonte para composição do meio de cultura para microrganismos, desde que possui em sua composição muitos elementos orgânicos e inorgânicos que podem satisfazer as exigências nutricionais das leveduras.

Até o presente momento no Brasil, as indústrias produtoras de levedura prensada para panificação não utilizam, em suas linhas de fermentação, água de maceração de milho como enriquecimento dos meios de cultura.

Atualmente o substrato usado no Brasil é o melaço de cana,

sub produto da produção de sacarose, que divide a sua utilização principalmente entre a produção de álcool etílico e leveduras de panificação.

Com perspectivas de superprodução de álcool etílico, como substituto do petróleo, a competição por substratos de melaço - poderá elevar os custos de produção de leveduras, tornando-se - pouco rentável em relação as destilarias.

Com tal probabilidade, a produção de leveduras para panificação talvez retorne a sua condição primitiva, isto é, subproduto da produção de álcool.

A água de maceração de milho poderá, em um futuro próximo - vir a colaborar pela estabilização dos custos de produção das leveduras, tanto pela substituição parcial do substrato como pela redução dos nutrientes adicionados normalmente.

I.1. OBJETIVOS

Verificar a influência de diferentes concentrações de água de maceração de milho (AMM) na produção de levedura de panificação.

Estudar a substituição de magnésio, fósforo e nitrogênio - do meio de cultura por AMM, e sua influência na produção de levedura.

Estudar a influência da complementação do meio de cultura - contendo um nível ótimo de AMM, com tiamina, biotina, inositol - e ácido pantotênico, isoladamente.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1. HISTÓRICO

Até meados do século XIX, as leveduras usadas em panificação eram obtidas como subprodutos das destilarias, as quais visavam apenas ao esmero da produção de álcool, não havendo preocupação em obter-se ao mesmo tempo uma produção maior e mais aperfeiçoada destes microrganismos. As leveduras assim obtidas supriam suficientemente a demanda, apresentando características adequadas para a produção doméstica de pão e para a pequena indústria de panificação da época (22).

O primeiro grande passo no desenvolvimento da tecnologia de leveduras surgiu com a introdução do processo Vienna em 1814. Até então as leveduras cresciam anaerobicamente em semi-sólido usando cereais como substrato. Com a introdução do novo processo as leveduras passaram a crescer aerobicamente, confirmando o efeito Pasteur. Posteriormente, durante a primeira guerra mundial os cereais foram substituídos por melaço de cana (10).

O clássico processo, no qual os nutrientes eram adicionados inicialmente, foi modificado pelo uso de uma alimentação contínua de nutrientes e carboidratos. Esta modificação, chamada processo Zulauf, trouxe como consequências uma alta produtividade e melhoria na qualidade das leveduras, particularmente -

na estabilidade (5).

O desenvolvimento tecnológico da produção de leveduras para panificação foi paralelo e dependente ao desenvolvimento da tecnologia de um modo geral. O descobrimento da síntese de amônia do nitrogênio atmosférico por processo catalítico por Haber e Bosch e a introdução do método de determinação da concentração hidrogeniônica por Sorensen, foram passos importantíssimos no desenvolvimento dos processos fermentativos (11).

O controle de variáveis como alimentação de substrato e nutrientes, aeração, temperatura e pH está se tornando paulatinamente mais eficiente com a introdução da automatização da fermentação (12).

II.2. COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para PEPPLER (1967 p.152) (35) os melaços de cana e de beterraba são as principais fontes de energia e de nutrientes para a propagação das leveduras. A escolha do substrato deve-se a disponibilidade, custo e a linhagem de levedura comercial utilizada. A composição dos melaços varia de acordo com a fonte geográfica, prática de agricultura e processamento na extração de açúcar.

As leveduras podem multiplicar-se em meios muito simples, contanto que contenha pequenas quantidades de diversos compostos "bios" oriundos de uma complementação ou do próprio substrato.

Muitos compostos "bios" tais como inositol, ácido pantotênico, beta-alanina, aneurina, biotina, piridoxina e outros tem sido citados como estimulantes do crescimento das leveduras, a maior parte delas estando contidas em quantidades adequadas em muitos substratos comerciais, principalmente nos melaços e água de maceração de milho (50) (18).

Segundo JORGENSEN (1959 p.281) (19), as leveduras contem vitaminas, principalmente do complexo B, que tem um papel importante nos processos metabólicos. Para a levedura prensada, uma análise das vitaminas acusa:

Tiamina	35,0	µg/g
Riboflavina	50,0	µg/g
Niacina	500,0	µg/g
Ácido pantotênico	120,0	µg/g
Piridoxina	30,0	µg/g
Biotina	1,1	µg/g
Ácido fólico	45,0	µg/g

Diante destas quantidades, é visível a necessidade do substrato conter tais elementos.

Por outro lado, ROGERS e NICKELSON (1948) (41) encontraram os seguintes valores para as vitaminas contidas no melaço de cana:

Tiamina	8,3	µg/g
Riboflavina	2,5	µg/g
Ácido pantotênico	21,4	µg/g
Ácido nicotínico	21,0	µg/g
Ácido fólico	0,038	µg/g
Piridoxina	6,5	µg/g
Biotina	1,2	µg/g

OLBRICH (1963) (32) comparando os nutrientes requeridos pelas leveduras e nutrientes contidos nos melaços (tabela 1) evidencia a carência de nitrogênio assimilável, fósforo e magnésio.

Estes resultados são confirmados por REED e PEPPLER (1973) (39) e discutidos em relação ao seu conteúdo nos melaços:

- Os melaços de cana são deficientes de fosfato. Em fermentações este anion é complementado com fosfato de amônia ou sais alcalinos de fosfato;

- Com raras exceções os melaços conseguem suprir o requerimento de potássio;

- Os melaços podem suprir as necessidades de cálcio, mas não suprem o requerido de magnésio. Pode-se usar sulfato de magnésio como suplemento;

- Sódio e sulfato estão em quantidades suficientes nos melaços para suprir as necessidades requeridas pelas leveduras;

- Os melaços de cana suprem satisfatoriamente a quantidade de biotina requerida pelas leveduras;

- Está em torno de 40 µg as necessidades de pantotenato para um ótimo crescimento das leveduras. Os melaços deficientes -

desta vitamina são raros;

- A tiamina requerida pelas leveduras é suprida pelos melaços. As leveduras podem adaptar-se parcialmente à ausência de tiamina, mas a inclusão desta nos processos fermentativos é comum, devido aos efeitos benéficos na fermentação de massas de panificação.

Alguns metais (traços) como zinco e cobalto são essenciais para satisfazer as leveduras. MADDIX et alii (1970) (23), estudando o efeito do zinco e do cobalto sobre o crescimento das leveduras, encontrou um efeito benéfico do zinco sobre o mesmo, quando o meio de cultura foi incrementado com 50 µg/ml de zinco, adicionado lentamente no decorrer da fermentação. O mesmo aconteceu com o incremento de cobalto, que acarretou um nível ótimo de crescimento quando usado 5 µg/ml. Acima destas quantidades, um efeito inibitório se manifestou.

Embora alguns trabalhos tenham demonstrado que Saccharomyces cerevisiae cresça na ausência de fosfato exógeno, esta hipótese é contestada por MARKHAM e BYRNE (1968) (24) que encontraram uma necessidade de 60 µg de fósforo por ml de meio, para um desenvolvimento eficiente de Saccharomyces cerevisiae.

Diversos inibidores como dióxido de enxofre, hidroximetilfurfural e ácidos graxos tem sido encontrados nos melaços de cana. A presença destes elementos, dependendo da concentração, podem trazer problemas na fermentação (5) (42).

Normalmente, os melaços contêm muitas impurezas que podem interferir no processo fermentativo. Para que tal fato não aconteça é necessário que o melaço seja clarificado. OLBRICH (1963) (32) (tabela 2), sugere dois tipos de processamentos para desinfecção e clarificação dos melaços envolvendo tratamentos térmico, físico-químico, químico e mecânico.

II.2.1. ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO (AMM)

A composição da água de maceração de milho é muito variável e depende de fatores regionais.

Durante muito tempo a água de maceração de milho (corn-steep liquor) tem se constituído em um aditivo muito útil para conseguir melhorar o crescimento de microrganismos ou para aumentar o rendimento dos produtos nos meios de cultura sintéticos (40)(38).

Constitui-se em uma fonte equilibrada de carbono, nitrogênio, enxofre e sais minerais. Muito tem sido estudado para isolar do mesmo algum ingrediente mágico, no entanto nada se conseguiu até agora (40).

PRESCOTT e DUNN (1962) (38) afirmam que quando se dispõe de água de maceração de milho (AMM)(corn-steep liquor) este pode servir como fonte de nitrogênio orgânico.

INGLETT (1970 p.223) (17) relata uma análise da composição da AMM, encontrando um pobre balanço de aminoácidos essenciais ,

mas uma boa fonte de vitaminas do complexo B, enquanto que as quantidades de fósforo, magnésio e potássio são críticas.

Em 1976, MORAES (28) trabalhando com Bacillus thuringiensis para a produção de inseticida bacteriano, encontrou na água de maceração de milho, juntamente com melaço e resíduos industriais, excelente substrato.

II.3. ASPECTOS NUTRICIONAIS DAS LEVEDURAS

Para um desenvolvimento ótimo, as leveduras requerem carbono, nitrogênio, vitaminas, minerais (traços) e água.

Um grande número de compostos de carbono é utilizado para o metabolismo e crescimento das leveduras. As cepas de Saccharomyces cerevisiae entretanto só podem utilizar hexoses como fonte de carbono (40).

Desta forma, glicose, frutose, galactose, maltose e sacarose são metabolizados integralmente enquanto que a rafinose parcialmente (19).

Mc MURROUGH e ROSE (1967) (29), encontraram variações na forma, tamanho, estrutura e composição da parede celular das leveduras (Saccharomyces cerevisiae) quando limitaram a quantidade de glicose como substrato. O teor de proteína e lipídeos decrescem tanto com a limitação de glicose como com a limitação de nitrogênio.

Estas observações coincidem com o trabalho desenvolvido por POLAKIS et alii (1964) (36).

Tanto a glicose quanto a frutose são incorporadas diretamente no ciclo glicolítico, mas sacarose e maltose são hidrolizadas (40).

SUOMALAINEN et alii (1972) (45) relata que as leveduras de panificação possuem altos níveis de atividade da invertase, assim a sacarose é rapidamente desdobrada em glicose e frutose.

Os hidratos de carbono encontram-se nas leveduras principalmente na forma de glicogênio. No início da fermentação, quando o meio de cultura contém açúcar em relativa abundância, aumenta o conteúdo glicogênico da célula da levedura e a concentração máxima é alcançada ao término da primeira fase de fermentação. Nesta fase começa a diminuir o conteúdo glicogênico, mesmo o açúcar estando presente no meio de cultura, transformando-se assim no alimento de reserva mais importante para as leveduras (19) (3).

A necessidade de compostos nitrogenados pelas leveduras pode ser suprida por nitrogênio orgânico ou inorgânico. Os aminoácidos são assimilados relativamente bem, incluindo alfa alanina, alfa aminoácido butírico, asparagina, ácido aspártico, ácido glutâmico, leucina, isoleucina, arginina, fenilalanina, serina, tirosina, ornitina ou metionina. Em geral um crescimento muito reduzido é observado com glicina, histidina, prolina, lisina ou triptofano (20) (13).

Para THORNE (1949) (48) os aminoácidos são assimilados in tactos e suprem não somente de nitrogênio as células mas também de carbono para a formação de proteínas. Desta forma, se a fonte de nitrogênio for somente amônia o carbono requerido para a síntese proteica tem que vir do açúcar. Por outro lado, se a fonte de nitrogênio é uma mistura de aminoácidos o açúcar é poupado e os aminoácidos são utilizados na formação de proteínas.

Segundo ROSEN (1968) (42), as linhagens mais frequentemente usadas para a produção de leveduras de panificação requerem, essencialmente, biotina, ácido pantotênico e inositol para um crescimento satisfatório. Tanto a oxibiotina como a destibiotina podem ser usadas como suplemento. A beta-alanina pode ser usada por muitas linhagens de leveduras como precursor do ácido pantotênico.

DIXON e ROSE (1964a) (7) estudando o crescimento de leveduras de panificação em meios deficientes de biotina, concluem - que o requerimento de biotina é absoluto, isto é, as leveduras não conseguem se adaptar à ausência desta vitamina e a razão para este requerimento específico pela biotina é que ela participa na síntese da maioria das enzimas.

Paralelamente, ocorrem alterações nas membranas vacuolares e citoplasmáticas, tendo sido estudadas e reveladas pelo microscópio eletrônico (8).

Da mesma forma, OURA et alii (1978) (33), relatam que a

biotina é um fator necessário para o crescimento das leveduras de panificação e quando a quantidade de biotina no meio é limitada os efeitos podem ser observados sobre todas as funções celulares. Não somente o crescimento é impedido, mas também o metabolismo de carboidratos, proteínas e a síntese de ácidos nucleicos (1).

O crescimento de Saccharomyces cerevisiae em meios deficientes de inositol resulta em mudanças na composição química da parede celular das leveduras as quais segundo POWER e CHALLINOR (1969) (37), contém pouca manose e muita glicose em relação aos níveis normais, levando a crer que o inositol é indispensável no metabolismo glicolítico, já que a multiplicação das células é levemente diminuída.

Também STEPHANOPOULOS e LEWIS (1968) (46) encontraram variações na parede celular quando leveduras crescem em meios deficientes de inositol ou inositol e biotina, encontrando mais fosfato do que quando as células crescem em meios completos.

II.4. FERMENTAÇÃO

II.4.1. AERAÇÃO

A glicose é fermentada tanto em condições anaeróbicas como aeróbicas. De acordo com MAXON e JOHNSON (1953) (25), o oxigênio é tido como o principal nutriente na obtenção de leveduras de panificação. Cerca de 1,0g de oxigênio é requerido para a produção

de 1,0g de levedura (mat. seca).

A inibição da fermentação pela presença de oxigênio molecular é um fenômeno conhecido há muito tempo para regular o metabolismo das leveduras. Este efeito reconhece que o crescimento por unidade de substrato na presença de ar é 5 a 10 vezes maior que o obtido anaerobicamente e por conseguinte no ciclo oxidativo as células usam glicose mais lentamente. Assim o efeito Pasteur é essencialmente um mecanismo para ajustar a velocidade de utilização da glicose no requerimento das células para síntese de energia e compostos intermediários (43) (44).

Sob condições aeróbicas duas fases de crescimento são observadas. Na primeira fase a glicose é utilizada para produção de energia. Durante esta fase a glicose é assimilada e o etanol excretado. Quando a glicose do meio é exaurida, segue-se a segunda fase de crescimento, onde a levedura utiliza o etanol previamente excretado como fonte de carbono (3).

A função exata da aeração no crescimento das leveduras tem sido objeto de considerável especulação, mas não exatamente definida.

Durante a primeira fase de crescimento MAXON e JOHNSON (25) encontraram um tempo de 1,7 horas para o crescimento logarítmico, para a segunda fase de crescimento, os valores encontrados foram da ordem de 8,5 horas.

BECK e MEYENBURG (1968) (2), encontraram 1,6 horas para a primeira fase de crescimento e 5 horas para a segunda fase.

Para FINN (1969) (9) o envolvimento do oxigênio na produção de leveduras de panificação é explícito e um estudo de transferência de oxigênio durante a propagação da levedura é necessário. O oxigênio é levemente solúvel em soluções aquosas e somente 0,2 mM é dissolvido no meio de propagação a 25°C. Sob condições de laboratório e industrialmente, leveduras de panificação são podem propagar-se intensamente se o meio for suficientemente saturado com oxigênio. O aumento do conteúdo de oxigênio pela introdução de ar leva a formação de bolhas, que não tem grandes efeitos se as mesmas desaparecem rapidamente. A agitação do meio tem o efeito de aumentar a área superficial efetiva do líquido presente em relação a atmosfera.

Basicamente a velocidade com que o oxigênio passa da atmosfera para a solução depende (16):

- Do grau com que o meio é saturado com oxigênio;
- Da área de interfase entre a atmosfera e o meio;
- Da facilidade com que o oxigênio passa através da interface.

Para ROSEN (1968) (42) a aeração no processo fermentativo das leveduras tem 3 finalidades:

- Suprir as células de leveduras com uma quantidade de oxigênio necessário para um ótimo crescimento. As células obtêm a energia necessário para as várias sínteses por depressão aerobi

ca de carboidratos pelo qual o dióxido de carbono e água são formados;

- Ejeção do dióxido de carbono formado;

- Agitação do líquido fermentante para que os nutrientes a dicionados sejam distribuídos através do líquido e para que as leveduras sejam dispersas no meio.

HOUGH et alii (1975) (16) estabeleceram uma equação geral - para a produção de leveduras de panificação a partir de melaços:

SACAROSE	+ AMÔNIA	+ OXIGÊNIO	-->	LEV.	+ ÁGUA	+ CO ₂	+ KCAL
200g	10,4g	102,5g		100g	72,2g	145,6g	387

Para WIMPENNY (1969) (51) a presença de oxigênio causa um aumento na atividade específica de um número de enzimas, citocromos e outras estruturas respiratórias, bem como a indução da formação de determinadas estruturas como a mitocôndria.

Desta forma confirma o pensamento de NURMINEN e SUOMALAINEN (1968) (31), que ao estudarem as alterações celulares provocadas pelo desenvolvimento da respiração, encontraram formações de precursores mitocondriais e posterior formação de mitocôndria.

As mitocôndrias das leveduras de panificação são ricas em lípidos (25%) e fosfolípidos (12,8%), também tem baixas concentrações de ergosterol e ácido desoxiribonucleico. Ainda que primariamente esteja relacionada com a conversão aeróbica de energia (atividade respiratória), a mitocôndria das leveduras -

sintetiza proteína (39).

II.4.2. TEMPERATURA E pH

WHITE (1951) (52) associou a produção de leveduras com a quantidade total de açúcar consumido, obtendo percentuais variáveis em função da temperatura usada na fermentação. Assim, a velocidade total de assimilação de açúcar pela linhagem de levedura empregada aumenta quase que linearmente entre 20°C e 40°C, sendo que para 40°C a produção foi de 26,6%. A velocidade de assimilação de açúcar depende também do açúcar usado na produção - de novas células e do açúcar fermentado à álcool. A taxa de absorção é máxima a 36°C mas a velocidade de fermentação é máxima a 40°C, segue-se que a produção de leveduras decresce rapidamente entre 36°C e 40°C. A produção de leveduras praticamente não é afetada entre as temperaturas de 30°C e 36°C.

Segundo MERRITT (1966) (27) a variação da temperatura de fermentação influencia diretamente algumas das propriedades das leveduras, particularmente a capacidade de formar dióxido de carbono. A produção de dióxido de carbono é máxima no intervalo de temperatura entre 32°C e 35°C, e a taxa de produção de gás aumenta com o aumento do período de incubação e não com o aumento da temperatura. A produção de álcool é máxima a 25°C, embora uma alta taxa de álcool e glicerol seja obtida a 30°C.

O comportamento das leveduras diante da temperatura não é uniforme, mas a variação não é muito significativa. Saccharomy -

ces carlsbergensis, por exemplo, tem o seu ótimo de atuação a 30°C, que é a mesma temperatura ótima para Saccharomyces cerevisiae (21) (49).

WALSH e MARTIN (1977) (49) estudando dez linhagens de Saccharomyces cerevisiae, encontraram uma temperatura ótima de crescimento na faixa de 30-35°C, enquanto que a temperatura máxima para um crescimento lento esteve entre 37,5°C e 39,8°C.

Em fermentação comercial a faixa de temperatura é normalmente restrita a 25-35°C (5). A temperatura superior desta faixa deve-se ao desenvolvimento de calor. Devido a isto, alguma atenção tem sido dedicada ao desenvolvimento de linhagens de leveduras capazes de dar boa produção e qualidade a altas temperaturas de operação. A aparente inabilidade para adaptar-se a altas temperaturas pode ser associada com o baixo requerimento de cálcio comparado com o das bactérias. O cálcio é citado como um protetor das enzimas diante da desnaturação.

Muitas linhagens de leveduras de panificação crescem muito bem em valores de pH entre 3,6 e 6,0 mas o pH ótimo situa-se entre 4,5 e 5,0. Em fermentações comerciais e experimentais o pH pode ser controlado pela quantidade de amônia alimentada. Altas concentrações de sulfato de amônia baixam o pH quando o íon amônia é utilizado pelas leveduras, embora inicialmente o pH seja elevado (22).

Na maioria das vezes é desejável o crescimento em pH baixo,

para diminuir o inconveniente da contaminação. Por outro lado as leveduras absorvem pigmentos dos melaços quando o pH é muito baixo, dando leveduras de panificação muito escuras (5) (35) (14).

II.4.3. ANTI- ESPUMANTE

A incorporação de quantidades substanciais de ar no decorrer da fermentação leva a formação de espuma conforme citado (39). - Quando em volumes consideráveis a espuma pode ser um problema, - diminuindo o volume de trabalho, dando margem a contaminação e perda de rendimentos por flotação dos microrganismos (5).

Normalmente são usados agentes químicos como anti-espumante, como alcoois, ésteres, silicone e derivados de ácidos graxos. A adição de anti-espumante deve ser controlada, porque quando em excesso reduz a taxa de absorção de oxigênio (4).

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1. MICROORGANISMO

A levedura usada neste estudo foi uma linhagem de Saccharomyces cerevisiae, obtida na forma de levedura prensada produzida comercialmente por Fleischmann e Royal S.A., com 73% de umidade.

III.1.1 ATIVACÃO

Foi preparado um inóculo de tal forma a conter 10% de leveduras ativas em meio contendo melaço (5% de açúcares redutores), e nutrientes. O inóculo passou por dois estágios de ativação. O primeiro (G1) de 12 horas em condições anaeróbias. O segundo (G2) feito a partir do primeiro. Neste estágio as condições são aeróbicas (agitação de 180 rpm) e dura aproximadamente 6 horas.

III.2. SUBSTRATO

Foi utilizado melaço de cana de açúcar e sacarose p.a.

III.2.1. ORIGEM DO MELAÇO

Foi utilizado melaço de cana (mel final), contendo 60% de açúcares redutores (como glicose), obtido na Usina de Açúcar Tijucas S.A.

III.2.2. CLARIFICAÇÃO E DESINFECÇÃO DO MELAÇO

Inicialmente o melaço foi diluído até 15º Brix. Em seguida, o pH foi regulado em 4,5 e adicionou-se 2% de superfosfato (sobre o peso do melaço). A solução foi aquecida a 90°C durante 10 minutos, obtendo-se desta forma uma coagulação parcial das proteínas e resíduos proteicos, bem como uma precipitação dos compostos insolúveis. A solução foi esfriada até 40°C e centrifugada a 5000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado com o nome de melaço de cana clarificado.

III.2.3. PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO

O melaço clarificado e desinfetado foi diluído até 5% de açúcares redutores. Os nutrientes foram adicionados. Foi feita uma esterilização (121°C - 15 minutos), tempo suficiente para eliminar outras formas de microrganismos que possam interferir na fermentação.

O pH foi acertado para 4,5 após o esfriamento da solução.

O inóculo foi adicionado aos erlenmeyer especialmente preparados (com defletores) e o volume completado para 100 ml.

Foi feita nova correção do percentual de açúcares redutores.

Em seguida os frascos de fermentação foram levados ao agitador.

III.3. NUTRIENTES

Os nutrientes utilizados para suplementar o substrato foram

os seguintes (50):

Fosfato monoamônico	0,6 %
Fosfato monopotássico	0,02%
Sulfato de magnésio	0,02%

Fosfato monoamônico foi substituído por sulfato de amônio na mesma concentração quando o experimento V foi utilizado.

A tiamina, biotina, inositol e ácido pantotênico usados foram fornecidos pela Merck.

III.4. ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO (AMM)

III.4.1. ORIGEM

A AMM utilizada neste trabalho foi obtida na Refinações de Milho Brasil Ltda, a mesma é distribuída com o nome comercial - de Milhocina.

Parte do material recebido foi estocado a -10°C e o restante distribuído em tubos de ensaios para posterior esterilização.

III.4.2. COMPOSIÇÃO

Os dados da composição aproximada da AMM foram obtidos diretamente da Refinações de Milho Brasil Ltda.

Como as variedades de milho variam de região para região os valores que seguem são variáveis e representam uma média de lotes.

Água	55,0%
Ácido láctico	10,0%
Óleo	1,0%
Proteína	22,0%
Cinzas	4,5%
Açúcares redutores	4,0%
Solúveis	43,0%
Carbohidratos	7,5%
pH	4,0

Aminoácidos

Alanina	1,8 %
Arginina	1,1 %
Ácido aspártico	1,4 %
Cistina	0,8 %
Ácido glutâmico	3,5 %
Treonina	0,9 %
Glicina	1,1 %
Histidina	0,7 %
Isoleucina	0,7 %
Leucina	2,0 %
Lisina	0,8 %
Triptofano	0,05%
Metionina	0,5 %
Fenilalanina	0,8 %
Prolina	2,0 %
Serina	1,0 %

Trionina	0,9 %
Tirosina	0,5 %
Valina	1,2 %

Vitaminas

Biotina	0,3 (mg/Kg)
Cholina	3.500,0 (mg/Kg)
Inositol	6.000,0 (mg/Kg)
Niacina	80,0 (mg/Kg)
Ácido pantoténico	15,0 (mg/Kg)
Piridoxina	9,0 (mg/Kg)
Riboflavina	6,0 (mg/Kg)
Tiamina	3,0 (mg/Kg)

Minerais

Cálcio	0,14 %
Cobre	15,0 (mg/Kg)
Manganês	20,0 (mg/Kg)
Ferro	100,0 (mg/Kg)
Magnésio	0,6 %
Potássio	2,8 %
Sódio	0,1 %
Fósforo	1,8 %
Selenio	0,3 (mg/Kg)
Zinco	60,0 (mg/Kg)
Enxofre	0,6 %

III.5. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos usados tiveram as seguintes características:

Frascos de agitação:

Foram feitas modificações em erlenmeyer de 500 ml de tal forma a ter tres aletas internas que permitissem uma melhor agitação e consequente aeração.

Agitador:

Fabricação própria, com capacidade para 16 frascos de 500 ml. Rotação fixa de 180 rpm com passo de 8 cm (anexo 1).

Equipamentos complementares:

Espectrofotometro Spectronic 20 da Bausch and Lomb.

Balança Sautter (max.200 mg, div.1200 g).

Balança Mettler P 1210 (max.1200 g, div.10 mg).

Estufa para secagem Fabbe com temperatura regulável até 120°C.

Potenciometro pH meter E 520 Metrohm.

Autoclave Fabbe mod. 103 para esterilização.

Centrífuga Janetzki K 24 max. de 20000 rpm.

III.6. FERMENTAÇÃO

A fermentação transcorreu nas seguintes condições: 180 rpm , com passo de 8 cm e 30°C $\pm$ 2°C.

A temperatura da sala de fermentação e consequentemente da fermentação, foi regulada por meio de aquecedor elétrico e exaustor.

O inóculo foi de 10% (v/v), dando uma concentração celular de 1,0 g $\pm$ 0,05 g (73% de umidade).

O volume de trabalho no agitador foi de 100 ml.

O pH foi acertado em todas as corridas em 4,5.

Como anti-espumante foi usado lanolina comercial.

III.7. EXPERIMENTOS REALIZADOS

Nos 15 experimentos relacionados a seguir, foram testados 81 meios de cultura cuja composição é dada no respectivo experimento.

- I. - Melaço de cana clarificado (contendo 5% de açúcares redutores), sem qualquer adição de nutrientes suplementado - com concentrações crescentes de água de maceração de milho (1,0 a 6,0%, intervalo de 0,5%).
- II. - Melaço de cana clarificado enriquecido com nutrientes e suplementado com quantidades crescentes de AMM (0,5 a 4,0%, intervalo de 0,5%).
- III. - Melaço de cana clarificado mais nutrientes sem AMM.
- IV. - Melaço de cana clarificado mais nutrientes com exceção - do magnésio suplementado com quantidades crescentes de AMM (0,5 a 3,5%, intervalo de 0,5%).
- V. - Melaço de cana clarificado mais nutrientes com exceção - do fósforo suplementado com quantidades crescentes de AMM (0,5 a 4,0%, intervalo de 0,5%).

- VI. - Melaço de cana clarificado mais nutrientes com exceção - do nitrogênio suplementado com quantidades crescentes de AMM (0,5 a 4,0%, intervalo de 0,5%).
- VII. - Sacarose mais nutrientes suplementado com quantidades - crescentes de AMM (0,5 a 5%, intervalo de 0,5%).
- VIII. - Melaço de cana clarificado enriquecido com nutrientes e 3% de AMM suplementado com quantidades crescentes de tiamina (7,5; 15,0; 22,5; 30,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).
- IX. - Melaço de cana clarificado mais nutrientes e quantidades crescentes de tiamina (7,5; 15,0; 22,5; 30,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).
- X. - Melaço de cana clarificado enriquecido com nutrientes e 3% de AMM e suplementado com quantidades crescentes de biotina (0,5; 1,0; 1,5 $\mu\text{g/g}$ melaço).
- XI. - Melaço de cana clarificado enriquecido com nutrientes e quantidades crescentes de biotina (0,5; 1,0; 1,5 $\mu\text{g/g}$ melaço).
- XII. - Melaço de cana clarificado, enriquecido com nutrientes e 3% de AMM e suplementado com quantidades crescentes de inositol (100,0; 200,0; 300,0; 400,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).
- XIII. - Melaço de cana clarificado, enriquecido com nutrientes e quantidades crescentes de inositol (100,0; 200,0; 300,0; 400,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).

XIV. - Melaço de cana clarificado, enriquecido com nutrientes e 3% de AMM e suplementado com quantidades crescentes de ácido pantotênico (5,0; 10,0; 15,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).

XV. - Melaço de cana clarificado, enriquecido com nutrientes e quantidades crescentes de ácido pantotênico (5,0; 10,0; 15,0 $\mu\text{g/g}$ melaço).

III.8. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS

O conteúdo de células foi determinado por duplicata.

Tomou-se 20 ml do fermentado e efetuou-se uma centrifugação a 2500 rpm. As células foram re-suspensas com tres porções de 10 ml de água destilada e re-centrifugadas.

O tubo contendo as células foi seco a 105°C e determinada a biomassa.

Para a leitura da densidade ótica as células foram redissolvidas em água destilada, após a centrifugação. A amostra padrão foi uma suspensão a 1% de levedura (a mesma usada como inóculo) em água destilada.

III.9. PRODUÇÃO DE GÁS

A capacidade de produção de gás pelas leveduras foi avaliada através do aparelho de Hayduck (anexo 2).

Foi preparado 400 ml de um meio contendo 10% de sacarose. Adicionou-se os seguintes nutrientes: 2 gotas de fosfato de amônia saturado, 0,25 g de sulfato de magnésio e 0,20 g de sulfato-

de cálcio.

Para a produção de gás as células não foram centrifugadas. O volume do meio de cultura usado como amostra foi transformado em suspensão com 27% de sólidos.

Juntou-se 20 ml da suspensão contendo leveduras. Deixou-se em banho-maria a 30°C por 1 hora. Decorrido este tempo o frasco é acoplado ao aparelho de Hayduck para determinação do gás formado (30). A pressão, temperatura de trabalho e o período de tempo foram respectivamente 760 mm Hg, 30°C e 60 minutos.

III.10. TÉCNICAS DE ANÁLISES

III.10.1. As análises de açúcares redutores (expresso em glicose) foram feitas segundo o método de Fehling (30).

III.10.2. O álcool produzido foi determinado tomando-se 5 ml da amostra, destilando-se e recolhendo o destilado lentamente em dicromato de potássio e ácido sulfúrico. A amostra foi lentamente aquecida. O destilado foi diluído até 200 ml com água destilada. Foi adicionado 15 ml de iodeto de potássio e titulado com tiossulfato de sódio-padronizado (34).

III.10.3. A umidade foi determinada pelo método gravimétrico com etanol (26) (6).

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. RESULTADOS

IV.1.1. CONSUMO DE GLICOSE:

O comportamento da fermentação em relação ao consumo de glicose pode ser observado nos quadros 1 a 14 através do tempo de fermentação.

O processo de fermentação foi considerado terminado no momento em que o percentual de glicose chegou a zero ou bem próximo deste.

Para o experimento I o consumo de glicose caiu de 12 horas para 10 horas com o aumento da suplementação com AMM, em torno de 4,5% (quadro 1).

Os experimentos realizados II a XV não apresentaram variações significativas no tempo gasto para o consumo de glicose (quadros 2 a 14).

A figura 1 apresenta o consumo de glicose no meio de cultura do experimento II com 3% de AMM em relação ao experimento III, similar sem AMM.

IV.1.2. COMPORTAMENTO DO pH DURANTE A FERMENTAÇÃO:

Embora as variações de pH não tenham sido significativamente diferentes pode-se notar que o aumento do pH final é paralelo ao

crescimento das concentrações de AMM e biomassa produzida nos meios de cultura dos experimentos I, II, IV, V, VI e VII (quadros 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Nos meios de cultura dos experimentos IV, V e VI (quadros 3, 4 e 5) deficientes em magnésio, fósforo e nitrogênio respectivamente, o pH não ultrapassou a 5,1 mesmo quando a biomassa produzida foi equivalente aos melhores rendimentos dos meios dos experimentos I e II (quadros 1 e 2).

Os quadros 7, 9, 11 e 13 mostram os valores finais do pH para os meios de cultura dos experimentos VIII, X, XII e XIV contendo quantidades variáveis de biotina, tiamina, inositol e ácido pantotênico e 3% de AMM. Observa-se um comportamento distinto em relação aos meios similares IX, XI, XIII e XV (quadros 8, 10, 12, e 14), sem AMM. Nos meios contendo AMM o pH final variou de 4,5 a 5,5 enquanto que nos meios não enriquecidos com água de maceração de milho o pH variou de 4,5 a 5,0.

IV.1.3. BIOMASSA PRODUZIDA:

O rendimento máximo de biomassa, em relação a fonte de carbono, variou de 38 a 39%.

Nos meios I, II, IV, V, VI e VII a produção cresce e estabiliza-se a medida que a concentração de AMM aumenta.

O quadro 6 mostra uma baixa produção de biomassa para o meio do experimento VII, cujo substrato é a sacarose. O rendimento máximo (fonte de carbono) esteve em 27,6% mesmo suplementado com 5% de AMM.

Os meios dos experimentos VIII, X, XII e XIV (quadros 7, 9, 11 e 13) suplementados com AMM e vitaminas, quando comparados com os meios dos experimentos IX, XI, XIII e XV (quadros 8, 10, 12 e 14) sem AMM, apresentam uma produção de biomassa bem mais significativa.

A figura 2 mostra o comportamento da produção de leveduras - para um intervalo de 11 horas, entre o meio do experimento II com 3% de AMM e o meio do experimento III, que não contém AMM.

A figura 3 apresenta a biomassa produzida traduzida em densidade ótica.

IV.1.4. PRODUÇÃO DE GÁS:

Os quadros 1 a 6 mostram que o desenvolvimento de gás foi proporcional às quantidades de biomassa produzida.

O experimento I (quadro 1) apresenta uma produção de gás da ordem de 27,8 ml/h por grama de levedura (27% de sólidos) quando suplementado com 1,0% de AMM. Quando usado 6%, o gás produzido é da ordem de 54,0 ml/h por grama de levedura contida no meio.

Para o experimento II (quadro 2) a maior quantidade de gás - produzida foi aquela obtida com suplementação de 3% de AMM, sendo de 59,2 ml/h por grama de levedura contida no meio.

Nos experimentos IV, V e VI (quadros 3, 4 e 5), deficientes em magnésio, fósforo e nitrogênio apresentam volumes máximos de produção de gás de 57,6; 61,0 e 58,7 ml/h por grama de levedura - contida no meio respectivamente. Estes meios continham 3,5; 4,0 e 4,0% de AMM.

Quando se usou sacarose como substrato (experimento VII e

quadro 6) obteve-se uma produção de gás de 9,5 ml/h/g de levedura para a suplementação com 0,5% de AMM. Usando 5% de suplementação o volume de gás produzido continua baixo, 41,5 ml/h/g de levedura.

Nos experimentos VIII e IX a quantidade de gás produzida foi crescente em relação a tiamina adicionada, sendo que o máximo de produção de gás foi obtido com 22,5 µg/g de tiamina por grama de açúcar (quadros 7 e 8).

No experimento VIII (quadro 7), quando suplementado com 22,5 µg de tiamina por grama de açúcar, apresenta uma produção de gás de 71,5 ml/h por grama de levedura do meio.

Para os experimentos X, XI, XII, XIII, XIV e XV (quadros 10, 11, 12, 13 e 14) a produção de gás não apresentou valores significativos com o incremento crescente de biotina, inositol e ácido - pantotênico.

A figura 4 apresenta a influencia da concentração de AMM, na produção de gás no experimento II.

IV.1.5. ETANOL PRODUZIDO:

Os meios dos experimentos I, II, IV, V, VI e VII (quadros 1 a 6) apresentam uma produção de etanol decrescente em relação a concentração de AMM.

A menor quantidade de álcool produzida foi encontrada no experimento II (quadro 2) com 3% de AMM, tendo sido obtido 14 g/l.

O quadro 6 mostra o experimento VII com 0,5% de AMM apresentando uma produção muito alta (33,0 g/l) de álcool.

Os meios dos experimentos VIII a XV apresentaram variações na produção de etanol, podendo ser observado que aqueles contendo

AMM atingem valores bem menores que os correspondentes sem AMM (quadros 6 a 14).

Na figura 5 temos o comportamento do etanol produzido durante 11 horas de fermentação, quando usado o meio do experimento II com 3% de AMM e o seu similar sem AMM (experimento III).

IV.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Comparando os quadros 1, 2 e 6 observa-se que o meio de cultura mais adequado é aquele que utiliza melaço de cana como substrato suplementado com 3% de AMM. Neste meio ocorreu a melhor produção de biomassa em consequência de uma pequena produção de álcool e uma ótima capacidade das leveduras produzidas em formar gás. Neste experimento o incremento de concentrações acima de 3% de AMM não acusou produções de biomassas satisfatórias.

A concentração celular que poderia funcionar como um fator inibidor, não ultrapassou a 2,22%, estando bem abaixo do nível crítico de 4,5% apontado por REED e PEPPLER (39).

A possibilidade de um incremento no metabolismo levando a formação de metabólitos tóxicos pode ser aventada, como por exemplo a formação de alcoois superiores, como óleo fusel, os quais são produzidos pelas leveduras durante a utilização dos aminoácidos (15).

É conhecida a alta toxicidade do cobre para as leveduras e a moderada ação tóxica do selenio e zinco (50), presentes na água de maceração de milho. Tais minerais podem ter afetado a composi-

V.2. Ensaio biológico

Os animais foram divididos em tres grupos de seis animais e colocados em gaiolas individuais equipadas com comedores e bebedouros destacáveis. A ração e a água foram oferecidas "ad libitum" durante o ensaio. O consumo de ração e o peso dos animais foram verificados de dois em dois dias, durante 28 dias. As fezes foram recolhidas, secas e armazenadas para determinação de nitrogênio total.

V.2.1. Coeficiente de Eficácia Alimentar (C.E.A.)

Foi calculado dividindo-se o ganho de peso dos animais pela quantidade de ração ingerida durante 28 dias.

V.2.2. Coeficiente de Eficácia Protéica (C.E.P.)

Foi calculado dividindo-se o ganho de peso dos animais pela quantidade de proteína ingerida durante 28 dias.

V.2.3. Coeficiente de Digestibilidade aparente (C.D.ap)

Foi calculado através da relação entre o nitrogênio absorvido e o nitrogênio ingerido ($NA/NI \times 100$).

tol e ácido pantotênico são adicionados sem a suplementação de AMM, também não teve variações significativas com a variação das concentrações destas vitaminas. Entretanto, com a introdução de 3% de AMM houve um incremento na produção de células que oscilou entre 23,4% e 37,5%. Este aumento na produção de células não pode ser atribuído ao incremento vitamínico, contido na AMM. Já que as vitaminas adicionadas isoladamente deram pequenas produções. Segundo THORNE (1949) (48), os aminoácidos são assimilados intactos e utilizados na síntese proteica da parede celular, poupando a principal fonte de carbono, o açúcar, para posterior metabolização quando todo o aminoácido estiver assimilado. A AMM possui uma mistura de aminoácidos que são assimilados relativamente bem (20) (13), que podem ter influenciado no aumento da produção de células no decorrer da fermentação.

Quando as fontes de nitrogênio são sais de amônia, particularmente fosfato e sulfato de amônia, o meio é acidificado lentamente devido a assimilação do íon NH_4 liberando na solução o anion HPO_4 ou HSO_4 . Esta acidificação é gradativamente diminuída pela assimilação de nitrogênio orgânico e pela formação de catabólitos de caráter básico. O nitrogênio orgânico é assimilado pelas leveduras de maneira mais eficiente que o inorgânico, aumentando mais rapidamente o pH do meio. Esta pode ser a razão pelo qual o pH dos meios contendo AMM apresentou valores superiores ao pH daqueles meios em que a AMM esteve ausente.

O pH final máximo de 5,5 para os experimentos contendo AMM pode ser considerado normal, considerando-se que STROHM e DALE - chegam a pH da ordem de 6,2 com ótimos resultados (47).

Quando o meio utilizado foi aquele com nutrientes adicionado de AMM (experimento II), a concentração celular chegou a 2,22% (27% de sólidos), incluindo o inóculo, isto equivale a dizer que 8,22% do volume líquido da fermentação consiste de células de leveduras. Estes resultados não são considerados altamente rentáveis quando comparados com aqueles obtidos em uma propagação em escala industrial. Na prática comercial a concentração de leveduras no fermentador atinge de 3,5% a 4,5% (27% de sólidos) ou seja, 13 a 16,6% do volume líquido, quando então a propagação finda por inabilidade das leveduras desenvolverem-se em tal meio. Esta concentração é atingida após 30 horas de fermentação, quando as leveduras já aumentaram em cerca de oito vezes a concentração inicial. Para tanto, a alimentação do substrato é contínua e mantida o mais baixo possível (0,5 a 1,0%). A concentração excessiva de carboidratos no meio de propagação (maior que 5%) tem efeitos inibitórios (5).

Como este trabalho desenvolveu-se em pequenos volumes, a concentração de açúcar inicial esteve acima do ótimo (5% de açúcares resutores), visando um período de fermentação suficientemente longo (10 a 12 horas) para englobar toda a fase de multiplicação logarítmica. Este fato pode ter contribuído para uma queda do rendimento em biomassa.

Dentre os resultados obtidos nos experimentos realizados destaca-se a produção de gás de 59,2 ml/h por grama de levedura quando o meio de cultura foi suplementado com 3% de AMM. Sendo que quando adicionou-se 22,5 microgramas de tiamina por grama de açú

car, atingiu-se 71,5 ml/h por grama de levedura.

Resultados de literatura (27) mostram que a 30°C e 60 minutos foi obtido 54,81 ml/h por grama de levedura, enquanto que nessas condições o teor de álcool obtido foi de 53,8 g/l. Menores concentrações de álcool foram obtidas a 40°C e 45°C respectivamente 29,9 g/l e 10,6 g/l.

INDICE

IV.3. Quadros, Figuras, Tabelas e Anexos.

	Quadros:	Pág.
Quadro 1 a 6	-Fermentação em função da concentração de AMM	40
Quadro 7 e 8	-Fermentação em função da concentração de tiamina	46
Quadro 9 e 10	-Fermentação em função da concentração de biotina	48
Quadro 11 e 12	-Fermentação em função da concentração de inositol	50
Quadro 13 e 14	-Fermentação em função da concentração de ácido pantotênico	52

Figuras:

Figura 1 - Consumo de glicose	54
Figura 2 - Biomassa produzida	55
Figura 3 - Curva de crescimento no experimento II	56
Figura 4 - Influencia da concentração de AMM na produção de gás	57
Figura 5 - Produção de etanol	58

Tabelas:

Tabela 1 - Nutrientes contidos nos melaços	59
Tabela 2 - Tratamento de melaços	60

Anexos:

Anexo 1 - Agitador	61
Anexo 2 - Aparelho de Hayduck	62

QUADRO 1

EXPERIMENTO I: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE AMM.

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL	T (%)
1,0	1,29	43,5	36,5	12	4,6	67
1,5	1,35	53,0	32,5	11	4,6	65
2,0	1,42	63,0	31,0	11	4,6	63
2,5	1,61	74,0	29,5	11	4,7	57
3,0	1,61	79,0	26,5	11	4,7	57
3,5	1,68	86,5	23,0	11	4,8	56
4,0	1,68	87,0	21,5	11	4,8	56
4,5	1,82	93,5	19,5	10	4,9	46
5,0	1,89	99,5	19,0	10	5,1	44
5,5	1,93	108,0	18,5	10	5,3	44
6,0	1,93	119,0	18,5	10	5,4	43

QUADRO 2

EXPERIMENTO II e III: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE AMM.

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL	T (%)
0,5	1,58	76,5	23,0	11	4,8	61
1,0	1,70	97,5	21,0	11	4,8	55
1,5	1,78	108,0	19,5	11	4,9	54
2,0	1,85	116,5	19,0	11	5,1	48
2,5	1,95	127,0	17,0	11	5,1	43
3,0	1,95	131,5	14,0	11	5,3	43
3,5	1,85	124,0	15,0	10	5,4	47
4,0	1,74	109,5	16,8	10	5,5	56
0,0	1,167	31,0	25,5	11	4,8	70

QUADRO 3

EXPERIMENTO IV: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMM SUBSTITUINDO MAGNÉSIO.

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
0,5	1,52	76,0	29,0	11	4,7
1,0	1,54	82,5	29,3	11	4,7
1,5	1,68	89,5	27,0	10	4,8
2,0	1,76	98,0	21,5	10	4,8
2,5	1,80	110,5	19,0	10	4,8
3,0	1,86	121,0	17,5	10	4,9
3,5	1,90	125,5	17,0	10	5,0

QUADRO 4

EXPERIMENTO V: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE AMM SUBSTITUINDO FÓSFORO.

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
0,5	1,51	81,5	28,0	11	4,6
1,0	1,57	88,0	27,8	11	4,6
1,5	1,70	94,0	22,0	11	4,7
2,0	1,80	108,5	19,0	11	4,9
2,5	1,82	115,5	17,5	10	4,9
3,0	1,87	124,0	17,0	10	4,9
3,5	1,92	129,5	16,0	10	5,0
4,0	1,92	133,0	15,5	10	5,1

EXPERIMENTO VI: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO
DE AMM SUBSTITUINDO O NITROGÊNIO

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
0,5	1,49	75,5	29,8	11	4,5
1,0	1,52	83,0	28,5	11	4,5
1,5	1,68	91,5	26,0	11	4,6
2,0	1,77	97,5	21,0	11	4,6
2,5	1,77	103,0	19,5	11	4,6
3,0	1,91	118,5	18,5	11	4,7
3,5	1,91	125,2	17,0	11	4,8
4,0	1,91	128,0	16,0	11	4,9

EXPERIMENTO VII: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM SACAROSE MAIS NUTRIENTES
EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMM.

CONCENTRAÇÃO AMM (%)	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)
0,5	0,99	12,0	33,0	12
1,0	1,07	15,5	33,0	12
1,5	1,11	20,5	31,5	12
2,0	1,16	23,0	30,5	12
2,5	1,21	29,0	29,0	12
3,0	1,28	37,0	28,5	12
3,5	1,31	45,5	28,0	11
4,0	1,36	56,0	25,5	11
4,5	1,38	63,5	23,5	11
5,0	1,38	68,5	21,0	11

QUADRO 7

EXPERIMENTO VIII: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM NUTRIENTES E 3% AMM, EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TIAMINA.

CONCENTRAÇÃO TIAMINA µg/g de Açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
7,5	1,97	145,5	16,5	11	5,3
15,0	1,93	152,0	12,0	11	5,3
22,5	1,96	159,5	15,5	11	5,2
30,0	1,89	158,0	17,5	11	5,3

EXPERIMENTO IX: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM NUTRIENTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TIAMINA.

CONCENTRAÇÃO TIAMINA µg/g de açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
7,5	1,210	48,5	29,5	11	4,7
15,0	1,18	63,0	31,0	11	4,9
22,5	1,23	69,5	23,5	11	5,0
30,0	1,16	66,0	26,5	11	4,9

QUADRO 9

EXPERIMENTO X: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM NUTRIENTES E 3% AMM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOTINA.

CONCENTRAÇÃO BIOTINA µg/g de açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
0,5	1,94	135,0	15,0	11	5,3
1,0	1,96	133,5	13,5	11	5,3
1,5	1,95	132,0	16,0	11	5,4

QUADRO 10

EXPERIMENTO XI: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM
NUTRIENTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOTINA.

CONCENTRAÇÃO DE BIOTINA µg/g de açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
0,5	1,35	60,5	26,0	11	4,9
1,0	1,50	74,0	21,0	11	4,9
1,5	1,45	66,5	21,0	11	4,9

QUADRO 11

EXPERIMENTO XII: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM NUTRIENTES E 3% DE ANM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL.

CONCENTRAÇÃO INOSITOL µg/g de açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
100	1,91	128,5	16,5	11	5,4
200	1,96	128,0	14,3	11	5,4
300	1,92	138,0	15,0	11	5,3
400	1,95	133,5	14,5	11	5,4

QUADRO 12

EXPERIMENTO XIII: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO MAIS NUTRIENTES
EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INOSITOL.

CONCENTRAÇÃO INOSITOL µg/g de melaço	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	PH FINAL
100	1,45	70,5	18,5	11	5,0
200	1,50	61,0	20,4	11	4,9
300	1,30	69,5	19,4	11	5,0
400	1,50	67,0	23,5	11	4,8

QUADRO 13

EXPERIMENTO XIV: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO COM NUTRIENTES E 3% DE AMM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO PANTOTÊNICO.

CONCENTRAÇÃO ÁCIDO PANTOTENICO µg/g de açúcar	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
5,0	1,95	121,5	12,5	11	5,1
10,0	1,89	132,0	17,1	11	5,0
15,0	1,93	130,5	14,6	11	5,2

QUARTA 14

EXPERIMENTO XV: FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS DE PANIFICAÇÃO EM MELAÇO ENRIQUECIDO
NUTRIENTES EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO PANTOTÊNICO.

CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO PANTOTÊNICO µg/g de melaço	BIOMASSA (g)	PRODUÇÃO DE GÁS ml/h	ETANOL (g/l)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)	pH FINAL
5,0	1,40	70,5	25,3	11	4,9
10,5	1,49	66,0	26,7	11	5,0
15,0	1,28	67,5	22,1	11	5,0

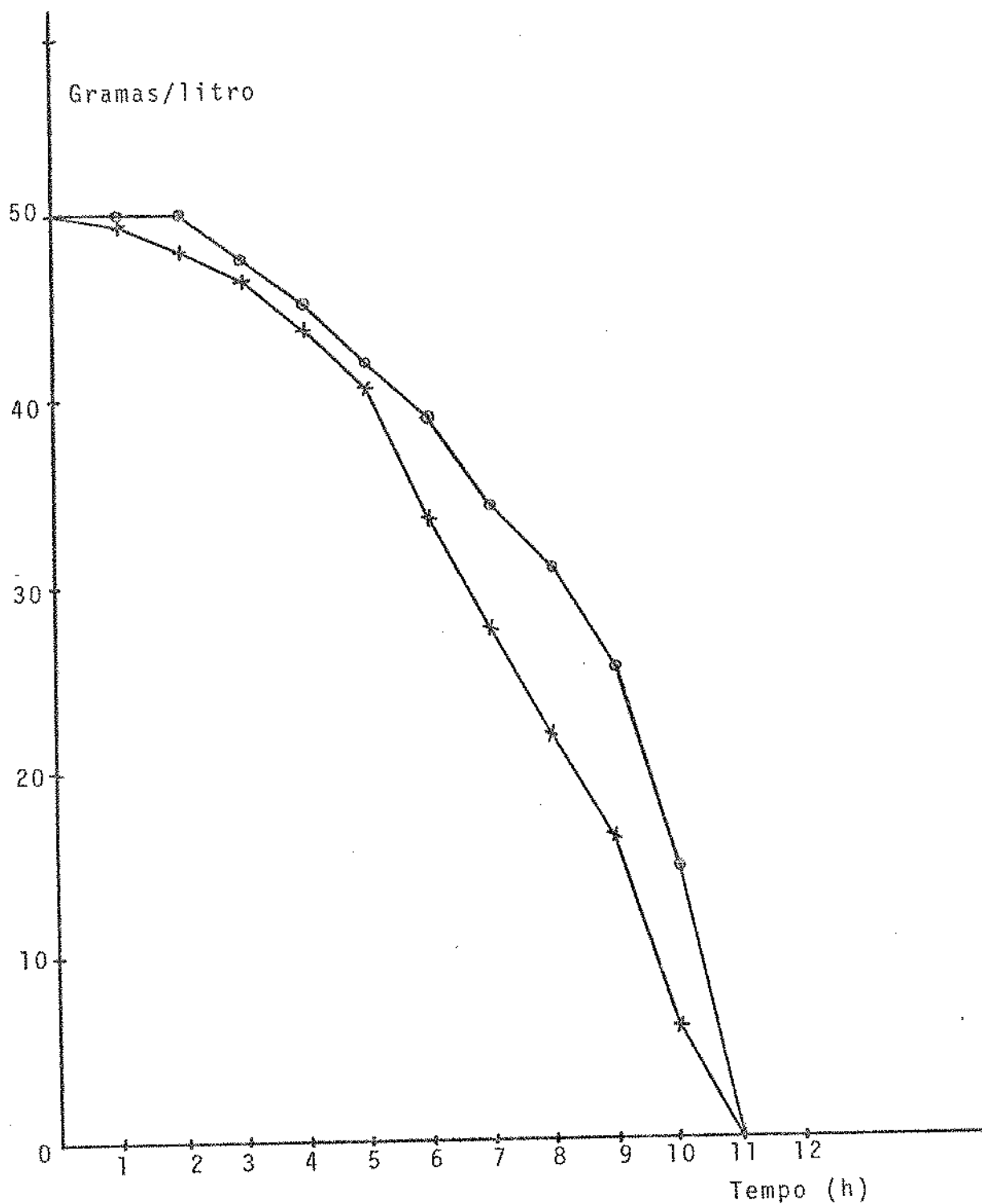


FIGURA 1: Consumo de glicose no meio de cultura do
experimento II com 3% de AMM (●—●)
Consumo de glicose no meio III (★—★)

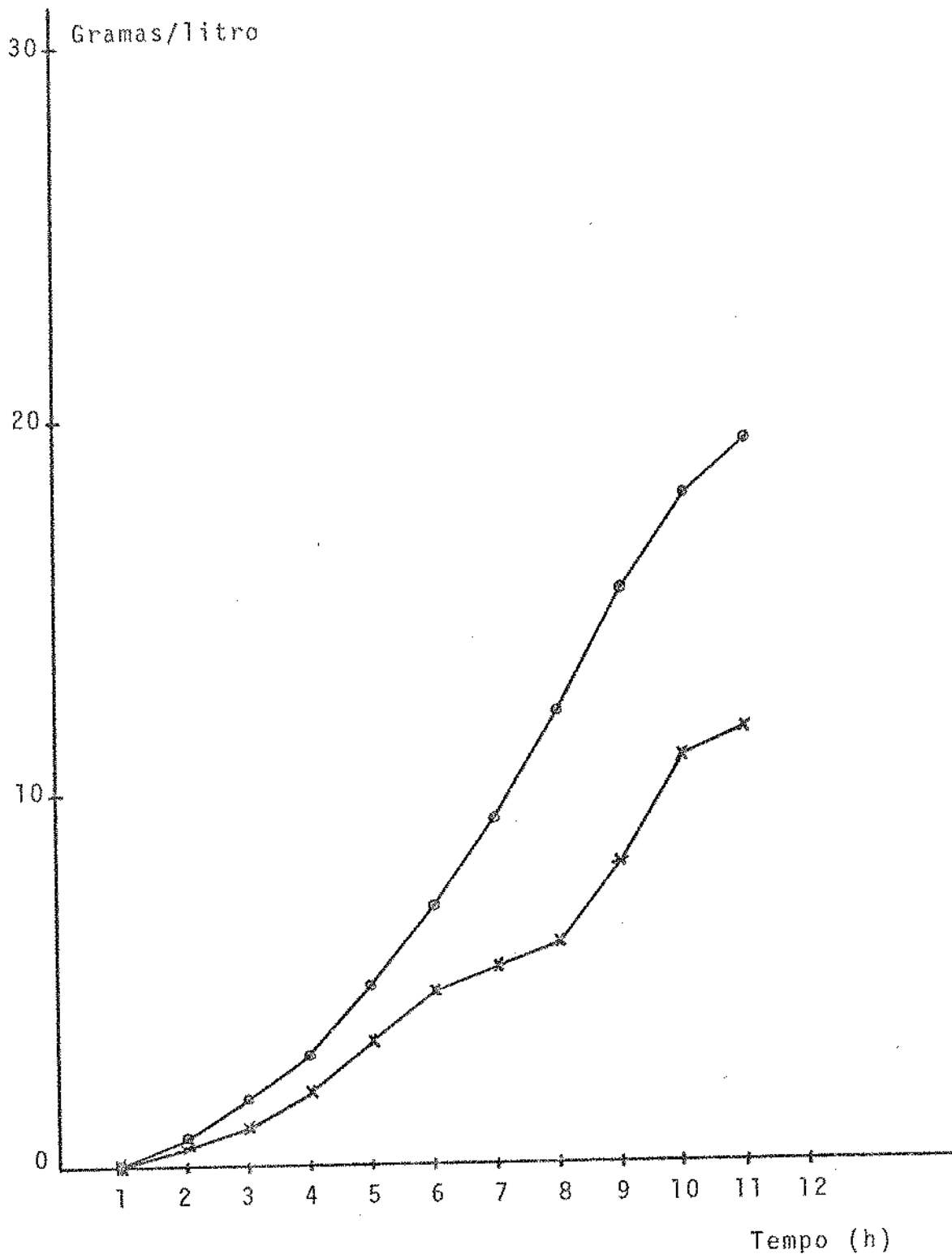


FIGURA 2: Biomassa produzida no experimento II
com 3% de AMM (●—●)
Biomassa produzida no meio III (x—x)

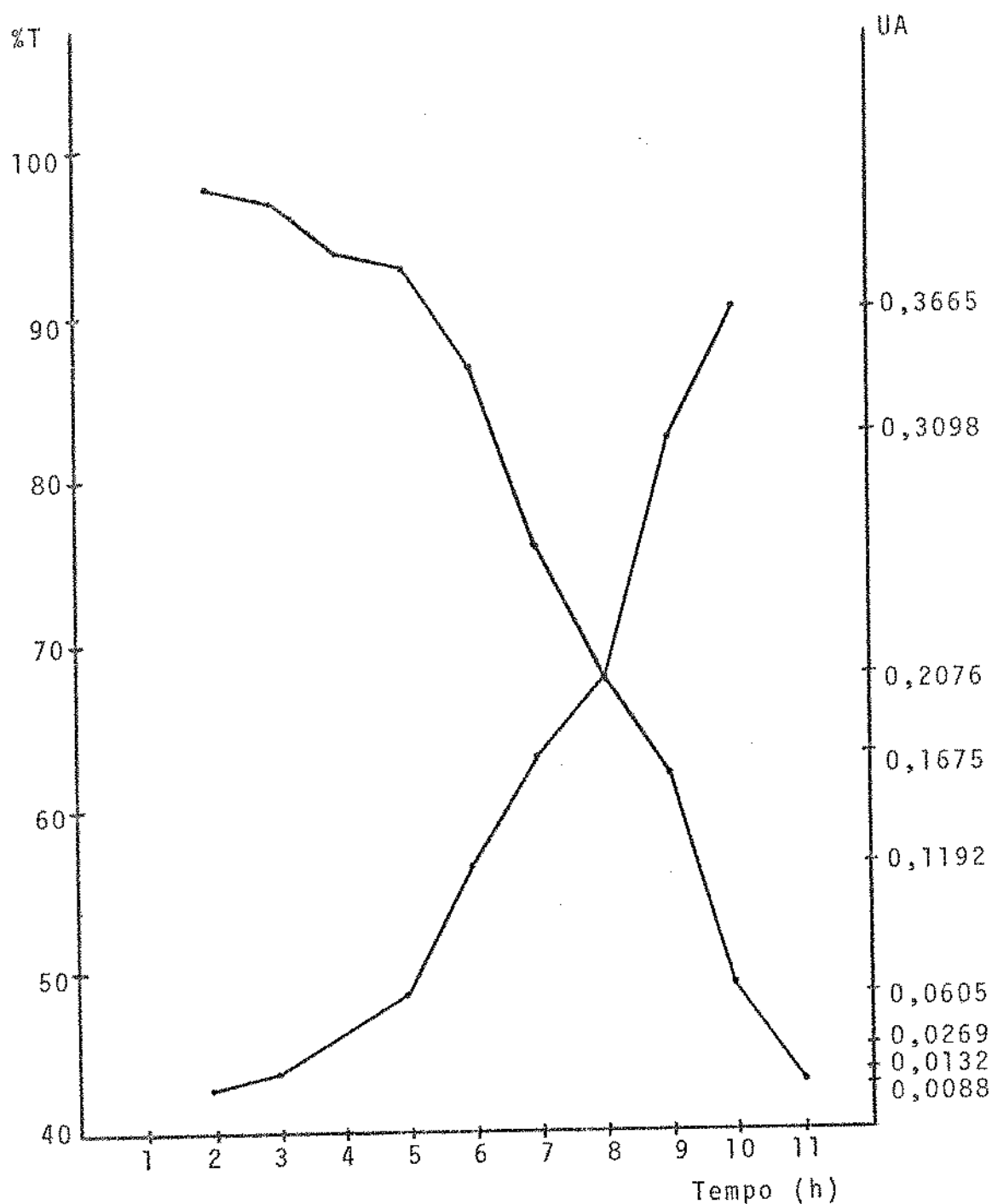


FIGURA 3: Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* no meio de cultura contendo 3% de AMM (experimento II).

UA: Unidades de absorvância

%T: % de Transmitancia

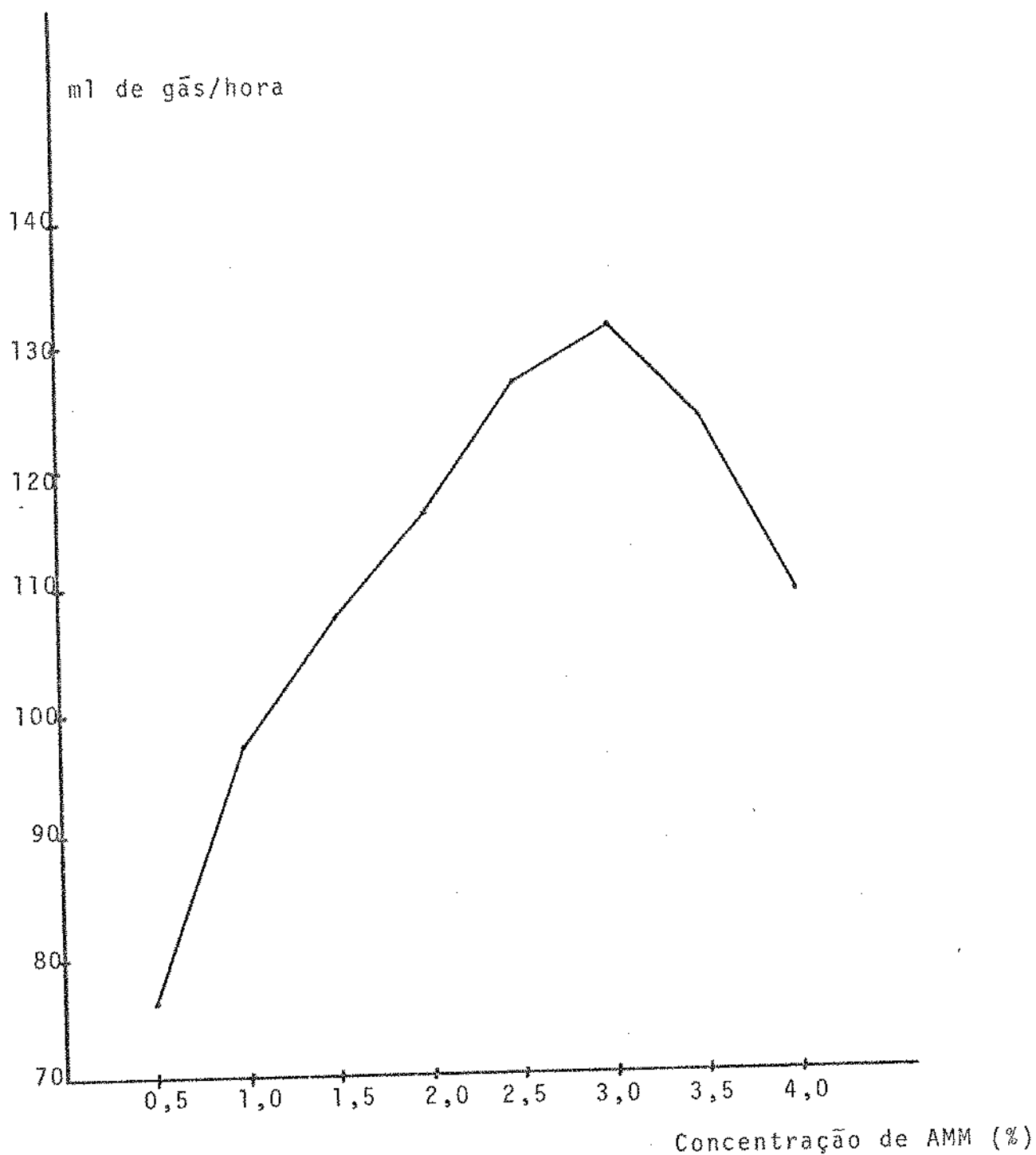


FIGURA 4: Influencia da concentração de AMM na produção de gás no experimento II.

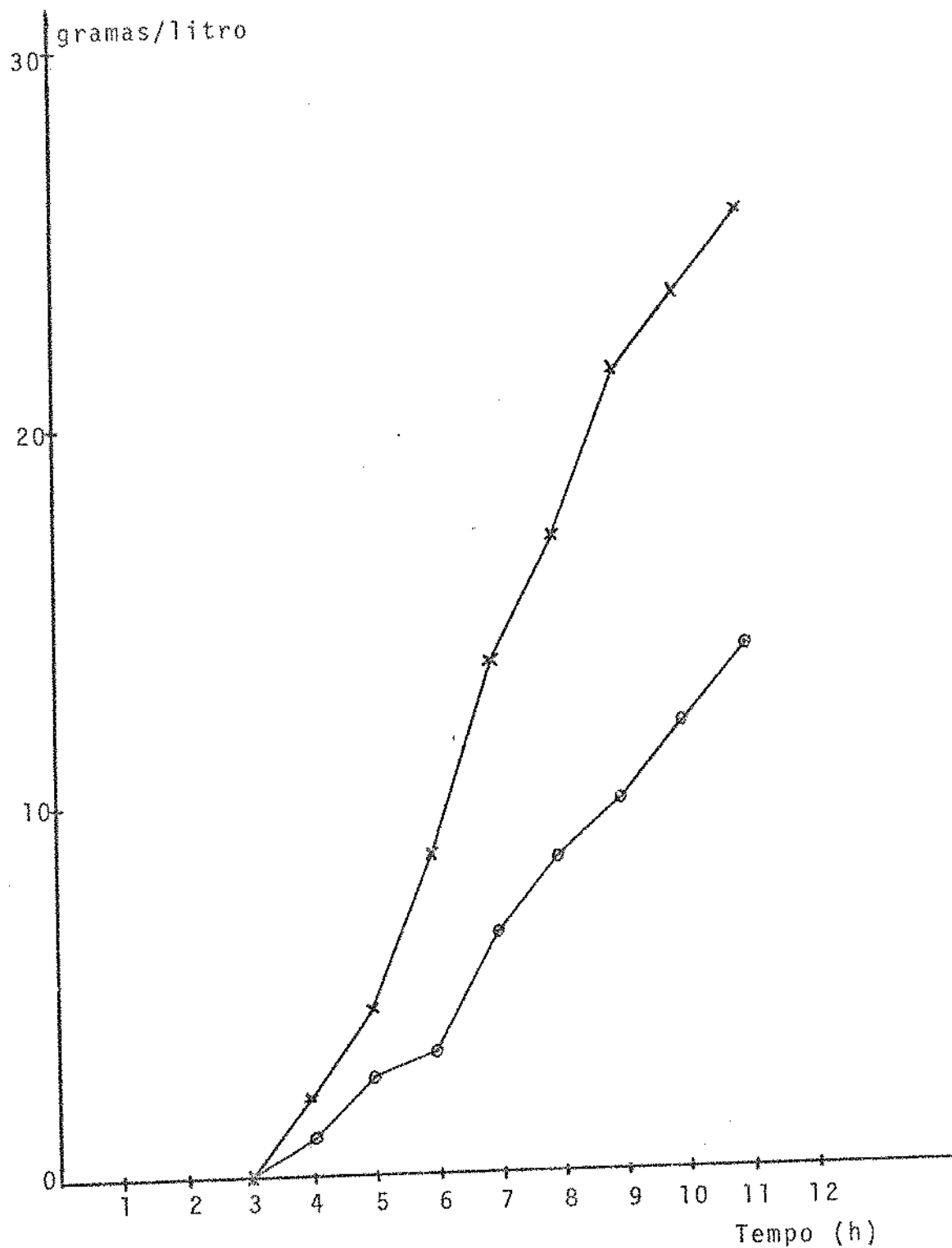


FIGURA 5: Produção de etanol no experimento II
com 3% de AMM (●—●)
Produção de etanol no meio III (x—x)

TABELA 1

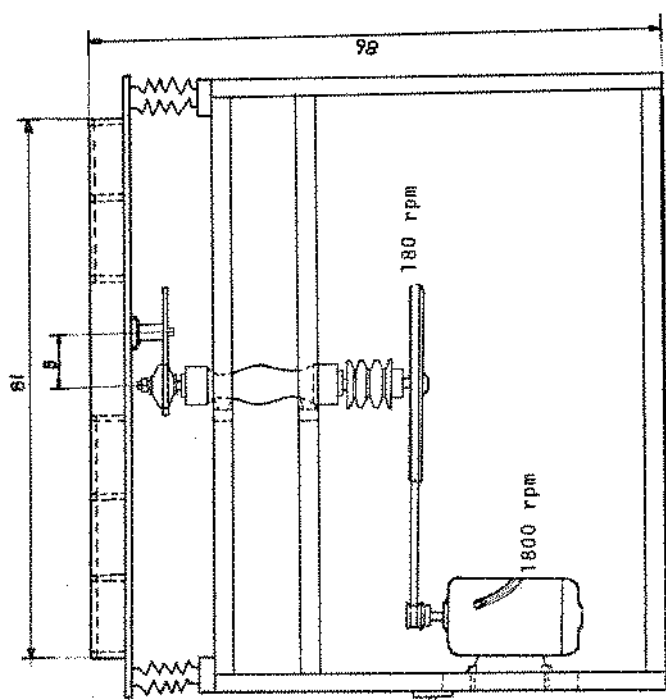
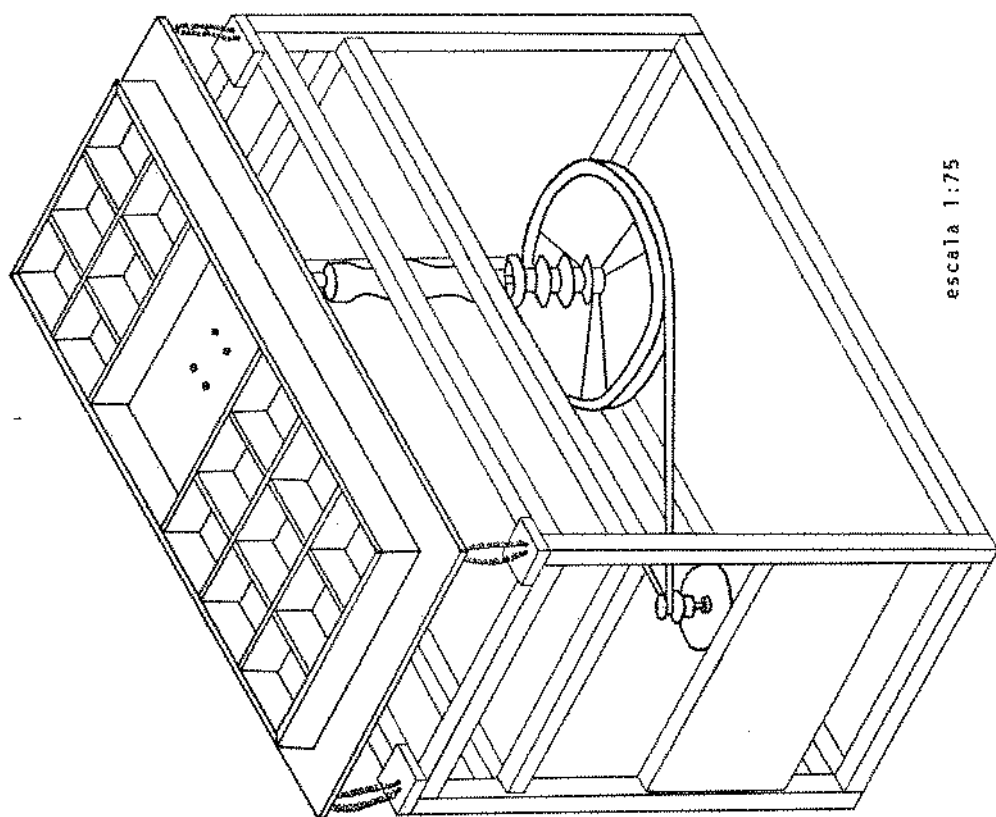
NUTRIENTES REQUERIDOS PELAS LEVEDURAS E NUTRIENTES CONTIDOS NOS MELAÇOS
(de acordo com OLBRICH) (32)

Constituinte	% levedura seca	Requerimento para 27g de levedura seca ou 100g de levedura fresca(g)	a) melaço (g) %	b) melado (g)%	Deficit	
					a)	b)
- N	8,5	2,295	(0,7)	(0,1)		
- 20% de Nitrogenio assimilável	-	-	0,14	0,02	2,155	2,275
P ₂ O ₅	2,6	0,702	(0,9)	(0,3)		
50% de P ₂ O ₅ assimi- lavel nos melaços.	-	-	0,45	0,15	0,252	0,552
K ₂ O	2,5	0,675	3,6	0,9	+	+
MgO	0,4	0,108	0,07	0,02	0,038	0,088
CaO	0,05	0,0135	0,5	0,1	+	+

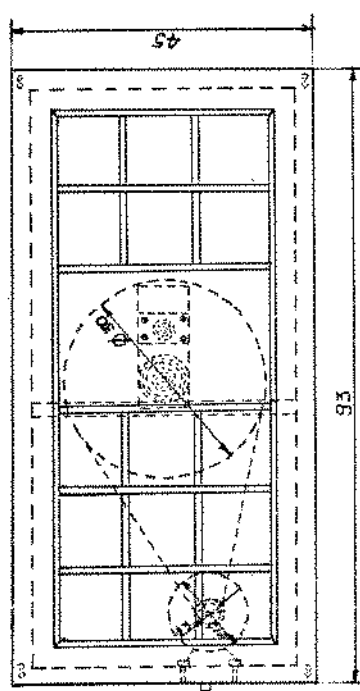
TABELA 2

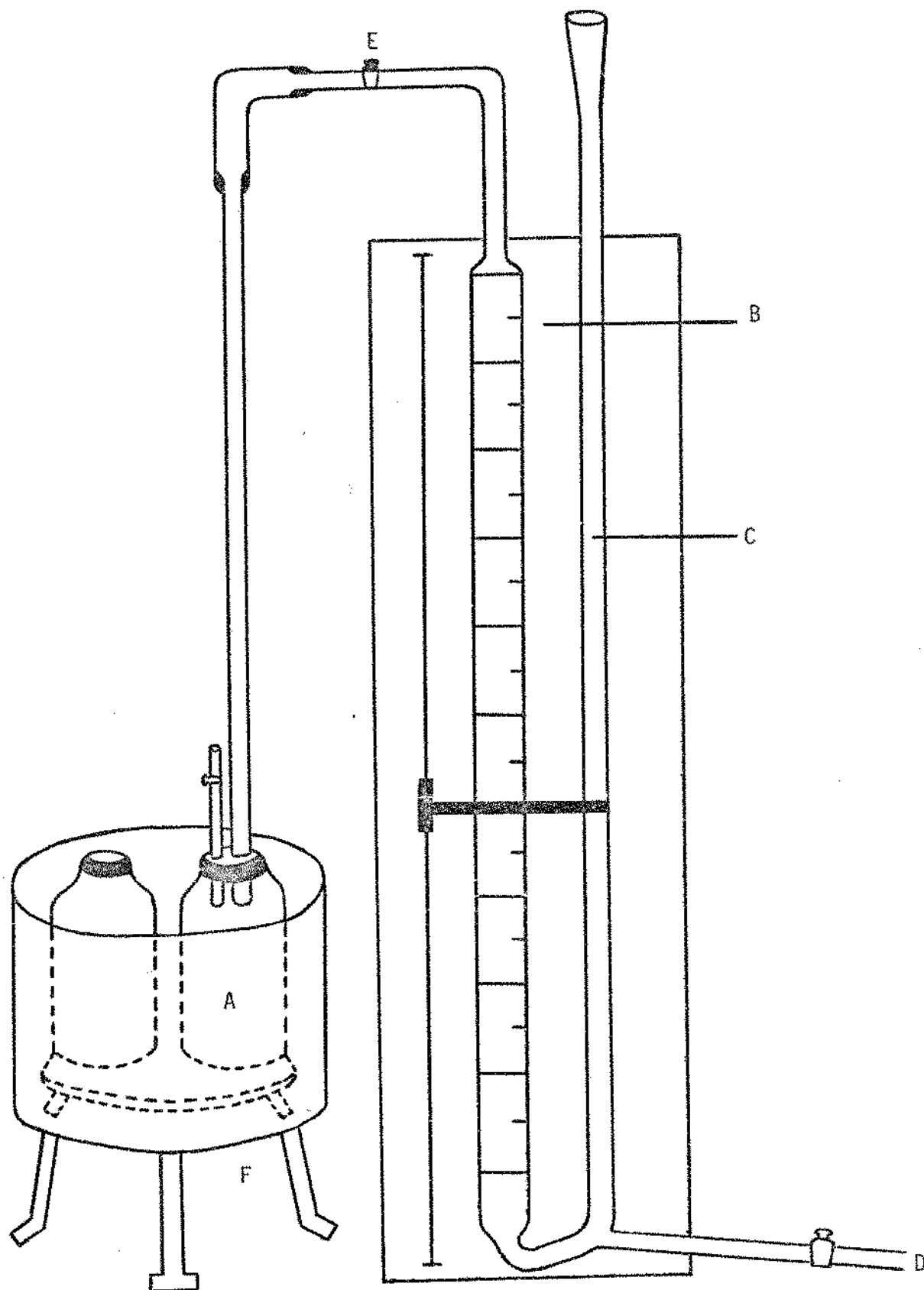
TRATAMENTO DE MELAÇOS POR CLARIFICAÇÃO DE DESINFECÇÃO
(de acordo com OLBRICH) (32)

	TÉRMICO	FÍSICO-QUÍMICO	QUÍMICO	MECÂNICO
Ação	esterilização por calor e coagulação	coagulação pela queda do pH	precipitação por formação de compostos insolúveis	remoção do material suspenso
Processo	aquecimento	adição de alcolis ou ácidos	adição de su- perfosfato , sódio, sili- cato etc.	decantação, filtra - ção ou centrifuga - ção.
Exemplos (i) clarificação por ácido a quen- te com melaço a 15-20º Brix	aquecimento até cerca de 90ºC	adição de H ₂ SO ₄ até pH 4,5	adição de 1-2% de superfosfa- to baseado no peso de melaço	decantação da solu- ção
(ii) clarificação por centrifugação a 40ºC após aque- cimento	aquecimento até cerca de 100ºC	sem adição de ácido	sem aditivos	separação por cen- trifugação.



ANEXO 1: AGITADOR





A- Frasco incubador

B- Bureta

C- Tubo de segurança

D- Tubo de escoamento

E- Torneira de isolamento

F- Banho-maria

Anexo 2- Aparelho de Hayduck

V. CONCLUSÕES

Quanto a inclusão de AMM nos meios de cultura estudados, po demos concluir que:

- V.1. - Funciona como um estimulante na produção de gás pelas leve duras de panificação.
- V.2. - A quantidade de etanol produzido ao término da fermentação diminui de 8,9 g/l de etanol por grama de levedura para 4,7 g/l por grama de levedura com o aumento crescente da concentração de AMM até 30 g/l.
- V.3. - Quando usada como suplementação de um meio contendo 5% de melaço e nutrientes o teor ótimo foi no entorno de 30 g/l. A produção de gás aumentou sensivelmente quando se súple - mentou este meio com 22,5 microgramas de tiamina por grama de açúcar.
- V.4. - Supre as necessidades de magnésio, fósforo e nitrogênio das leveduras. O teor ótimo, em meios deficientes destes elemen tos situou-se em torno de 60 g/l.
- V.5. - Para os meios deficientes isoladamente em magnésio, fósforo e nitrogênio o teor ótimo foi de 35 g/l.

V.6. - Contêm biotina, inositol e ácido pantotênico (fatores de crescimento) em quantidades suficientes para satisfazer - as necessidades nutricionais das leveduras.

VI. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. AHMAD, F.& ROSE, A.H. Effect of biotin-sparing substances on growth of biotin-deficient Saccharomyces cerevisiae and the synthesis of nucleic acids and protein. J.Gen.Microbiol. 28, 147-160, 1962.
2. BECK, C.& MEYENBURG, H.K. Enzyme pattern and aerobic growth - of Saccharomyces cerevisiae under various degrees of glucose limitation. J.Bact., 96(2):479-486, 1968.
3. BIJKERK, A.H.& HALL, R.J.A. A mechanistic model of the aerobic growth of Saccharomyces cerevisiae. Biotechnology and Bio-engineering, 19, 267-296, 1977.
4. BRYANT, J. Anti-foam agents. In Methods in microbiology. J.R. Norris e D.W. Ribbons (ed), New York, Academic Press, vol.II cap.3, p.187-203, s.d.
5. BURROWS, S. Baker's yeast. In The yeast. A.H. Rose e J.S. Harris (ed), New York, Academic Press, vol.III, cap.7, 1971.
6. DALE, R.F. et alii A study of factors affecting the determination of solids in yeast press cake. Food technology, - 9(9):458-460, 1955.

7. DIXON, B.& ROSE, A.H. On the synthesis of ornithine carbamoyl transferase in biotin-deficient Saccharomyces cerevisiae. J.Gen.Microbiol., 34, 229-240, 1964a.
8. DIXON, B.& ROSE, A.H. Observations on the fine struture of Saccharomyces cerevisiae as affected by biotin-deficiency J.Gen.Microbiol., 35, 411-419, 1964b.
9. FINN, R.K. Energy costs of oxigen transfer. Process biochemis-
try, 4(6):19-22, 1969.
10. FREY, C.N. History and development of the modern yeast indus-
try. Ind. and Engineering Chemistry, 22(11):1154-1162, 1930.
11. FREY, C.N. Scientific and technical progress in yeast and
bread production. Food technology, 9(5):211-218, 1955.
12. FULD, G.J.& DUNN, C.G. Automatic pilot plant control in the
development of microorganisms. Food technology, 49(8):1215-
1220, 1957.
13. HARRIS, G.& PARSONS, R. Nitrogenous constituents of brewing -
materials.X. Utilization of the purines and amino acids of
wort by various yeast. J.Inst.Brew., 64, 33-38, 1958.
14. HARRISON, J.S. Baker's yeast. In Biochemistry of industrial -
microorganisms. C. Rainbow e A.H. Rose (ed), New York, Aca-
demic Press, 1963.

15. HENNESSY, J.P. Yeast growth: self-inhibition by yeast. J.Inst. Brew., 70, 143-144, 1964.
16. HOUGH, J.S. et alii. Malting and brewing science. London, Chapman and Hall, p.493-495, 1975.
17. INGLETT, G.E. Corn: culture, processing, products. Westport, Avi, 1970.
18. IRVIN, R. Comercial yeast manufacture. In Industrial fermentation. L.A. Underkofler e R.J. Hickey (ed).s.1, s.d.
19. JORGENSEN, A.& HANSEN, A, Microbiologia de las fermentaciones industriales. Zaragoza, Acribia, 1959.
20. LARUE, T.A.& SPENCER, J.F.T. The utilization of D-amino acids by yeast. Can.J.Microbiol., 13, 777-778, 1967.
21. LEWIS, M.J.& KUIPER, H.A. Effect of growth temperature and glucose on thermal injury of Saccharomyces carlsbergensis. J.Inst.Brew., 78, 465-470, 1972.
22. LIMA, U.A. et alii. Tecnologia das fermentações. In Biotecnologia. São Paulo, Edgard Blücher, 1975.
23. MADDOX, I.S.& HOUGH, J.S. Effect of zinc and cobalt on yeast growth and fermentation. J.Inst.Brew., 76, 262-264, 1970.

24. MARKHAM, E.& BYRNE, W. Uptake, storage and utilization of phosphate by yeast. J.Inst.Brew., 74, 374-378, 1968.
25. MAXON, W.D.& JOHNSON, M. Aeration studies on propagation of baker's yeast. Industrial and Engineering Chemistry, 45(11): 2554-2560, 1953.
26. Methods of analysis. W. Horwitz (ed), Whashington Association of Official Agricultural Chemists, 1965.
27. MERRIT, N.R. The influence of temperature on some properties of yeast. J.Inst. Brew., 72, 374-383, 1966.
28. MORAES, I.O. Ensaio de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em mini fermentador. Tese.UNICAMP, Campinas, São Paulo, 1976.
29. Mc MURROUGH, I.& ROSE, A.H. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. Biochem. J., 105, 189-203, 1967.
30. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. ed.2, São Paulo, Melhoramentos, 1976.
31. NURMINEN, T.& SUOMALAINEN, H. Location and activity of the respiratory enzymes of baker's yeast and brewer's bottom -

yeast growth under anaerobic and aerobic conditions. -
J.Gen.Microbiol., 53, 275-285, 1968.

32. OLBRICH, H. Manufacture of yeast from molasses. In Principles of sugar technology. P.Honig (ed), Amsterdam, Elsevier, -
vol.III, 1963.

33. OURA, E.& SUOMALAINEN, H. Biotin and the metabolism of ba
ber's yeast. J.Inst.Brew., 84, 283-287, 1978.

34. PALÁCIO, H. Fabricacion de alcool. Barcelona, Salvat, 1956.

35. PEPPLER, H.J. Microbial technology. New York, Reinhold, 1967.

36. POLAKIS, E.S. et alii. Changes in the struture and enzyme -
activity of Saccharomyces cerevisiae in response to chan
ges in the environment. Biochemical J., 90(2):369-374,
1964.

37. POWER, D.M.& CHALLINOR, S.W. The effects of inositol-defici
ency on the chemical composition of the yeast cell wall.
J.Gen.Microbiol., 55, 169-176, 1969.

38. PRESCOTT, S.C.& DUNN, C.G. Microbiologia industrial. Agui
lar, 1962.

39. REED, G.& PEPPLER, H.J. Yeast technology. Westport, Avi, 1973.

40. RHODES, A.& FLETCHER, D.L. Principios de microbiologia industrial. Zaragoza, Acribia, 1969.
41. ROGERS, D.& MICKELSON, M.N. Vitamin B content of sugar beets and by-products. Ind. and Engineering Chemistry. 40(3): 527-529, 1948.
42. ROSEN, K. Manufacture of baker's yeast. Process Biochemistry, 3(7):45-47, 1968.
43. SOLS, A. et alii. Energy-yielding metabolism in yeast. In The yeast. A.H. Rose e J.S. Harrison (ed), London, Academic Press, vol. II, 1971.
44. SUOMALAINEN, H. et alii. Aspects cytology and metabolism of yeast. In Progress in industrial microbiology. D.J.D. Hockenhull (ed), London, J&A Churchill, vol.XII, 1968.
45. SUOMALAINEN, H. et alii. Alfa-glucosidase and leavening of baker's yeast. Process Biochemistry, maio, 1972.
46. STEPHANOPOULOS, D.& LEWIS, M.J. Release of phosphate by fermenting brewer's yeast. J.Inst.Brew., 74, 378-382, 1968.
47. STROHM, J.A.& DALLE, R.F. Dissolved oxygen measurement in yeast propagation. Ind. and Engineering Chemistry, 53, 760-764, 1961.

48. THORNE, R.S.W. Nitrogen metabolism of yeast. A consideration of the mode of assimilation of amino acids. J.Inst.Brew., 55, 201-222, 1949.
49. WALSH, R.M. & MARTIN, P.A. Growth of Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces uvarum in a temperature gradient incubator. J.Inst.Brew., 83, 169-172, 1977.
50. WEBB, F.C. Ingenieria Bioquímica. Zaragoza, Acribia, 1966.
51. WHITE, J. & MUNNS, D.J. Influence of temperature on yeast - growth and fermentation. J.Inst.Brew., 57, 280-284, 1951.
52. WIMPENNY, J.W.T. Oxygen and microbial metabolism. Process Biochemistry, 4(6):19-22, 1969.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES pela valiosa orientação deste trabalho.

Ao professor HELCIO JOÃO MOREIRA DA SILVEIRA, Chefe do Departamento de Ciencia e Tecnologia de Alimentos da U.F.S.C.

Ao professor Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

Ao Sr. JOSÉ BENCCIVENI pelo projeto e construção do Agitador.

À Srta. ANA SOUZA pela colaboração na parte experimental.

À REFINAÇÕES DE MILHO BRASIL Ltda, pelo fornecimento da MILHOCINA (água de maceração de milho).

A todos que de uma forma ou de outra colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.