

**JOÃO GUSTAVO BRASIL CARUSO**  
ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Auxiliar de Ensino do Departamento de Tecnologia Rural da  
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" U. S. P.

# PRODUÇÃO DE POLIÁLCOOIS POR LEVEDURAS OSMOFÍLICAS

Orientador: Dr. Hécio Falanghe

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Agronomia.

PIRACICABA  
1972

À Maria Inês

e Eloisa.

## AGRADECIMENTOS

Somos gratos:

Ao Dr. Helcio Falanghe, pela segura orientação recebida. Seus conselhos e ensinamentos foram fatores preponderantes na realização desta tese.

A Dr<sup>a</sup> Rahme Nelly Neder, pelas valiosas sugestões e críticas durante o transcorrer deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

## ÍNDICE

	<u>Página</u>
1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	2
3 - MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. - Isolamento e identificação de leveduras osmofílicas .....	17
3.2. - Desenvolvimento das leveduras, em cultura submersa, para produção de poliálcoois ...	18
3.3. - Meios de cultura para produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	19
3.3.1 - Efeito da variação da concentração de extrato de levedura, uréia e glicose .....	19
3.3.2 - Efeito da variação da fonte de <u>ni</u> trogênio .....	20
3.3.3 - Efeito da adição de cloreto de <u>só</u> dio .....	21
3.3.4 - Efeito da variação do volume do meio de cultura .....	21
3.4. - Métodos analíticos .....	21
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23

4.1. - Isolamento e identificação das leveduras osmofílicas .....	23
4.2. - Produção de poliálcoois pelas leveduras isoladas .....	26
4.3. - Efeito da variação da concentração de <u>ex</u> trato de levedura, sobre a produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	28
4.4. - Efeito da concentração de uréia sobre a produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	31
4.5. - Efeito da concentração de glicose na produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	31
4.6. - Efeito da variação da fonte de nitrogênio na produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	35
4.7. - Efeito da adição de cloreto de sódio na produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	40
4.8. - Efeito da aeração na produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	43
4.9. - Análise qualitativa de poliálcoois produzidos por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	45
5 - CONCLUSÕES .....	54

Página

6 - RESUMO .....	58
7 - SUMMARY .....	60
8 - BIBLIOGRAFIA CITADA .....	62

## ÍNDICE DE TABELAS

	<u>Página</u>
TABELA I - Origem, meio de isolamento e crescimento a 60% de glicose, das leveduras isoladas .....	24
TABELA II - Classificação das leveduras isoladas.	25
TABELA III - Produção de poliálcoois pelas leveduras isoladas .....	27
TABELA IV - Efeito da variação da concentração - de extrato de levedura sobre a produção de Poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	29
TABELA V - Efeito da concentração de uréia sobre a produção de poliálcoois por - <u>Saccharomyces rouxii</u> , .....	32
TABELA VI - Efeito da concentração de glicose sobre a produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	34
TABELA VII - Efeito da concentração de tartarato de amônio sobre a produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	36
TABELA VIII- Efeito da concentração de sulfato de	

	<u>Página</u>
amônio sobre a produção de poliál- coois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	38
TABELA IX - Efeito da adição de fosfato de amônio monobásico sobre a produção de poliál- coois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	39
TABELA X - Efeito da adição de cloreto de sódio sobre a produção de poliálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> .....	41
TABELA XI - Efeito da aeração na produção de po liálcoois por <u>Saccharomyces rouxii</u> ...	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
Figura 1 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de extrato de levedura .....	47
Figura 2 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de uréia e sem adição de uréia .....	48
Figura 3 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de tartarato de amônio .....	49
Figura 4 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio .....	50

Figura 5 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação, por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de fosfato de amônio monobásico .....	51
Figura 6 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação, por <u>S. rouxii</u> , em meio sem NaCl e em meios contendo diferentes concentrações de NaCl. ....	52
Figura 7 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação, por <u>S. rouxii</u> , em meios contendo diferentes concentrações de glicose .....	53

## 1 - INTRODUÇÃO

As pesquisas sobre a obtenção de poliálcoois por via fermentativa, restringiram-se inicialmente, à obtenção do glicerol em fermentações alcoólicas dirigidas para produção desse poliálcool. Entretanto, com a descoberta de que leveduras osmofílicas poderiam produzir elevadas quantidades de glicerol, e outros poliálcoois, em fermentações não etanólicas, as pesquisas tomaram um novo sentido, buscando leveduras osmofílicas boas produtoras de poliálcoois, bem como, condições mais favoráveis para essa produção.

Devido à crescente demanda industrial de poliálcoois, os processos fermentativos para sua obtenção despertaram um grande interesse.

O presente trabalho representa uma primeira etapa de um programa em que a identificação de leveduras osmofílicas, isoladas de melaço e melado, é seguida pela avaliação de sua capacidade de produção de poliálcoois e pelo estabelecimento das melhores condições de cultura, que permitam, às leveduras selecionadas como melhores produtoras, a máxima eficiência de produção desses álcoois

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presença de glicerol entre os produtos de uma fermentação alcoólica foi observado pela primeira vez por PASTEUR (1858) que, em 1859, relatou uma produção desse poliól ao nível de 3,2 a 3,6% sobre o açúcar fermentado por leveduras.

Procurando elucidar o mecanismo da fermentação alcoólica por leveduras, NEUBERG e REINFURTH (1918, 1919), fixando o acetaldeído com sulfito de sódio, verificaram um grande aumento na quantidade de glicerol formado. Esta observação foi aproveitada no estabelecimento de um processo industrial por CONNSTEIN e LUDECKE (1919). Porém, nos processos de fixação de acetaldeído, a recuperação do glicerol era dificultada devido à presença dos sais fixadores, em solução no líquido fermentado. Essa dificuldade impediu um maior sucesso desses processos na exploração comercial de glicerol.

Estudando o metabolismo de Zygosaccharomyces acidifaciens, NICKERSON e CARROL (1945) verificaram que, em meio contendo 10% de glicose, sob condições anaeróbicas, essa levedura poderia produzir glicerol sem necessidade de adição dos sais fixadores. Obtiveram um rendimento de 22,0% de glicerol, baseado no açúcar consumido em 10 dias de fermentação. A recuperação do glicerol, entretanto, foi consideravelmente menor que a

quantidade analiticamente determinada por titulação com periodato.

Procedendo ao fracionamento cromatográfico do melaço de cana fermentado por leveduras, BINKLEY e WOLFROM (1950) isolaram eritritol e D-arabitol, não encontrados no melaço não fermentado, deduzindo serem essas duas substâncias produzidas pela levedura. Esta foi a primeira referência sobre a produção de outros polióis, além do glicerol, em uma fermentação por leveduras.

SPENCER e SALLANS (1956) estudaram a produção de álcoois polihídricos por 79 culturas de leveduras osmofílicas. Estes autores elucidaram a causa da diferença, relatada por NICKERSON e CARROL (1945), entre a quantidade de glicerol recuperado e a quantidade determinada analiticamente por titulação com periodato, ao identificarem, no meio de cultura, outros polióis não recuperáveis com o glicerol, mas determináveis por titulação com periodato. Das culturas estudadas, as de crescimento mais rápido e de mais rápida fermentação de glicose, produziram, principalmente, glicerol e D-arabitol. As culturas de crescimento mais lento produziram, principalmente, glicerol, eritritol e manitol. Uma levedura de crescimento rápido foi utilizada para o estudo da influência da aeração e de diferentes fontes de nitrogênio, sobre a produção de poliálcoois. Para um meio contendo 20% de glicose e 0,4% de extrato de levedura, observaram que a suplementação de nitrogênio sob a forma de

sulfato de amônio, fosfato de amônio e, principalmente, uréia, a certos níveis, propiciava um melhor consumo de glicose, acompanhado de um aumento da produção de glicerol e diminuição da produção de D-arabitol, a uma baixa aeração. A elevação da concentração do extrato de levedura, de 0,4% a 1,0%, associada a uma aeração mais elevada, em meio contendo as mesmas fontes de nitrogênio em concentrações mais altas, ou tartarato de amônio, resultaram nos mesmos efeitos na produção de polióis, porém, com consumo de glicose mais rápido. Os autores observaram um sensível aumento na produção de glicerol, acompanhado de uma redução da produção de etanol, à medida em que a aeração era aumentada.

WRIGHT e colaboradores (1957) estudaram dois mutantes de Saccharomyces cerevisiae, os quais produziram mais que o dobro de glicerol produzido pela cultura original, em uma fermentação com adição de sulfito, em um meio contendo 20% de glicose. O rendimento de glicerol, em função da glicose utilizada, para os dois mutantes foi de 22,0% e 25,4% enquanto que, para a cultura original, foi de 10,1%. Um desses mutantes, desenvolveu-se mais rapidamente e tolerou melhor o sulfito, do que uma outra linhagem de Saccharomyces cerevisiae, correntemente usada nesse processo.

SPENCER e colaboradores (1957), estudando os fatores que afetam a produção de polióis por leveduras, observaram que, o extrato de levedura pode ser substituído por água de macera-

ção de milho. Neste caso, entretanto, tornava-se necessária uma alta concentração de uréia. Melhores produções foram obtidas à temperatura de 37°C do que às temperaturas de 30 e 33,5°C. A conversão de glicose a poliálcool não foi afetada nem mesmo pelo aumento da concentração de glicose até 30%.

Estudando a produção de poliálcoois por leveduras osmofílicas, SPENCER e SHU (1957), utilizaram uma linhagem de Saccharomyces rouxii produtora de glicerol e D-arabitol, investigando o efeito da tensão de oxigênio e da concentração de fosfato inorgânico na produção desses polióis e de etanol. Observaram que, na ausência de fosfato, a produção de polióis aumentava com a tensão de oxigênio, enquanto a produção de etanol decrescia. Entretanto, a tensão de oxigênio na qual se obtinha as melhores produções de glicerol e D-arabitol era, consideravelmente, mais alta que aquela em que ocorria a maior absorção de O<sub>2</sub> e evolução de CO<sub>2</sub>. Esse aumento na produção de D-arabitol, em função do aumento da tensão de oxigênio, não fora notada por SPENCER e SALLANS (1956) para a mesma levedura estudada. Com concentrações crescentes de fosfato, adicionado sob a forma de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, de 0,52 x 10<sup>-3</sup> a 2,08 x 10<sup>-3</sup> moles/litro, a produção de polióis decresceu e a de etanol aumentou, notadamente a uma tensão de oxigênio de 280 mm de mercúrio.

PETERSON e colaboradores (1958) estudaram a influência de vários fatores sobre a produção de glicerol e D-arabitol, por cinco espécies de Zygosaccharomyces. A variação da

concentração de extrato de levedura de 0,25% a 1,0% resultou, para a menor concentração utilizada, num lento desenvolvimento e uma elevada produção de polióis, principalmente glicerol e, para a maior concentração, num rápido desenvolvimento e baixa produção. A influência da concentração de extrato de levedura mostrou-se sobremaneira atuante sobre a produção de glicerol por Zygosaccharomyces mellis, a qual só produziu este poliól a uma concentração de 0,25% de extrato de levedura. Uma aeração moderada foi necessária para a melhor produção de polióis, porém, esta estava condicionada à concentração de glicose no meio. Observaram também, que o desenvolvimento das leveduras deve ser maior que aquele obtido sob condições anaeróbicas, porém, menor que o obtido sob condições aeróbicas ótimas. Sem se preocupar com a aeração como elemento de controle do desenvolvimento, procederam a esse controle através da concentração do extrato de levedura no meio. Adicionalmente, verificaram que a presença de fosfato inorgânico no meio de cultura reduzia a produção de polióis, e que a presença de elementos traços, vitaminas e aminoácidos, não contribuía para um aumento de produção.

Durante seus estudos sobre o metabolismo de leveduras osmofílicas, ONISHI (1959), examinou a produção de glicerol por linhagens de Saccharomyces rouxii, tolerantes a altas concentrações de sais, isoladas de alimentos à base de soja. - As 29 linhagens utilizadas, em um meio contendo 18% de NaCl e

concentração inicial de glicose de 10%, variaram suas produções de glicerol de 22,6% a 43,4% sobre o açúcar consumido, após 10 dias de fermentação. Utilizando a linhagem que apresentou a melhor produção de glicerol, verificou que, elevados rendimentos, de 43 a 50% sobre o açúcar consumido, podiam ser obtidos quando diferentes fontes de nitrogênio, tais como, polipeptona, sulfato de amônio, cloreto de amônio, uréia, lactato de amônio, acetato de amônio e extrato de carne eram utilizados. A produção absoluta de glicerol entretanto, variou em função de diferentes consumos de glicose, determinados pelas diferentes fontes de nitrogênio utilizadas. Essa mesma linhagem, em um meio de cultura sem adição de NaCl ou KCl, apresentou pequena produção de glicerol, porém, essa produção foi crescente com o aumento da concentração de NaCl de 6 a 18% ou de KCl de 11 a 22%. A cromatografia em papel do líquido fermentado, quando 18% de NaCl foi utilizado, não revelou a presença de outros polióis além do glicerol.

Estudando a produção de polióis em meios contendo alta concentração de NaCl ou glicose, ONISHI (1960a) verificou - que a linhagem de Saccharomyces rouxii, por ele utilizada em 1959, produzia não somente glicerol, mas também D-arabitol. Observou que glicerol constituía 75% dos polióis obtidos em um meio contendo 10% de glicose e 18% de NaCl, e 50% em um meio contendo 30% de glicose, sem adição de NaCl. O rendimento obtido, 43,0% sobre o açúcar consumido, no meio com alta concen-

tração de cloreto de sódio, foi reduzido a 27,4% no meio contendo elevada concentração de glicose, sem adição de cloreto de sódio.

Estudando 156 linhagens de leveduras, quanto a sua capacidade de produzir polióis em um meio contendo 30% de glicose, em um período de 10 dias, ONISHI (1960b) verificou que as leveduras estudadas apresentaram características na produção de polióis, que permitiram classifica-las em seis diferentes grupos: 1. Produtoras de glicerol; 2. Produtoras de eritritol; 3. Produtoras de D-arabitol; 4. Produtoras de eritritol e D-arabitol; 5. Produtoras de glicerol e D-arabitol; 6. Produtoras de glicerol, eritritol e D-arabitol. Em seguida, estudou o efeito da concentração inicial de glicose, da fonte de nitrogênio, da fonte de carbono e da aeração, sobre a produção de poliálcoois por uma linhagem de Pichia miso, que, nas condições iniciais do trabalho, revelou-se a de melhor produção. Verificou que uma concentração inicial de 30 a 40% de glicose no meio, foi a mais indicada para produção de poliálcoois por este microrganismo. D-arabitol foi produzido independentemente da concentração de glicose, enquanto, eritritol só foi produzido à concentrações de 30 - 40% desse açúcar. Por outro lado, glicerol foi pobremente produzido em meio com 10% de glicose. Tanto nitrogênio amoniacal como nitrogênio amínico mostraram ser boas fontes para produção de polióis. Nitrogênio inorgânico, na forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  determinou -

um rápido decréscimo do pH do meio para 2,0, ou menos, acompanhado de baixa produção de poliól. Esta condição pôde ser corrigida, entretanto, pela adição de uma solução tampão ao meio de cultura. O autor verificou que as melhores fontes de carbono para produção de polióis foram glicose, manose ou frutose, e as piores foram galactose, maltose ou sacarose. Variando o volume do meio, nos frascos de 500 ml, para obter diferentes aerações, verificou que quando o volume de meio nestes frascos variava de 30 a 80 ml, boas produções de polióis eram obtidas, porém, estas decresciam quando o volume era elevado a 120 ml ou mais.

Com o objetivo de encontrar uma levedura osmofílica que produzisse, em cultura submersa, apenas glicerol como único produto de elevado ponto de ebulição, o que facilitaria sua recuperação do meio de cultura, HAJNY e colaboradores (1960) estudaram 22 leveduras osmofílicas, isoladas de pólen e outras fontes. Utilizando um meio contendo 20% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,1% de uréia, esses autores observaram que o crescimento, a utilização de açúcar e a produção de poliól variaram amplamente entre as culturas. A maior parte dessas culturas produziu D-arabitol, algumas produziram eritritol, e uma identificada como Torulopsis magnoliae, produziu somente glicerol, em quantidade apreciável. Por preencher a característica desejável, esta levedura foi utilizada para estudos mais detalhados. Em meio contendo 10% de glicose, 0,5% de ex

trato de levedura e 0,1% de uréia, verificaram que a melhor temperatura para a produção de glicerol por essa levedura era 35°C. A 30°C a sua produção foi praticamente a mesma, porém o consumo de glicose foi mais lento. A concentração de extrato de levedura e de fosfato inorgânico, no meio de cultura, afetaram a produção. Baixas concentrações desses nutrientes favoreceram uma maior produção, revelando-se como ótima, uma concentração de extrato de levedura de 0,5%, que propiciou um consumo quase total de glicose dentro de 48 horas, e um rendimento de 38,4% de glicerol sobre o açúcar consumido. Melhores produções de glicerol foram obtidas com uma concentração de fosfato inorgânico de 0,001 M. A aeração adequada, para melhor produção de glicerol, mostrou-se dependente da concentração de glicose no meio. Utilizando uma técnica, cuidadosamente controlada, de alimentação intermitente de açúcar e outros nutrientes, altas concentrações de glicerol puderam ser obtidas. Dos açúcares utilizados pela levedura estudada, glicose, manose, frutose e sacarose, foram rapidamente fermentados, propiciando boas produções de glicerol. Através do balanço de carbono observou que o glicerol produzido foi cerca de 50% do açúcar consumido.

Em continuação a seus estudos iniciados em 1960, sobre a produção de poliálcoois por Pichia miso, ONISHI e colaboradores (1961) estudaram várias condições que afetam a produção de polióis por essa levedura. Utilizando um meio com 30%

de glicose, os autores verificaram que bons rendimentos de álcoois polihídricos eram obtidos, mesmo na presença de elevadas concentrações de fosfato inorgânico (2% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) no meio de cultura, ao contrario do que sucedeu com Zygosaccharomyces (PETERSON e colaboradores, 1958) e com Torulopsis magnoliae (HAJNY e colaboradores, 1960). Estudando a influência de várias fontes de nitrogênio tais como, ácido casamino, extrato de levedura, ácido L-glutâmico e lactato de amônio, em níveis de 0,1% a 4,0%, os autores verificaram que à medida que o nível de nitrogênio, independente da fonte utilizada, aumentava no meio, a produção de poliól decrescia. Este efeito, entre tanto, mostrou-se mais acentuado nos meios em que extrato de levedura foi utilizado. Estes resultados levaram os autores a salientar a significância da relação C:N no meio para produção de polióis por Pichia miso. Analisando o efeito do extrato de levedura sobre a produção de polióis, verificaram que o aumento desse componente, de 0,1% para 4,0%, levava o microrganismo a, praticamente, produzir apenas etanol em concentração marcadamente elevada. Verificaram também, que vitaminas e elementos traços não mostraram ter influência na produção de poliól, por esta levedura. Utilizando jarros fermentadores, no sentido de uma maior aproximação às condições industriais, obtiveram uma produção de polióis comparável à obtida em frascos de cultura sob agitação. Os autores sugeriram também composições de meios que poderiam ser utilizados na exploração comercial.

GRAHAN (1961) patentou um processo para produção de D-arabitol por Hansenula subbelliculosa, em meio contendo glicose, frutose ou sacarose, sugerindo melaços como fonte mais adequada deste último açúcar, o que constitui uma grande vantagem do processo. Carboidratos, na porcentagem de 10,0 a 40,0%, uma fonte de nitrogênio assimilável por Hansenula, juntamente com fatores de crescimento e elementos minerais, constituíram o meio de cultura. Os elementos minerais podem ser adicionados na forma de fosfatos, cloretos e outros sais, e os fatores de crescimento, na forma de vitaminas puras, extrato de levedura ou água de maceração de milho. Preferivelmente indicou um meio contendo uréia, melão e água de maceração de milho, o qual, para máxima produção de D-arabitol por inoculação de Hansenula subbelliculosa, num tempo variável de 2 a 4 dias, deve ser incubado a uma temperatura de 30-35°C debaixo de condições de aeração. Adicionalmente, um processo para recuperação do D-arabitol do meio de cultura foi descrito na patente.

A verificação da possibilidade de aumento da produção de D-arabitol por Hansenula subbelliculosa em meio de melão de cana ou de beterraba, através da variação da concentração de fosfato no meio, foi aproveitada por TREVELYAN (1961) para o estabelecimento de um processo aperfeiçoado a partir do processo de GRAHAN (1961). Num meio contendo de 10,0 a 20,0% de açúcar, fontes assimiláveis de nitrogênio e outros nutrientes, a concentração de fosfato foi ajustada de tal forma a con

trolar a proporção da utilização da fonte de carbono, evitando que uma certa proporção mínima fôsse excedida, o que resultaria na formação de álcool etílico e acetato de etila, em detrimento da produção de D-arabitol. Nestas condições, um rendimento de 40,0 a 55,0% de D-arabitol sobre o açúcar contido no meio, acentuadamente maior que o obtido por GRAHAN, foi obtido após 48 a 72 horas de fermentação.

O efeito de altas concentrações de cloreto de sódio, na produção de poliálcoois por leveduras osmofílicas, foi investigado por ONISHI (1963). Nesta ocasião, este autor, observou que Pichia miso, desenvolvida em um meio com 10% de glicose e 6%, ou mais, de cloreto de sódio, produziu somente glicerol, enquanto que, a menores concentrações desse sal, D-arabitol também foi produzido. Em um meio contendo 30% de glicose, sem suplementação de cloreto de sódio, verificou uma produção adicional de eritritol. Utilizando outros sais inorgânicos, em elevadas concentrações no meio, o autor verificou que a adição de KCl e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> influenciam a produção qualitativa dos polióis da mesma maneira que o cloreto de sódio. O efeito do cloreto de sódio na produção de polióis por leveduras dos gêneros Candida, Torulopsis e Debaryomyces, foi também estudado. Essas leveduras, que produziam apenas D-arabitol ou eritritol, ou ambos, em um meio sem adição de cloreto de sódio, passaram a produzir também glicerol, em um meio com uma concentração de 9% de cloreto de sódio.

HAJNY (1964) estudou as melhores condições para produção de altas concentrações de D-arabitol, como único álcool polihídrico, por Endomyconsis chodati. Observou, em primeiro lugar, que a temperatura de incubação desse microrganismo, para a produção de D-arabitol situava-se entre 30 e 35°C. Estudando, em seguida, a influência da concentração do extrato de levedura sobre essa produção, num meio contendo 10% de glicose, verificou que seu aumento de 0,25 a 2,0%, resultava num mais rápido consumo de glicose, acompanhado de um decréscimo da produção de D-arabitol. A concentração ótima de extrato de levedura nessa concentração de glicose foi considerada como sendo de 0,5%, a qual permitia o máximo consumo de glicose em 72 horas, com um rendimento em D-arabitol de 32,0% sobre o açúcar consumido. O aumento da concentração de glicose para 20 e 30%, no meio de cultura contendo 0,5% de extrato de levedura, levou a um aumento do tempo de fermentação. Este inconveniente pôde ser eliminado quando a concentração do extrato de levedura, nesses meios, foi aumentada de tal forma a manter a relação entre extrato de levedura e glicose do meio de 10% de glicose. Uma aeração de 200 m moles de O<sub>2</sub>/litro/hora, mostrou ser a mais adequada para produção de polióis, independentemente da concentração de açúcar usada, desde que a referida relação entre extrato de levedura e glicose fosse mantida. Melaço e água de maceração de milho foram estudados como substitutos do extrato de levedura. Tendo observado que uma concentração

de 10% de melaço no meio, substituía satisfatoriamente o extrato de levedura, permitindo uma produção de 32,1% de D-arabitol sobre o açúcar consumido, utilizou-a em uma série de fermentações, nas quais o nível de nitrogênio, na forma de uréia ou lactato de amônio foi variado. Observou, neste caso, que a produção de D-arabitol decresceu com o aumento do conteúdo de nitrogênio, independentemente da fonte utilizada. Comparando os resultados obtidos em meio de melaço, suplementado com uréia ou lactato de amônio, com aqueles obtidos em meio com extrato de levedura, concluiu que nitrogênio deve estar entre 0,07 e 0,086% para ótima produção de D-arabitol em meio contendo concentrações de glicose próximas de 10%. Em relação à influência de fosfato sobre a produção de D-arabitol, observaram que concentrações crescentes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , até 0,3 g/l, determinaram aumento na produção do poliálcool, aumento do desenvolvimento celular e da velocidade de utilização de glicose. Acima dessa concentração, a produção de D-arabitol decresceu. Adição de potássio e magnésio ao meio de cultura, aos níveis de 0,1 a 1 g/l de KCl e 0,05 a 0,5 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , não determinou variação na fermentação. Ensaaios de fermentações em escala piloto revelaram um rendimento de 40% de D-arabitol, sobre o açúcar contido em um meio de melaço, suplementado com uréia.

Estudando a adequabilidade de caldo de cana de açúcar como substrato para a produção de D-arabitol por Endomy-copsis burtonii, FALANGHE e CARUSO (1972) relataram as diferen

tes produções de D-arabitol, em função de variadas concentrações de carboidratos, nitrogênio, magnésio, fósforo e potássio, no meio de cultura. Utilizando um meio contendo 50% de caldo de cana de açúcar, adicionado unicamente de 0,09% de uréia, obtiveram um máximo rendimento, 42% de D-arabitol sobre o açúcar consumido, depois de 48 horas de fermentação. Nestas condições, as concentrações de fósforo, magnésio e potássio, presentes no caldo de cana de açúcar contido no meio de cultura, mostraram-se as mais adequadas para a melhor produção de D-arabitol.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. - Isolamento e identificação de leveduras osmofílicas

As leveduras osmofílicas, utilizadas neste trabalho, foram obtidas de amostras de melaço, armazenado ou recém obtido, da indústria de açúcar demerara, e de amostras de melado comercializado, por isolamento em meio seletivo. Os meios líquidos, utilizados para o isolamento seletivo dessas leveduras, continham 1,0% de extrato de levedura, 0,1% de uréia e concentrações variáveis de 40,0, 50,0, 60,0 ou 65,0% (p/p) de glicose dissolvida em água destilada, por aquecimento em banho maria. Os meios sólidos utilizados foram de igual composição, exceto pela adição de 2,0% de ágar. As amostras de melaço ou melado, diluídas ou sem diluição, foram transferidas, num volume de 0,1 ml, diretamente aos meios seletivos sólidos contidos em placas de Petri ou aos meios seletivos líquidos. Após incubação por 48 horas a 28°C, alíquotas do meio líquido foram transferidas para placas de Petri contendo meio sólido. As colônias que se desenvolveram nos meios sólidos, após 48 horas de incubação a 28°C, foram conservadas, após purificação, em tubos com meio de cultura inclinado, constituído de 20,0% de glicose e igual concentração de extrato de levedura, uréia e

ágar empregada no meio seletivo. As leveduras isoladas nas diferentes concentrações de glicose foram, em seguida, estudadas com relação à sua capacidade de crescimento em concentrações de glicose iguais, acima, e abaixo, àquelas nas quais foram isoladas, na faixa de 40 a 70% (p/p). Posteriormente, procedeu-se a sua identificação, de acordo com LODDER (1970).

### 3.2. - Desenvolvimento das leveduras, em cultura submersa, para produção de poliálcoois

O inóculo, para o desenvolvimento das leveduras, foi obtido por suspensão com 2,0 ml de água destilada e esterilizada, das células de uma cultura desenvolvida por 48 horas a 30°C, em meio de mesma composição que o de conservação. A suspensão de células, assim obtida, foi transferida para 50ml de meio líquido, de mesma composição no qual foram desenvolvidas, contido em frasco Erlenmeyer de 500 ml. A boca do frasco foi vedada por uma delgada camada de algodão envolvida em gaze, e presa ao frasco por elástico. Em seguida, este frasco foi colocado em um agitador rotatório, de 2,5 cm de excentricidade, desenvolvendo 240 r.p.m., a uma temperatura de 30°C, por 48 horas. O inóculo assim obtido foi transferido, num volume de 2,5 ml, para 50 ml dos meios de cultura para produção de poliálcoois, contidos em frascos Erlenmeyers de 500 ml, com o mesmo tipo de tampão acima referido. As culturas, em todos

os experimentos, foram desenvolvidos sob as mesmas condições de agitação à mesma temperatura utilizadas para o desenvolvimento do inóculo. As culturas, isoladas e identificadas, tiveram sua capacidade de produção de poliálcoois avaliadas, após desenvolvimento por 48 horas, em meio líquido contendo 10,0 % de glicose, 0,5% de extrato de levedura e 0,1% de uréia. Nos estudos posteriores, as amostras para análises foram coletadas a intervalos de 24 horas, durante um período de 72 ou 96 horas.

### 3.3. - Meios de cultura para produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

#### 3.3.1 - Efeito da variação da concentração de extrato de levedura, uréia e glicose

Concentrações de 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% de extrato de levedura foram adicionadas a meios de cultura contendo 10,0% de glicose e 0,1% de uréia, a fim de se observar o efeito dessas concentrações na produção de poliálcoois por Saccaromyces rouxii.

O efeito da concentração de uréia, na produção de poliálcoois por essa levedura, foi determinado em meios contendo 10,0% de glicose, 0,75% de extrato de levedura, sem adição de uréia ou adicionados de uréia nas concentrações de 0,05, 0,10

e 0,20%.

A variação da produção de poliálcoois, em função de concentrações de 10,0; 20,0 e 30,0% de glicose, foi estudada em meios contendo extrato de levedura e uréia. Os teores de extrato de levedura e uréia, em cada meio, foram ajustados a fim de se manter, em todos os meios, a mesma relação entre glicose e esses nutrientes. Disso resultaram os meios com as composições abaixo:

	Meio I	Meio II	Meio III
Glicose, g/l .....	100,0	200,0	300,0
Extrato de levedura, g/l..	7,5	15,0	22,5
Uréia, g/l .....	0,5	1,0	1,5

### 3.3.2 - Efeito da variação da fonte de nitrogênio

A produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii, em função de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultura, foi estudada pelo confronto dos resultados previamente obtidos nos meios contendo uréia, com aqueles obtidos em meios contendo tartarato de amônio, sulfato de amônio ou fosfato de amônio monobásico, em quantidades tais que, resultaram em níveis de nitrogênio iguais àqueles dos meios contendo diferentes concentrações de uréia.

### 3.3.3 - Efeito da adição de cloreto de sódio

O efeito da adição de cloreto de sódio, ao meio de cultura, na produção de poliálcoois, foi observado pelo confronto dos resultados obtidos em um meio contendo 10,0% de glicose, 0,75% de extrato de levedura e, 0,05% de uréia, com os resultados obtidos pela utilização de meios de igual composição, adicionados de 5,0%, 10,0% e 15,0% (p/v), de cloreto de sódio, respectivamente.

### 3.3.4. - Efeito da variação do volume do meio de cultura

O volume de um meio com 10% de glicose, 0,75% de extrato de levedura e 0,05% de uréia, foi variado de 20 a 50 ml em frascos Erlenmeyers de 500 ml, a fim de se obter diferentes aerações, durante a fermentação.

Todos os meios de cultura utilizados neste trabalho foram sempre esterilizados sob pressão, a 121°C, por 15 minutos.

## 3.4. - Métodos analíticos

A determinação do volume de células das leveduras

foi obtido após centrifugação de alíquotas de 10 ml das amostras do meio fermentado, a 2.000 r.p.m. durante 15 minutos.

A glicose foi determinada pela utilização do reagente cúprico-alcálico de SOMOGYI (1945) e do reagente de arsenomolibdato de NELSON (1944).

Os poliálcoois foram determinados, como glicerol, pelo método de LAMBERT e NEISH (1950) e, sua identificação foi feita por cromatografia em papel (HOUGH, 1950). Como sistema de solvente utilizou-se fenol-água (4:1, p/v) sendo os poliálcoois detectados segundo TREVELYAN e colaboradores (1950). Os cromatogramas foram sempre obtidos pela utilização de 10 microlitros de amostras previamente desproteinizadas.

Todas as determinações colorimétricas foram precedidas de desproteinação das amostras, com sulfato de zinco a 25% e hidróxido de sódio 5 N, de acordo com SOMOGYI (1930).

O nitrogênio total, no extrato de levedura utilizado, foi determinado pelo método Micro Kjeldahl (BAILLEY, 1967).

Todos os resultados obtidos neste trabalho representam a média de duas repetições.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### 4.1. - Isolamento e identificação das leveduras osmofílicas

Dada a seletividade dos meios de isolamento, de um grande número de amostras de melaço e melado, utilizadas neste trabalho, somente vinte e oito colônias de leveduras puderam ser isoladas. Pela observação dos dados constantes da Tabela I, verificou-se que, das vinte e oito culturas, doze puderam ser isoladas do meio contendo 40,0% de glicose, oito do meio contendo 50,0%, sete do meio contendo 60,0% e uma do meio contendo 65,0% de glicose. Com relação à sua capacidade de crescimento em meio contendo 60,0% de glicose, verificou-se que, dezessete delas foram capazes de crescer a essa concentração, enquanto as onze restantes não apresentaram nenhum crescimento. Em concentrações de 40,0 e 50,0%, 65,0 e 70,0%, todas as leveduras apresentaram crescimento nas duas primeiras concentrações e ausência de crescimento nas duas últimas. As leveduras isoladas, de acordo com o que se observa na Tabela II, foram classificadas no gênero Saccharomyces, compreendendo sete espécies e três variedades dessas espécies.

TABELA I - Origem, meio de isolamento e crescimento a 60% de glicose, das leveduras isoladas.

Cultura Nº	Origem	% glicose no meio de isolamento	Crescimento em 60% glicose
1	Melaço	40,0	+
2	"	40,0	+
3	"	40,0	-
4	Melado	40,0	+
5	"	50,0	-
6	Melaço	60,0	+
7	Melado	50,0	-
8	Melaço	40,0	-
9	Melado	50,0	-
10	Melaço	60,0	+
11	"	40,0	+
12	Melado	40,0	+
13	Melaço	60,0	+
14	Melado	65,0	-
15	Melaço	40,0	+
16	"	50,0	+
17	Melado	50,0	-
18	"	40,0	-
19	Melaço	50,0	+
20	"	40,0	-
21	"	40,0	+
22	"	40,0	-
23	"	60,0	+
24	"	60,0	+
25	"	50,0	+
26	"	50,0	-
27	"	60,0	+
28	"	60,0	+

(+) = crescimento

(-) = não crescimento

TABELA II - Classificação das leveduras isoladas.

Nº da cultura	Espécie
1, 2, 4, 6, 10,11,12,13, 15,16,21,24, 25 e 28	<u>Saccharomyces rouxii</u> <u>Boutroux</u>
5, 7, 9, 17 e 18	<u>Saccharomyces bisporus</u> (Naganishi) <u>Lodder et Kreger van Rij</u> var. <u>bisporus</u>
14 e 26	<u>Saccharomyces bailii</u> <u>Lindner</u> var. <u>bailii</u>
19, 23 e 27	<u>Saccharomyces bailii</u> <u>Lindner</u> var. <u>osmophilus</u> <u>van der Walt</u>
8	<u>Saccharomyces uvarum</u> <u>Beijerinck</u>
22	<u>Saccharomyces chevalieri</u> <u>Guilliermond</u>
3 e 20	<u>Saccharomyces rosei</u> (Guilliermond) <u>Lodder et Kreger van Rij</u>

#### 4.2. - Produção de poliálcoois pelas leveduras isoladas

Na Tabela III são apresentadas as produções de poliálcoois das leveduras, após 48 horas de fermentação. Pelos resultados obtidos, verificou-se que algumas leveduras consumiram, praticamente, todo o açúcar nas 48 horas de fermentação. Essa diferença foi notada, inclusive, entre diferentes linhagens de uma mesma espécie. As melhores produções de poliálcoois foram observadas entre as linhagens de Saccharomyces rouxii, entre as quais, encontramos a linhagem 16 que, embora consumindo glicose moderadamente, produziu o maior teor de poliálcool (2,586%, p/v). Ainda, entre as linhagens desta espécie, a linhagem 13 apresentou o melhor índice de conversão de glicose em poliálcoois, demonstrado pelo alto rendimento de 52,77%, porém, o pequeno consumo de glicose, resultou em baixo teor de poliálcoois no meio (1,219%, p/v). Entre as demais espécies isoladas, não encontramos linhagens que apresentassem tão altas produções de poliálcoois, muito embora a linhagem 7, Saccharomyces bisporus var. bisporus e a 14, Saccharomyces bailii var. bailii, tenham apresentado uma boa produção. Tendo em vista o interesse por leveduras que produzam boas quantidades de poliálcoois, em um período de fermentação não muito longo, observou-se que, das linhagens que consumiram, praticamente, todo o açúcar em 48 horas, as linhagens 4 e 12 destacaram-se

TABELA III - Produção de poliálcoois pelas leveduras isoladas.

Nº	Linhagem		Glicose		Poliálcool *	Rendimento**
	Espécie		Inicial % (p/v)	Final %(p/v)		
1	<u>S. rouxii</u>		9,80	8,76	0,358	34,42
2	"		9,80	6,17	1,471	40,52
4	"		9,82	0,87	1,962	21,92
6	"		9,82	4,57	2,353	44,81
10	"		9,80	6,72	1,316	42,72
11	"		9,82	8,04	0,735	41,29
12	"		9,82	0,81	2,105	23,36
13	"		9,80	7,49	1,219	52,77
15	"		9,82	3,83	2,432	40,60
16	"		9,82	4,12	2,586	45,36
21	"		9,80	7,84	0,593	30,42
24	"		9,80	6,26	1,618	45,71
25	"		9,80	5,68	1,636	39,71
28	"		9,80	6,08	1,623	43,63
5	<u>S. bisporus</u> var. <u>bisporus</u>		9,80	0,30	1,095	11,52
7	"	"	9,82	1,60	1,457	17,73
9	"	"	9,82	1,87	0,622	7,82
17	"	"	9,80	2,71	1,023	14,42
18	"	"	9,80	0,77	1,081	11,97
14	<u>S. bailli</u> var. <u>bailli</u>		9,80	1,02	1,415	16,12
26	"	"	9,80	3,06	0,964	14,30
19	<u>S. bailli</u> var. <u>osmophilus</u>		9,82	2,55	1,061	14,59
23	"	"	9,80	0,12	0,473	4,88
27	"	"	9,80	2,81	0,987	14,12
8	<u>S. uvarum</u>		9,82	1,33	0,342	4,03
22	<u>S. chevalieri</u>		9,80	1,42	0,305	3,64
3	<u>S. rosei</u>		9,82	5,01	0,614	12,77
20	"		9,82	5,40	0,705	15,95

\* - Expresso como glicerol

\*\* - Poliálcool em função da glicose consumida.

das demais. Porém, melhores produções foram observadas para as linhagens 6, 15 e 16, as quais, consumiram cêrca de 50 a 60% da glicose disponível. Estas taxas intermediárias de consumo de glicose, nos permitiram supor que, uma pequena extensão do tempo de fermentação, ensejaria um aumento do consumo de glicose e, conseqüente aumento de produção de poliálcoois, por estas leveduras. No caso da linhagem 13, não obstante seu elevado rendimento, o seu baixo consumo de açúcar levou-nos a considerar que, na melhor das hipóteses, somente um tempo demasiadamente longo, poderia proporcionar elevada produção de poliálcoois. Dentro do grupo de leveduras que apresentaram maior produção de poliálcoois, com consumo intermediário de glicose, selecionamos a cultura de levedura Saccharomyces rouxii, linhagem 16, de produção de poliálcoois ligeiramente mais elevada, para os posteriores estudos deste trabalho.

#### 4.3. - Efeito da variação da concentração de extrato de levedura, sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii

Os efeitos da variação da concentração de extrato de levedura na produção de poliálcoois, podem ser observados pelos resultados apresentados na Tabela IV. Verificou-se que, o consumo de glicose e o desenvolvimento celular estão relacionados com a concentração de extrato de levedura no meio de cul

TABELA IV - Efeito da variação da concentração de extrato de levedura sobre a produção de Poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo h	Extrato de levedura %(p/v)	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliál cool* %(p/v)	Rendi- mento** %(p/p)
				Inicial % (p/v)	Residual % (p/v)		
24	0,25	2,5	3,27	10,09	7,79	1,014	44,08
48	0,25	3,0	3,20	10,09	7,40	1,493	55,50
72	0,25	3,0	3,22	10,09	5,95	2,204	53,24
96	0,25	3,0	3,15	10,09	5,03	2,698	53,32
24	0,50	4,0	3,35	10,05	6,80	1,174	36,12
48	0,50	5,5	3,36	10,05	4,63	2,327	42,93
72	0,50	5,5	3,42	10,05	2,09	3,382	42,49
96	0,50	6,0	3,46	10,05	0,39	4,068	42,11
24	0,75	7,0	3,44	10,39	4,89	1,231	22,38
48	0,75	8,0	3,40	10,39	1,79	2,760	32,09
72	0,75	8,0	3,52	10,39	0,06	3,691	35,73
96	0,75	8,5	3,57	10,39	0,05	3,426	33,13
24	1,00	7,0	3,58	10,54	3,67	1,372	19,97
48	1,00	9,0	3,54	10,54	0,21	2,433	23,55
72	1,00	9,0	3,58	10,54	0,06	2,199	20,98
96	1,00	10,0	3,73	10,54	0,07	2,433	23,24

\* - Expresso como glicerol.

\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

tura. Quando essa concentração foi de 1,0%, a fermentação , praticamente, completou-se em 48 horas e, o volume de células produzido foi mais elevado do que aqueles obtidos em todas as demais concentrações. Para a concentração de 0,25% de extrato de levedura, após 96 horas de fermentação, apenas 50% da glicose inicialmente disponível foi consumida, com o mais baixo desenvolvimento celular, em relação às demais concentrações. Pelos rendimentos obtidos observou-se que, à medida que as fermentações foram mais rápidas, pelo aumento da concentração de extrato de levedura no meio, a conversão de glicose em poliálcoois decresceu.

Esse mesmo efeito foi observado, para diferentes leveduras osmofílicas, em trabalhos realizados por PETERSON e colaboradores (1958), HAJNY e colaboradores (1960) e HAJNY (1964). Os resultados obtidos por ONISHI e colaboradores (1961) para Pichia miso mostraram que o aumento da concentração de extrato de levedura no meio, resultou em uma diminuição do consumo de glicose.

Quanto à produção absoluta de poliálcoois, a concentração de 0,75% de extrato de levedura, foi considerada a mais indicada para a levedura estudada, pois, a maior produção desses álcoois foi obtida nessa concentração, após 72 horas de fermentação. Essa produção só foi superada à concentração de 0,50%, a custa de um prolongamento da fermentação por 24 horas.

4.4. - Efeito da concentração de uréia sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Pelos resultados apresentados na Tabela V, verificou-se que, a adição de uréia, nas diferentes concentrações, não alterou grandemente os rendimentos obtidos após 24, 48 e 72 horas de fermentação, pois, embora a elevação da concentração de uréia no meio, geralmente determinasse discretos aumentos na produção de poliálcoois, estes foram obtidos a custa de um mais elevado consumo de açúcar. Efeitos semelhantes, determinados pela presença de uréia no meio de cultura, foram também observados por SPENCER e SALLANS (1956) com outra linhagem de S. rouxii, debaixo de diferentes condições de cultura. A presença de uréia no meio de cultura, entretanto, abreviou o tempo de fermentação de S. rouxii, como observado por HAJNY e colaboradores (1960), com Torulopsis magnoliae.

Desde que, pela variação das concentrações de uréia os rendimentos não foram grandemente afetados, não se torna necessário adicionar ao meio mais que 0,05% de uréia.

4.5. - Efeito da concentração de glicose na produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii

A influência da concentração de glicose no meio de

TABELA V - Efeito da concentração de uréia sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo h	Uréia %(p/v)	Nitrogênio total** % (p/v)	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliál- coois * % (p/v)	Rendi- mento** % (p/p)
					Inicial % (p/v)	Residual % (p/v)		
24	0,00	0,075	6,0	3,25	11,18	5,95	0,845	16,15
48	0,00	0,075	6,0	3,22	11,18	4,08	2,092	29,46
72	0,00	0,075	6,5	3,32	11,18	1,38	3,121	31,84
24	0,05	0,098	6,0	3,25	10,95	4,86	1,006	16,50
48	0,05	0,098	6,5	3,34	10,95	1,61	2,544	27,23
72	0,05	0,098	7,0	3,49	10,95	0,05	3,534	32,42
24	0,10	0,121	7,0	3,30	10,37	4,79	1,072	19,21
48	0,10	0,121	7,0	3,36	10,37	0,97	2,671	28,40
72	0,10	0,121	8,0	3,49	10,37	0,05	3,058	29,63
24	0,20	0,167	6,5	3,32	10,60	4,79	1,232	21,20
48	0,20	0,167	7,0	3,32	10,60	0,78	2,790	28,20
72	0,20	0,167	7,0	3,52	10,60	0,07	3,364	31,94

\* - Expresso como glicerol

\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

\*\*\* - O extrato de levedura continha 9,97% N.

cultura sobre a produção de poliálcoois, pode ser observada através dos resultados constantes da Tabela VI. O aumento da concentração de 10,0% de glicose no meio para 20,0 e 30,0% , resultou em um decréscimo na taxa de conversão de glicose a poliálcoois, como revelado pelos menores rendimentos obtidos às concentrações mais elevadas de glicose. Nos três casos , as fermentações foram completadas a 72 horas, pois, aos níveis de 10,0 e 20,0% de glicose, o meio se apresentou, praticamente, esgotado a este intervalo de tempo e, ao nível de 30,0%, num prolongamento da fermentação por 24 horas não resultou em consumo adicional de glicose. A concentração de 10,0% de glicose, apresentou-se, pois, como a mais indicada para a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii, após 72 horas de fermentação, a não ser que se considere compensadora a maior produção absoluta de poliálcoois, ao nível de 30,0%, a custa de um mais elevado consumo de glicose. Utilizando uma linhagem de Pichia miso, ONISHI (1960b) observou maiores rendimentos na produção de poliálcoois, em meios contendo 30,0 a 40,0% de glicose, enquanto SPENCER e colaboradores (1957) não observaram variação na conversão de glicose a poliálcoois, por Saccharomyces rouxii nem mesmo a concentração de glicose a 30%.

TABELA VI - Efeito da concentração de glicose sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Meio *	Tempo de fermentação h	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose Residual % (p/v)	Poliálcool** %(p/v)	Rendimento*** %(p/p)
I	24	5,5	3,40	5,07	1,140	24,25
	48	6,5	3,28	2,03	2,493	32,00
	72	8,0	3,28	0,05	3,143	32,33
	96	7,0	3,37	0,05	3,100	31,89
II	24	8,0	3,56	8,05	1,681	14,78
	48	9,0	3,70	1,59	3,037	17,02
	72	11,0	3,74	0,13	2,864	14,84
	96	9,0	3,84	0,15	2,992	15,51
III	24	8,0	3,86	13,78	1,363	9,89
	48	7,0	4,16	5,95	4,329	20,04
	72	7,0	4,18	3,66	4,238	17,73
	96	6,0	4,23	3,77	4,179	17,57

\* - Os meios I, II e III continham, respectivamente, 9,77, 19,43 e 27,55% de glicose inicial.

\*\* - Expresso como glicerol

\*\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

4.6. - Efeito da variação da fonte de nitrogênio na produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Pela observação da Tabela VII verificou-se que variações das concentrações de tartarato de amônio, quando utilizado em substituição à uréia, não influíram sobre o tempo de fermentação, pois esta completou-se em 72 horas para os três níveis de nitrogênio utilizados. Entretanto, as melhores produções de poliálcoois foram obtidas nos meios contendo 0,306 e 0,612% de tartarato de amônio. A capacidade do microrganismo de converter glicose em polióis nesses dois meios, após 72 horas de fermentação, mostrou-se comparável àquela apresentada no meio contendo 0,05% de uréia (Tabela V) como revelam os rendimentos obtidos nesses três meios. Estas concentrações de tartarato de amônio, entretanto, resultaram numa maior concentração de nitrogênio no meio do que aquela obtida pela adição de 0,05% de uréia, como mostram os dados das Tabelas V e VII. Os maiores rendimentos obtidos às 24 e 48 horas de fermentação, quando tartarato de amônio foi utilizado no meio em substituição à uréia (Tabela V e VII), aos mesmos níveis de nitrogênio, foram consequência de um retardamento no consumo de glicose pela levedura, na presença desse sal, acompanhado de uma maior capacidade de conversão de glicose a poliálcool.

A substituição da uréia por sulfato de amônio, como

TABELA VII - Efeito da concentração de tartarato de amônio sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo de h	Tartarato de amônio % (p/v)	Nitrogênio total*** % (p/v)	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliál- coois * % (p/v)	Rendi- mento** % (p/p)
					Inicial % (p/v)	Residual % (p/v)		
24	0,153	0,098	5,0	3,10	10,58	5,87	1,062	22,55
48	0,153	0,098	6,0	2,86	10,58	2,28	2,707	32,61
72	0,153	0,098	8,0	2,96	10,58	0,06	2,753	26,17
24	0,306	0,121	5,0	3,47	10,36	5,52	1,072	22,15
48	0,306	0,121	6,0	3,02	10,36	1,48	2,656	29,91
72	0,306	0,121	8,0	3,10	10,36	0,07	3,261	31,69
24	0,612	0,167	5,0	3,88	9,83	5,71	1,029	24,98
48	0,612	0,167	7,0	3,64	9,83	1,82	2,645	33,02
72	0,612	0,167	7,0	3,71	9,83	0,09	3,187	32,72

\* - Expresso como glicerol

\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

\*\*\* - O extrato de levedura continha 9,97% N.

podemos observar pelos resultados constantes das Tabelas V e VIII, resultou em um consumo mais lento de glicose e uma pronunciada redução na produção de poliálcoois, que se acentua com o aumento da concentração de nitrogênio no meio, como também observado por SPENCER e SALLANS (1956) para outra linhagem de S. rouxii, embora debaixo de outras condições de cultura.

A adição de nitrogênio aos meios de cultura, na forma de fosfato de amônio monobásico, em substituição à uréia, levou a uma drástica redução na produção de poliálcoois que se pronunciou nas duas concentrações mais elevadas de fosfato, como revela o confronto dos dados constantes das Tabelas V e IX. O efeito negativo do fosfato foi também caracterizado - pela reduzida produção celular, sempre inferior àquelas obtidas com as demais fontes de nitrogênio utilizadas (Tabelas V, VII, VIII e IX). Observa-se também, pelos dados da Tabela IX que, aos níveis mais elevados de fosfato, a fermentação pode ser considerada terminada às 24 horas, pois, após esse período de tempo, os resultados relativos ao consumo de glicose e produção de poliálcoois, praticamente não se alteraram. Ao menor nível de fosfato, poder-se-ia dizer que a fermentação - prosseguiu após 24 horas, entretanto, apenas pelo aumento dos poliálcoois.

Observando-se os resultados obtidos quando tartarato, sulfato e fosfato de amônio foram adicionados ao meio (Tabelas VII, VIII e IX), em confronto com aqueles obtidos

TABELA VIII- Efeito da concentração de sulfato de amônio sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo h	Sulfato de Nitrogênio		Volume de células		pH	Glicose		Poliálcoois*		Rendimento** %(p/p)
	amônio %(p/v)	total*** %(p/v)	céluas %(v/v)	% (p/v)		Inicial %(p/v)	Residual %(p/v)	coois* %(p/v)	coois* %(p/v)	
24	0,11	0,098	4,0	2,44	2,44	8,69	5,50	0,810	0,810	25,39
48	0,11	0,098	5,0	2,46	2,46	8,69	3,22	1,662	1,662	30,38
72	0,11	0,098	7,0	2,46	2,46	8,69	1,55	2,470	2,470	34,59
24	0,22	0,121	3,5	2,53	2,53	8,86	5,99	0,814	0,814	28,36
48	0,22	0,121	5,5	2,32	2,32	8,86	3,76	1,493	1,493	29,27
72	0,22	0,121	4,5	2,25	2,25	8,86	1,82	2,276	2,276	32,33
24	0,44	0,167	2,5	2,70	2,70	9,29	6,30	0,748	0,748	25,02
48	0,44	0,167	5,0	2,54	2,54	9,29	3,68	1,222	1,222	21,78
72	0,44	0,167	3,0	2,54	2,54	9,29	2,80	1,026	1,026	15,81

\*- Expresso como glicerol

\*\*- Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

\*\*\*- O extrato de levedura continha 9,97% N.

TABELA IX - Efeito da adição de fosfato de amônio monobásico sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxi.

Tempo h	Fosfato de amônio % (p/v)	Nitrogênio total*** % (p/v)	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliálcoois* % (p/v)	Rendimento** % (p/p)
					Inicial	Residual		
24	0,182	0,098	1,5	2,86	9,61	6,37	0,650	20,06
48	0,182	0,098	3,0	2,96	9,61	6,48	0,768	24,54
72	0,182	0,098	1,5	2,92	9,61	6,22	1,182	34,87
24	0,364	0,121	2,5	2,97	9,36	6,84	0,598	23,73
48	0,364	0,121	3,0	2,96	9,36	6,79	0,565	21,98
72	0,364	0,121	1,5	3,02	9,36	7,10	0,460	20,35
24	0,728	0,167	2,0	3,10	9,07	7,06	0,591	29,40
48	0,728	0,167	2,0	2,82	9,07	6,62	0,689	28,12
72	0,728	0,167	1,5	3,00	9,07	7,10	0,485	24,62

\* - Expresso como glicerol

\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

\*\*\* - O extrato de levedura continha 9,97% N.

quando utilizamos um meio contendo apenas glicose e extrato de levedura (Tabela V), verifica-se que pela adição de tartarato de amônio ao meio de cultura, o consumo de glicose por S. rouxii aumenta enquanto que a produção de poliálcool não é grandemente alterada, como previamente observado em meio contendo uréia. Por outro lado, verifica-se que a adição de fosfato e sulfato de amônio resulta em um decréscimo no consumo de glicose e, de modo geral, em sensível diminuição na produção de poliálcool. Resultados semelhantes foram obtidos por SPENCER e SALLANS (1956), exceto pelo maior consumo de açúcar, observado por esses autores, no meio contendo sulfato de amônio.

4.7. - Efeito da adição de cloreto de sódio na produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Os dados constantes da Tabela X revelam que a adição de cloreto de sódio ao meio de cultura resultou em um consumo mais lento de glicose, o qual se acentuou com o aumento da concentração de cloreto de sódio. A taxa de conversão de glicose em poliálcoois, como revelam os rendimentos obtidos, foi crescente à medida que a fermentação prosseguiu até 72 horas no meio sem cloreto de sódio e no meio contendo 5,0% desse sal. O menor teor de poliálcoois, determinado às 96 ho-

TABELA X - Efeito da adição de cloreto de sódio sobre a produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo h	Cloreto de Sódio % (p/v)	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliálcool* %(p/v)	Rendi- mento** %(p/p)
				Inicial % (p/v)	Redisual % (p/v)		
24	0,0	5,0	3,20	10,49	5,44	0,881	17,45
48	0,0	7,0	3,25	10,49	2,65	1,979	25,37
72	0,0	8,0	3,16	10,49	0,07	3,148	30,21
96	0,0	8,0	3,25	10,49	0,05	2,848	27,28
24	5,0	4,0	3,39	10,11	7,75	0,696	29,49
48	5,0	6,5	3,33	10,11	4,88	1,652	31,59
72	5,0	7,5	3,32	10,11	2,37	2,592	33,49
96	5,0	8,0	3,30	10,11	0,29	2,931	29,85
24	10,0	2,0	3,65	10,18	8,77	0,491	34,82
48	10,0	6,5	3,40	10,18	5,00	0,990	19,11
72	10,0	7,5	3,22	10,18	2,78	1,342	18,14
96	10,0	7,5	3,30	10,18	1,06	1,918	21,03
24	15,0	0,5	4,14	10,22	9,76	0,461	100,22
48	15,0	4,0	3,52	10,22	7,07	1,035	32,86
72	15,0	7,5	3,45	10,22	4,30	1,041	17,58
96	15,0	7,0	3,40	10,22	2,45	1,351	17,39

\* - Expresso como glicerol

\*\* Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

ras no meio sem adição de cloreto de sódio sugere que, quando o açúcar está em muito baixa concentração, tal como ocorreu neste meio a este intervalo de tempo, o microrganismo possivelmente começou a consumir poliálcool, determinando assim, um decréscimo no rendimento, assim como anteriormente observado por FALANGHE e CARUSO (1972), na produção de D-arabitol por Endomycopsis burtoni. Esse consumo de poliálcoois, às 96 horas, não foi entretanto observado nos meios com adição de cloreto de sódio, nos quais existe maior disponibilidade de glicose. O baixo desenvolvimento celular observado, às 24 horas de fermentação, nos meios contendo 10,0 e 15,0% de cloreto de sódio, revelam uma dificuldade de desenvolvimento do microrganismo a essas elevadas concentrações do sal. Neste caso, as poucas células produzidas apresentaram uma elevada capacidade de conversão de glicose a poliálcoois, como revelado pelos rendimentos obtidos. A adaptação do microrganismo a esses dois meios, revelada pelo maior desenvolvimento celular, nos intervalos de tempo seguintes resultou, por outro lado, numa diminuição drástica dessa capacidade de conversão.

O aumento mais moderado da conversão de glicose a poliálcoois, no meio com 5% de cloreto de sódio, como permite observar o confronto dos rendimentos obtidos às 24 horas de fermentação nesse meio e no meio sem NaCl, não foi, entretanto, diminuído mas ao contrário, aumentado durante a adaptação, como observado acima, permitindo que, aos intervalos de tempo

subsequentes, a conversão continuasse melhor do que nos meios sem adição de NaCl, embora a diferença entre os rendimentos do meio com 5% e do meio sem cloreto de sódio, fosse gradativamente decrescendo com a adaptação do microrganismo ao cloreto de sódio.

A surpreendente taxa de conversão de glicose a poliálcool, nas primeiras 24 horas de adaptação do microrganismo ao meio com 15% de cloreto de sódio, sugere estudos sobre a possibilidade de fixação dessa característica, por obtenção de um mutante capaz de crescer em meio com 15% de cloreto de sódio, da mesma forma que a cultura original em meio sem cloreto de sódio.

#### 4.8. - Efeito da aeração na produção de poliálcoois por *Saccharomyces rouxii*.

Pela observação dos resultados constantes da Tabela XI verifica-se que um aumento na aeração do meio de cultura determina um mais lento consumo de glicose que, associado a uma maior produção de poliálcoois, resulta em rendimentos crescentes. Verifica-se assim que a capacidade de conversão de glicose a poliálcoois pela levedura, é favorecida pelo aumento da aeração, dentro dos limites estudados. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por SPENCER e SHU (1957), quando ensaiaram variadas condições de aeração para a produção de poliál, com outra linhagem da mesma levedura.

TABELA XI - Efeito da aeração na produção de poliálcoois por Saccharomyces rouxii.

Tempo h	Volume de meio ml	Volume de células % (v/v)	pH	Glicose		Poliálcool * %(p/v)	Rendi- mento** %(p/p)
				Inicial % (p/v)	Residual % (p/v)		
24	20	4,5	3,22	11,16	7,12	1,455	36,01
48	20	8,0	3,05	11,16	2,16	3,108	34,92
72	20	8,0	3,38	11,16	0,08	4,884	44,07
96	20	9,0	3,52	11,16	0,08	4,071	36,74
24	35	5,5	3,23	10,89	5,99	1,210	24,69
48	35	7,5	3,10	10,89	1,55	2,386	25,54
72	35	8,5	3,44	10,89	0,07	3,790	35,02
96	35	9,0	3,57	10,89	0,06	3,359	31,01
24	50	5,0	3,24	10,53	5,64	1,007	20,59
48	50	7,0	3,15	10,53	1,41	2,302	25,24
72	50	8,0	3,30	10,53	0,06	2,746	26,22
96	50	8,0	3,58	10,53	0,06	2,584	24,68

\* - Expresso como glicerol

\*\* - Poliálcool produzido em função da glicose consumida.

4.9. - Análise qualitativa de poliálcoois produ-  
zidos por Saccharomyces rouxii.

Os cromatogramas esquematizados nas figuras 1, 2 , 3, 4 e 5 revelam a análise qualitativa dos poliálcoois produ- zidos por Saccharomyces rouxii, em meios contendo variadas concentrações de extrato de levedura, uréia, tartarato de amô- nio, sulfato de amônio e fosfato de amônio, respectivamente . Pela observação da figura 3, verifica-se que os meios contem- do tartarato de amônio, em todas as concentrações experimenta- das, induziram a levedura a uma ponderável formação de glice- rol, juntamente a D-arabitol. Nos demais meios o microrga- nismo restringiu-se, praticamente, a produção de D-arabitol , pois como podemos observar pela esquematização dos cromatogra- mas, apenas traços de glicerol puderam ser detectados.

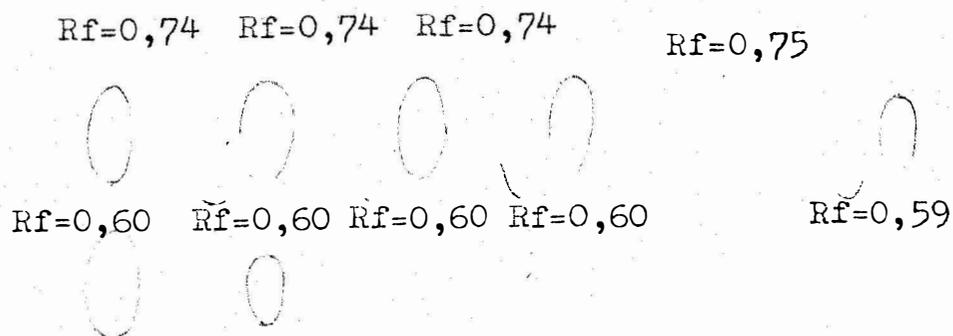
O exame do cromatograma esquematizado na figura 6 , referente a produção de polióis por Saccharomyces rouxii em presença do cloreto de sódio, revela que a adição de 5, 10 e 15% desse sal no meio de cultura, determina um ponderável au- mento na produção de glicerol por esse microrganismo como ob- servado por ONISHI (1959) com outra linhagem de S. rouxii e concentração de 18% de cloreto de sódio no meio.

O esquema representativo do cromatograma de amostras de meios de cultura contendo 10, 20 e 30% de glicose, fermen- tados por Saccharomyces rouxii, revela que as diferentes con-

centrações de glicose não influem sobre as produções qualitativas dos polióis, sendo D-arabitol o principal produto da fermentação em todas as concentrações de glicose.

Todos os cromatogramas executados, a partir de amostras retiradas de mesmo meio de cultura experimentado, aos de mais intervalos de fermentação, mostraram os mesmos resultados.

Frente do solvente



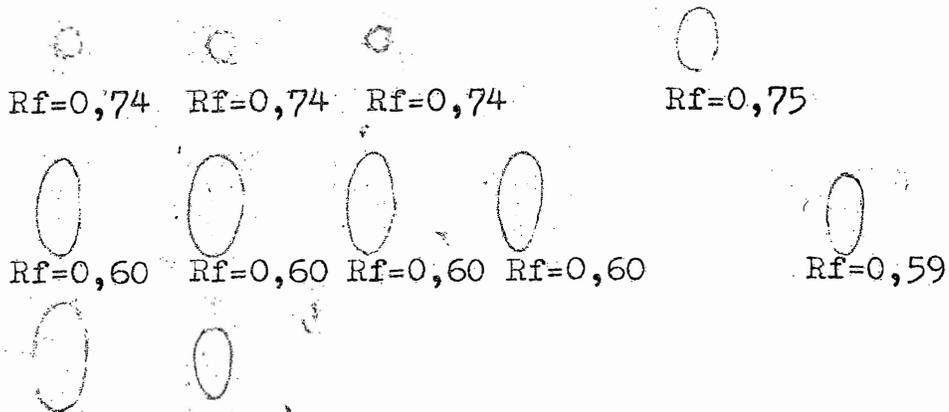
1	2	3	4	Glicerol	D-arabi tol	Glicose
---	---	---	---	----------	----------------	---------

1	M̄io	contendo	0,25%	de	extrato	de	levedura
2	"	"	0,50%	"	"	"	"
3	"	"	0,75%	"	"	"	"
4	"	"	1,00%	"	"	"	"

Detecc̄ō de traços do poliálcool.

Fig. 1 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação por S. rouxii, em meios contendo diferentes concentrações de extrato de levedura.

Frente do solvente



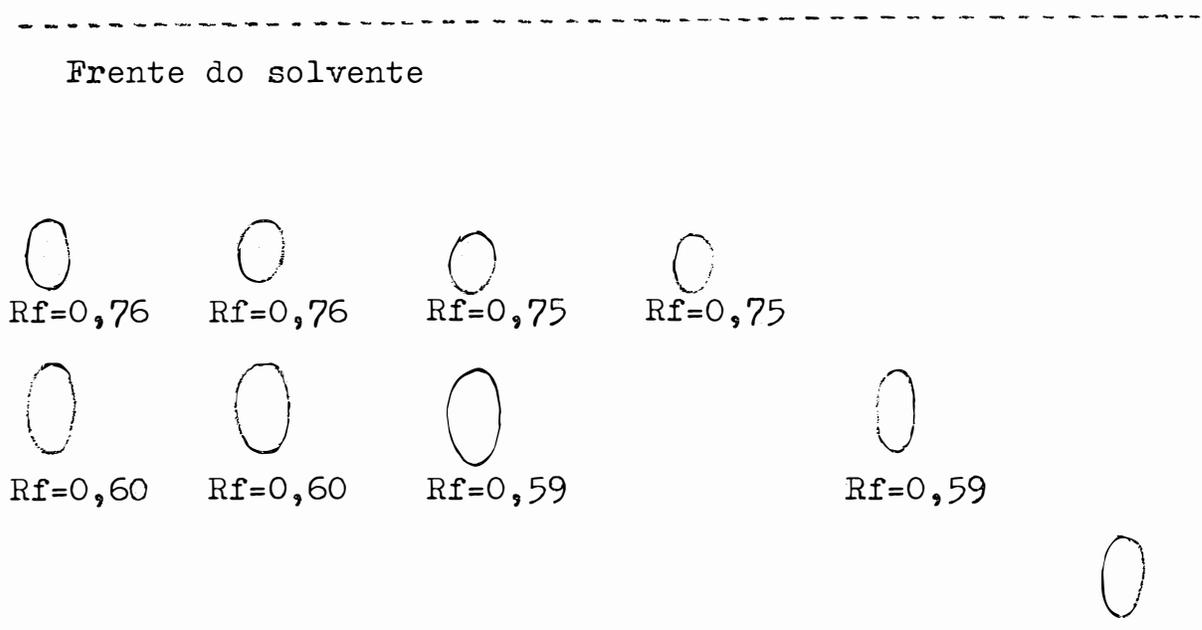
1	2	3	4	Glicerol	D-arabi tol	Glicose
---	---	---	---	----------	----------------	---------

- 1 - Meio contendo 0,25% de extrato de levedura
- 2 - " " 0,50% " " " "
- 3 - " " 0,75% " " " "
- 4 - " " 1,00% " " " "

○ - Detecção de traços do poliálcool.

Fig. 1 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação por S. rouxii, em meios contendo diferentes concentrações de extrato de levedura.

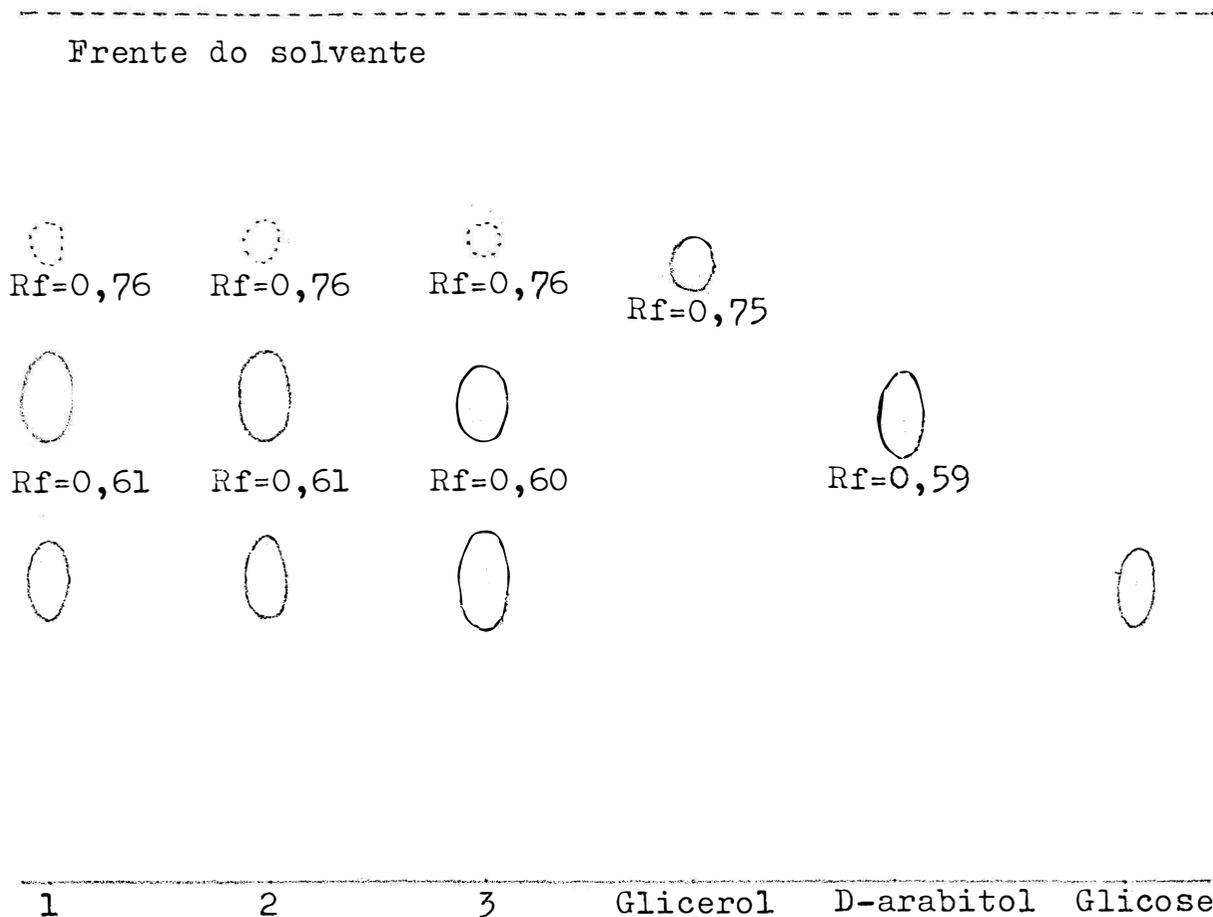




---

1	2	3	Glicerol	D-arabitol	Glucose
1 - Meio contendo 0,153% de tartarato de amônio					
2 - " " 0,306% " " "					
3 - " " 0,612% " " "					

Fig. 3 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação por S. rouxii, em meios contendo diferentes concentrações de tartarato de amônio.

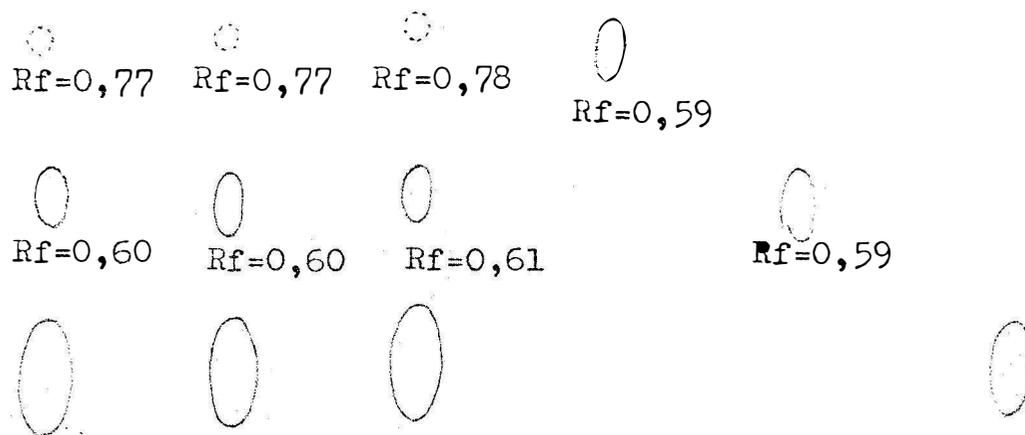


- 1 - Meio contendo 0,11% de sulfato de amônio  
 2 - " " 0,22% " " " "  
 3 - " " 0,44% " " " "

○ - Detecção de traços do poliálcool.

Fig. 4 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação por S. rouxii, em meios - contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio.

Frente do solvente

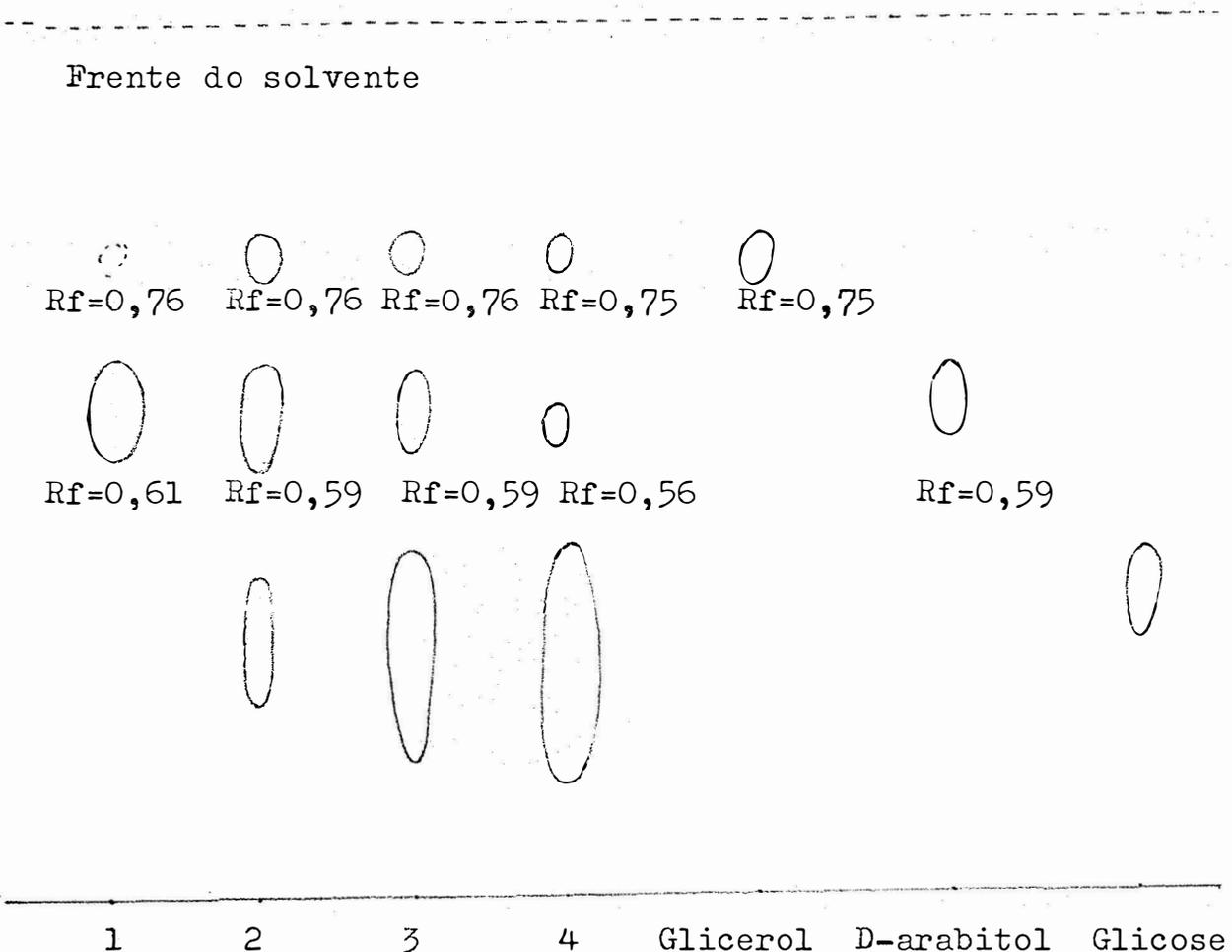


1                    2                    3                    Glicerol   D-arabitol   Glicose

1 - Meio contendo 0,182% de fosfato de amônio monobásico  
 2 - "                    "                    0,364% "                    "                    "                    "  
 3 - "                    "                    0,728% "                    "                    "                    "

○ - Detecção de traços do poliálcool.

Fig. 5 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 72 h de fermentação, por S. rouxii, em meios contendo diferentes concentrações de fosfato de amônio monobásico.

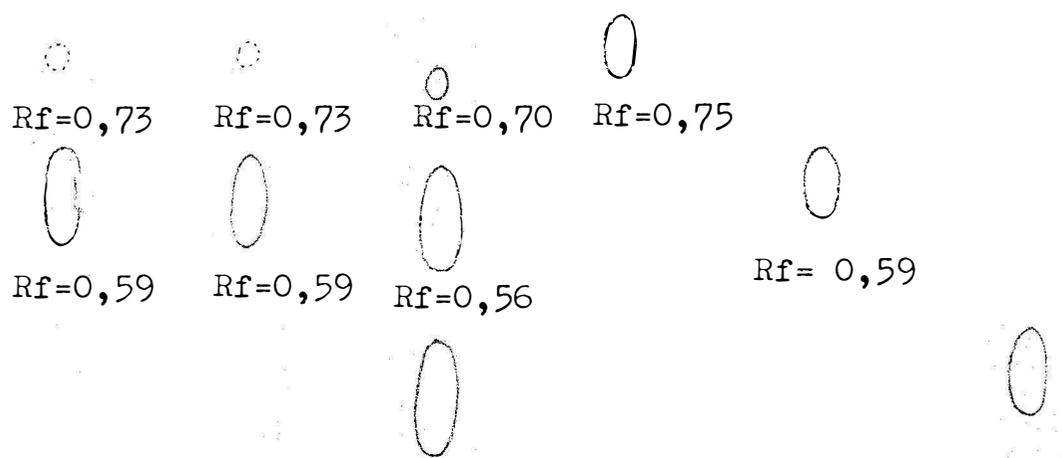


- 1 - Meio sem NaCl
- 2 - Meio contendo 5% de NaCl
- 3 - " " 10% de NaCl
- 4 - " " 15% de NaCl

○ - Detecção de traços do poliálcool

Fig. 6 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação, por S. rouxii, em meio sem NaCl e em meios contendo diferentes concentrações de NaCl.

Frente do solvente



1            2            3            Glicerol    D-arabitol    Glicose

1 - Meio contendo 10% de glicose

2 - Meio            "            20%    "            "

3 - "                "            30%    "            "

○ - Detecção de traços do poliálcool.

Fig. 7 - Esquema da cromatografia dos poliálcoois produzidos após 96 h de fermentação, por S. rouxii, em meios contendo diferentes concentrações de glicose.

## 5 - CONCLUSÕES

a - As vinte e oito leveduras osmofílicas isoladas de amostras de melaço e melado, foram classificadas em: Saccharomyces rouxii Boutroux, Saccharomyces bisporus (Naganishi) Lodder et Kreger van Rij var. bisporus, Saccharomyces bailii Lindner var. bailii, Saccharomyces bailii Lindner var. osmophilus van der Walt, Saccharomyces uvarum Beijerinck, Saccharomyces chevalieri Guilliermond e Saccharomyces rosei (Guilliermond) Lodder et Kreger van Rij.

b - Todas as leveduras classificadas como S. rouxii e S. bailii var. osmophilus, apresentaram crescimento em meio contendo 60% de glicose, enquanto que as demais não apresentaram crescimento à concentração mais elevada que 50% de glicose.

c - O comportamento em relação ao consumo de glicose e produção de poliálcoois, das leveduras classificadas neste trabalho, foi variável não somente entre as diferentes espécies, como também entre linhagens de mesma espécie.

d - As melhores produções de poliálcoois foram observadas entre as linhagens de S. rouxii.

e - A linhagem 16 de S. rouxii foi aquela que produziu maior teor de poliálcool, e a que apresentou me-

lhores perspectivas para aumento de produção em função das condições de cultura.

f - O rendimento em poliálcoois, em função do açúcar consumido, foi decrescente com o aumento da concentração de extrato de levedura de 0,25% a 1,0% no meio de cultura, enquanto seu desenvolvimento celular foi crescente. O consumo de glicose mostrou-se dependente da concentração de extrato de levedura no meio.

g - A adição de uréia ao meio de cultura não alterou grandemente os rendimentos em poliálcoois apresentados por S. rouxii, porém, sua presença abreviou o tempo de fermentação.

h - O aumento da concentração de 10% de glicose no meio de cultura, para 20 e 30% resultou em um decréscimo no rendimento em poliálcool, por S. rouxii.

i - Tartarato de amônio pode substituir uréia no meio de cultura, sem prejuízo dos rendimentos em poliálcool por S. rouxii.

j - A substituição de uréia por sulfato de amônio no meio, resultou, geralmente, em maiores rendimentos em poliálcool e menores consumos de glicose, por S. rouxii.

k - A substituição de uréia por fosfato de amônio monobásico, no meio de cultura, resultou em uma fraca fermentação por S. rouxii, que praticamente se interrompeu a-

pós 24 horas, apresentando mais elevado rendimento e reduzido consumo de glicose.

l - A adição de cloreto de sódio ao meio de cultura, determinou uma elevação do rendimento em poliálcool, por S. rouxii, enquanto este microrganismo não se adaptou completamente ao meio. Neste caso, o consumo de açúcar e a produção celular foram tanto menores quanto maior a concentração desse sal.

m - A linhagem de S. rouxii apresentou maior capacidade de conversão de glicose a poliálcool sempre que a composição do meio de cultura dificultou o seu desenvolvimento.

n - O aumento da aeração do meio de cultura, dentro dos limites estudados, resultou em maiores rendimentos em poliálcoois e menores consumos de glicose, por S. rouxii.

o - A produção de poliálcool por S. rouxii, na maioria dos meios utilizados neste trabalho, restringiu-se praticamente a D-arabitol. Nos meios contendo cloreto de sódio ou tartarato de amônio, o microrganismo produziu D-arabitol e apresentou ponderável aumento na produção de glicérol.

p - A linhagem de S. rouxii, utilizada neste trabalho, apresentou um rendimento em poliálcool de 30 a 32%, sobre a glicose consumida, quando desenvolvida por 72 horas, a 30°C, em meio contendo 10% de glicose, 0,75% de extrato de

levedura, 0,05% de uréia ou 0,306% de tartarato de amônio ,  
em agitador rotatório, com 2,5 cm de excentricidade, desen-  
volvendo 240 r.p.m.

6 - RESUMO

Vinte e oito leveduras osmofílicas, representando sete espécies do gênero Saccharomyces, isoladas de melaço e melado de cana-de-açúcar, foram selecionadas quanto a sua capacidade de produção de poliálcoois. Neste estudo preliminar verificou-se que a produção de poliálcoois é função não somente das diferentes características individuais das espécies de levedura como também de suas linhagens.

Diferentes condições de aeração, concentrações de extrato de levedura, de uréia e de outras fontes de nitrogênio, assim como concentrações de glicose e cloreto de sódio nos meios de cultura, foram estudadas em relação a produção de poliálcoois por uma linhagem selecionada de S. rouxii.

Uma correlação entre a capacidade de conversão de glicose a poliálcoois pelo microrganismo e o seu desenvolvimento celular em função da composição do meio foi evidenciada neste trabalho.

Nas fermentações realizadas, a produção de poliálcoois restringiu-se, praticamente, a D-arabitol porém, a presença de cloreto de sódio ou de tartarato de amônio no meio induziu uma ponderável formação de glicerol.

Em um meio contendo 10,0% de glicose, 0,75% de ex-

trato de levedura e 0,05% de uréia ou 0,306% de tartarato de amônio, a linhagem de S. rouxii utilizada neste trabalho, apresentou um rendimento em poliálcoois de 30-32% sobre o açúcar consumido em 72 horas de fermentação.

## 7 - SUMMARY

Twenty eight osmophilic yeasts of the genus Saccharomyces representing seven species isolated from sugar cane molasses and concentrated sugar cane juice - melado - a regional food product, have been screened for production of polyhydric alcohols. Polyhydric alcohols production showed in the screening test to be a function not only of the different individual characteristics of the yeasts species but also of their strains.

Aeration, concentrations of yeast extract, urea, and other nitrogen sources in addition to glucose and sodium chloride concentrations in the media were studied in relation to polyhydric alcohol production by a selected strain of S. rouxii.

A correlation between the ability to convert glucose to polyhydric alcohols and the cell production as a function of media composition, was found.

D-arabitol showed to be the main product of the fermentations run in this work, however the presence of sodium chloride or ammonium tartrate in the media induced larger glycerol formation.

Medium containing 10% of glucose, 0.75% of yeast

extract and 0.05% of urea or 0.306% of ammonium tartrate was found to be the best substrate for polyol production under the conditions of this work. In this medium the selected strain of S. rouxii showed a polyol yield of 30-32% based on sugar consumed after 72 h of fermentation.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- BAILEY, J.L. 1967. Determination of nitrogen. In BAILEY, J.L., Techniques in protein chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Amsterdam, Elsevier, 1967, p. 346-7.
- BINKLEY, W.E. & WOLFROM, W.L. 1950. Chromatographic fractionation of cane blackstrap molasses and of its fermentation residue. J. Am. Chem. Soc. 72: 4778-82.
- CONNSTEIN, W. & LUDECKE, K. 1919. Uber Glycerin-Gewinnung durch Gärung. Ber. deut. chem. Ges., 52: 1385-91. Apud Appl. Microbiol. 5: 211, 1957.
- FALANGHE, H. & CARUSO, J.G.B. 1972. D-arabitol production by Endomycopsis burtonii in sugarcane juice media. Can. J. Microbiol. 18: 1099-1102.
- GRAHAM, J.C.J. 1961. Fermentation process for the production of d-arabitol. British Pat. 870, 622.
- HAJNY, G.J., HENDERSHOT, W.F. & PETERSON, W.H. 1960. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. Appl. Microbiol. 8: 5-11.
- HAJNY, G.J. 1964. D-arabitol production by Endomycopsis

chodati. Appl. Microbiol. 12: 87-92.

HOUGH, L. 1950. Application of paper partition chromatography to the separation of the polyhidric alcohols. Nature, Lond. 165: 400.

LAMBERT, M. & NEISH, A.C. 1950. Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. Can. J. res. 28B: 83-9.

LODDER, J. 1970. The yeasts. A taxonomic Study. 1<sup>a</sup> ed. Amsterdam, North-Holland Pub.

NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. biol. Chem. 153: 375-80.

NEUBERG, G.C. & REINFURTH, E. 1918. Naturliche und erzwungene Glycerin-bildung bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Z., 92: 234-66. Apud Appl. Microbiol. 5: 211, 1957.

NEUBERG, G.C. & REINFURTH, E. 1919. Weitere Untersuchungen über die korrelative Bildung von Acetaldehyd und Glycerin bei der Zuckerspaltung und neue Beiträge zur theorie der alkoholischen Gärung. Ber. deut. chem. Ges., 52: 1677-1703. Apud Appl. Microbiol. 5: 211, 1957.

NICKERSON, W.J. & CARROL, W.R. 1945. On the metabolism of

Zigosaccharomyces. Archs Biochem. 7: 257-71.

ONISHI, H. 1959. Studies on osmophilic yeast. Part VI. Glycerol production by the salt-tolerant yeast in the medium with high concentrations of sodium chloride. Bull. agric. Chem. Soc. Japan, 23(5): 359-63.

ONISHI, H. 1960a. Studies on osmophilic yeast. Part VII. Production polyalcohols by Saccharomyces rouxii in the concentrated media of sodium chloride and sugars, and identification of polyalcohols produced. Bull. agric. Chem. Soc. Japan, 24: 126-30.

ONISHI, H. 1960b. Studies on osmophilic yeast. Part VIII. Polyalcohol production by various genera and species of yeasts. Bull. agric. Chem. Soc. Japan, 24: 131-40.

ONISHI, H. 1963. Studies on osmophilic yeasts. Part XV. The effects of high concentrations of sodium chloride on polyalcohols production. Agr. biol. Chem. 27: 543-7.

ONISHI, H., SAITO, N. & KOSHIYAMA, I. 1961. Studies on osmophilic yeasts. Part XI. Various factors affecting on polyalcohol production by Pichia miso. Agr. biol. Chem. 25: 124-30.

PASTEUR, M.L. 1858. Production constante de glycérine -

- dans la fermentation alcoolique. C. r. Acad. Sci. Paris, 46: 857.
- PASTEUR, M.L. 1859. Mémoire sur la fermentation alcoolique. C. r. Acad. Sci. Paris, 48: 1149-52.
- PETERSON, W.H., HENDERSHOT, W.F. & HAJNY, G.J. 1958. Factors affecting production of glycerol and d-arabitol by representative yeasts of the genus Zygosaccharomyces. - Appl. Microbiol. 6: 349-57,
- SOMOGYI, M. 1930. A method for the preparation of blood filtrates for the determination of sugar. J. biol. Chem. 86(2): 655-63.
- SOMOGYI, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. biol. Chem. 160: 61-8.
- SPENCER, J.F.T. & SALLANS, H.R. 1956. Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. Can. J. Microbiol. 2: 72-9.
- SPENCER, J.F.T. & SHU, P. 1957. Polyhydric alcohol production by osmophilic yeasts: effect of oxygen tension and inorganic phosphate concentration. Can. J. Microbiol. 3:559-67.
- SPENCER, J.F.T., ROXBURG, J.M. & SALLANS, H.R. 1957. Factors influencing the production of polyhydric alcohols by

osmophilic yeasts. J. agr. Fd. Chem. 5: 64-7. Apud  
Adv. appl. Microbiol. 7: 240, 1965.

TREVELYAN, W.E., PROCTER, D.P. & HARRISON, J.S. 1950. De-  
tection of sugars on paper chromatograms. Nature, Lond.  
166: 444-5.

TREVELYAN, W.E. 1961. Production of d-arabitol by fer-  
mentation. British Pat. 884, 822.

WRIGHT, R.E., HENDERSHOT, W.F. & PETERSON, W.H. 1957. Pro-  
duction and testing of yeast mutants for glycerol forma-  
tion. Appl. Microbiol. 5: 272-9.