

**JORGE HORII**

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Departamento de Tecnologia Rural

E. S. A. "Luiz de Queiroz"

U. S. P.

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO METABOLISMO DA  
GLICOSE EM *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen.**

Orientador: Prof. OCTAVIO VALSECHI

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**

*A*

*meus*

*pais e*

*esposa,*

*dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Octávio Valsechi, por ter proposto este trabalho e pela segura orientação recebida.

Ao Prof. Metry Bacila, pelos ensinamentos, sugestões e críticas recebidas no decorrer do trabalho, e pela marcada influência na minha formação científica.

Ao Prof. Otto J. Crocorno, pelas sugestões e críticas durante o andamento deste trabalho.

Ao Prof. Roland Vencovsky, pela orientação recebida na execução da análise estatística.

À Dra. Eva Wilson, pela colaboração na obtenção de materiais necessários à condução desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio material concedido, sem o qual não teria sido possível a realização do presente trabalho.

A todos quanto, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa.

### ABREVIATURAS

NAD	=	Nicotinamida adenina dinucleotídio
NADH	=	Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzido
ADP	=	5'-difosfato de adenosina
ATP	=	5'-trifosfato de adenosina
R.Q.	=	Quociente respiratório
$Q_{O_2}$	=	Quociente de absorção de oxigênio
$Q_{CO_2}$	=	Quociente de liberação de $CO_2$
$Q_{CO_2}^{N_2}$	=	Quociente de liberação de $CO_2$ com nitrogênio como fase gasosa
G.L.	=	Graus de liberdade
C.V.	=	Coefficiente de variação

C O N T E Ú D O

PÁGINA

1.	INTRODUÇÃO. . . . .	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA . . . . .	3
3.	MATERIAL E MÉTODOS. . . . .	21
3.1	Microorganismo . . . . .	21
3.2	Meio de cultura. . . . .	21
3.3	Condições de cultivo celular . . . . .	21
3.4	Padronização da suspensão de células . . . . .	22
3.5	Determinação da viabilidade celular. . . . .	22
3.6	Determinação do ritmo de crescimento celular	23
3.7	Determinações manométricas . . . . .	23
3.8	Determinações analíticas . . . . .	24
3.9	Drogas e reagentes . . . . .	24
3.10	Análise estatística. . . . .	24
4.	RESULTADOS. . . . .	26
4.1	Condições de cultivo de <u>Saccharomyces carls-</u> <u>bergensis</u> . . . . .	26
4.1.1	Relação entre a viabilidade celular e o tempo de cultivo. . . . .	26
4.1.2	Ritmo de crescimento celular. . . . .	26
4.1.3	Consumo de glicose durante o <u>cresci-</u> <u>mento</u> celular e produção de etanol. . . . .	29

4.2	<i>Dissimilação aeróbica da glicose . . . . .</i>	30
4.2.1	<i>Produção de ácido láctico durante a dissimilação aeróbica da glicose. .</i>	36
4.3	<i>Balanço de carbono na dissimilação aeróbica da glicose . . . . .</i>	37
4.4	<i>Dissimilação fermentativa da glicose . . . .</i>	43
4.4.1	<i>Produção de ácido láctico durante a dissimilação anaeróbica da glicose.</i>	49
4.5	<i>Balanço de carbono na dissimilação anaeróbi ca da glicose. . . . .</i>	50
5.	<i>DISCUSSÃO DOS RESULTADOS. . . . .</i>	56
6.	<i>CONCLUSÕES. . . . .</i>	67
7.	<i>SUMÁRIO . . . . .</i>	69
8.	<i>SUMMARY . . . . .</i>	70
9.	<i>LITERATURA CITADA . . . . .</i>	71
	<i>APÊNDICE. . . . .</i>	78

## 1. INTRODUÇÃO

Desde as investigações de Pasteur e Buchner, as leveduras têm sido o material biológico mais utilizado para pesquisas, quer seja da fisiologia da célula intacta, quer seja do comportamento de seus diferentes sistemas enzimáticos.

Através desses estudos, muitos fenômenos bioquímicos e biológicos foram grandemente elucidados.

Do ponto de vista econômico, as transformações de certos subprodutos em produtos de importância, realizadas à custa de microorganismos, tanto em fermentações como por oxidações parciais com o crescimento das culturas, têm trazido importantes subsídios ao desenvolvimento das fermentações industriais, responsáveis por produtos capitais à medicina, às indústrias alimentícias e aos complementos nutritivos.

Particularmente para a região de Piracicaba onde as atividades agro-industriais ligadas ao cultivo da cana-de-açúcar são essenciais à economia local, o estudo dos microorganismos implicados na fermentação alcoólica reveste-se de fundamental importância como base dessas explorações.

Pensava-se, a princípio, que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* predominasse de maneira quase absoluta na totalidade das fermentações naturais ocorridas na região e que de suas propriedades oxidativas e fermentativas dependia praticamente, todo andamento da fermentação.

A literatura concernente à flora natural de cana-de-açúcar, caldo de cana fresco e em fermentação é ainda bastante reduzida, principalmente em nosso meio.

Em trabalho conduzido por SHEHATA (1960) e citações em VALSECHI (1960) e CAMARGO (1966), foi encontrado um levantamento das leveduras ocorrentes no caldo de cana fresco e no mosto em fermentação de algumas destilarias da região.

Em caldo de cana fresco, 26 espécies foram identificadas, porém, somente 8 mostraram-se predominantes, a saber: *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranefaciens*, *Candida krusei*, *Torulopsis stellata*, *Candida guilliermondii*, *Pichia fermentans* e *Candida intermedia*.

No mosto em fermentação, apenas 3 espécies mostraram-se predominantes: *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, sendo esta última, coletada

apenas na parte alta dos fermentadores. Segundo SHEHATA, a predominância dessas 3 espécies no mosto em fermentação poderia ser comparativamente atribuída ao alto poder fermentativo dessas leveduras, à requisitos nutricionais ou à sua tolerância a altas temperaturas. Os dados obtidos por NEDER (1957) em seu estudo sobre leveduras regionais e seu valor industrial confirmam esses resultados.

Percorrendo a literatura verifica-se que consideráveis problemas ainda envolvem o conhecimento dos padrões metabólicos apresentados por *S. carlsbergensis*.

A levedura utilizada no presente trabalho de tese, um "strain" isolado de dornas de fermentação, onde ocorre predominando frequentemente sobre outras espécies, segundo VALSECHI (1960), SHEHATA (1960) e CAMARGO (1966), não tinha sido ainda estudada de modo suficiente quanto à sua atividade metabólica, quer sob condições de respiração quanto de fermentação anaeróbica. Pelo seu interesse prático, visto a larga utilização dessa levedura pelas indústrias alcooleiras e aguardenteiras, e também pelo caráter científico, como subsídio ao conhecimento de algumas propriedades fisiológicas de *S. carlsbergensis*, foi presentemente estudado alguns parâmetros de sua atividade metabólica.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Grande número de microorganismos obtêm a energia necessária para seus processos metabólicos em reações de degradação in completa de compostos orgânicos. Essas reações ou "fermentações" se dão usualmente em meio anaeróbico e os compostos orgânicos a tuam como doadores ou aceptores de hidrogênio em uma sequência ordenada de reações enzimáticas. A principal peculiaridade fi siológica das leveduras está na sua capacidade de efetuar fermentação alcoólica de açúcares na ausência de ar. Em sua presença, como acontece com outros organismos, podem oxidar os açúcares por "respiração". Nas oxidações aeróbicas completas de sub tratos orgânicos, atuam sistemas multienzimáticos que catalisam a oxidação dessas substâncias, o transporte de elétrons e a ativa ção de oxigênio, até a formação de água e dióxido de carbono.

O consumo de oxigênio ou produção de etanol e  $CO_2$  ocor rido na ausência de qualquer substrato constitui um processo a que se denomina de respiração ou fermentação endógena, respecti vamente, e que na levedura corresponde a um consumo de carboidratos de reserva da célula cujo conteúdo decai naturalmente duran te a operação.

Tal utilização dos carboidratos de reserva pelas leve duras, tem sido objeto de inúmeros trabalhos, por vezes conflitan tes, deixando em aberto ainda muitos aspectos da questão.

Por muito tempo pensou-se que o substrato endógeno fos se consumido apenas aerobicamente.

MEYERHOF (1925) estudando o efeito do oxigênio na fer mentação alcoólica, com leveduras prensadas, observou que nos frascos sem nutrientes usados como controle, o quociente respira tório era constantemente menor ou próximo da unidade, indicando haver assim pouca ou nenhuma fermentação aeróbica em ausência de substrato externo.

STIER e STANNARD (1936a) estudando a taxa respiratória de dois "strains" de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas aerobicamente revelou que, em meio sem nutriente, houve um período de constante consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono (R.Q.=1), característica de células com amplo material de reser va. Esse quociente respiratório, praticamente igual à unidade, manteve-se durante a maior parte do ensaio, declinando quando a taxa de respiração decresceu a aproximadamente 1/4 de seu valor

inicial, tornando-se então proporcional à concentração do substrato, possivelmente glicogênio. Essas fases da respiração endógena mostraram-se dependentes da idade da cultura e da quantidade disponível de substrato.

STIER e STANNARD (1936b) relataram ainda que nas leveduras estudadas, a liberação anaeróbica de  $\text{CO}_2$  foi em níveis negligenciáveis e que o catabolismo das reservas de carboidratos se deu por processo puramente respiratório.

WINZLER e BAUMBERGER (1938) pesquisando a quantidade de energia calorífica produzida durante o metabolismo de células de levedura, concluiu que em ausência de substrato, sob condições anaeróbicas, suspensões de células produziam muito pouco ou nenhuma quantidade de calor.

SPIEGELMAN e NOZAWA (1945), procurando dados que permitissem maior generalização dos fenômenos até então estudados, utilizaram-se também de outras leveduras. Conduziram seus ensaios com dois "strains" de *S. cerevisiae*, um de *S. carlsbergensis*, um de *Schizosaccharomyces pombe*, um de *Schizosaccharomyces octosporus* e um de *Saccharomyces ludwigii*. As culturas ensaiadas foram sempre desenvolvidas por 48 horas e em todos os casos as medidas efetuadas foram somente da primeira hora, antes da taxa respiratória iniciar a cair. Os dados desses ensaios revelaram que o metabolismo endógeno de todas as leveduras estudadas era de natureza puramente aeróbica; nenhuma delas possuía habilidade para fermentar quantidades apreciáveis de sua reserva interna de carboidratos, embora possuíssem ativo sistema fermentativo de glicose.

STICKLAND (1956), estudando a respiração endógena e os polissacarídeos de reserva, em leveduras prensadas de panificação, observou que quando estas respiravam sem adição de substrato, seu quociente respiratório era de 0,85. Concluiu também, que o substrato para respiração em ausência de material oxidável externo não deveria ser constituída de carboidratos, não havendo portanto fermentação, corroborando assim dados de pesquisadores precedentes.

BRADY et al (1956) encontraram que somente o estabelecimento de condições anaeróbicas, sem adição de agentes como azida, 2:4-dinitrofenol ou arsenito, já conduzia a uma pequena mas ainda definida queda nas reservas de carboidratos. Álcool e dióxido

xido de carbono eram produzidos mas em quantidades inferiores às esperadas, em relação à quantidade de carboidrato de reserva desaparecido.

CHESTER (1959a) utilizando-se de um "strain" de *S. cerevisiae* encontrou que as reservas de carboidratos foram degradadas por processo fermentativo tanto sob condições aeróbicas como anaeróbicas. Como resultado dessa fermentação, o conteúdo total de carboidratos da levedura decresceu em pelo menos 50% nas 5 horas seguintes à coleta do meio de cultura. O decréscimo da fração de trealose e de glicogênio foi estimada como a perda total em carboidratos.

Em ensaios sob condições anaeróbicas, o decréscimo de carboidratos foi de 85 a 100% da quantidade calculada para liberação de dióxido de carbono. O etanol acumulado correspondeu a cerca de 70% da quantidade esperada de dióxido de carbono.

Sob condições aeróbicas, a fermentação endógena evidenciou-se por alto quociente respiratório inicial e produção de etanol. O etanol foi acumulado durante 2 horas, desaparecendo a seguir do sistema. O aparente coeficiente respiratório caiu rapidamente para valores em torno de 0,6 e após cerca de 3 horas e levou-se até um valor mais ou menos constante em torno de 1.

CHESTER (1959b) já observara que um "strain" de *S. cerevisiae* utilizava o carboidrato de reserva por um mecanismo fermentativo. Procurando investigar o efeito do oxigênio na fermentação endógena com essa levedura, encontrou dificuldades em função da oxidação de etanol e liberação de dióxido de carbono da respiração. Utilizou-se então de um mutante deficiente respiratório provido de um sistema, no qual a respiração residual não interferia em quantidades significativas. Experimentos com um desses mutantes mostraram que o oxigênio estimulou a fermentação endógena.

O mutante deficiente respiratório foi obtido pelo cultivo da levedura em meio contendo 0,006% de sulfato de cobre. A levedura deficiente respiratória foi cultivada do mesmo modo que as células normais, em frascos sem agitação, a 25°C e coletadas na fase estacionária de cultivo quando a concentração de glicose caiu para cerca de 1%. As condições de cultivo foram substancialmente anaeróbicas.

O desaparecimento de carboidratos, a produção de etanol e de dióxido de carbono sob condições aeróbicas e anaeróbi-

cas foi comparado em frascos manométricos de Warburg a 28°C. Houve maior degradação de carboidrato sob condições aeróbicas mas essa degradação foi acompanhada pela produção de maior quantidade de etanol e dióxido de carbono.

Quando foi usado somente oxigênio como fase gasosa dos frascos manométricos, em lugar de ar atmosférico, a taxa de degradação foi aumentada e mais dióxido de carbono foi liberado. A taxa de oxigênio consumido foi também maior do que com ar. Nesse ensaio, em particular, a degradação de carboidrato por frasco durante a primeira hora foi 0,42 mg, sob atmosfera de nitrogênio, 0,59 mg sob ar atmosférico e 0,67 mg sob atmosfera de 100% de oxigênio. Tais resultados indicam que para o "strain" de levedura utilizado no experimento, a fermentação endógena foi estimulada pela presença de oxigênio e o estímulo foi maior com o aumento da tensão de oxigênio. O nível de consumo de oxigênio elevou-se com o aumento da tensão de oxigênio mas ainda assim esse nível permaneceu baixo.

EATON (1960) estudou fermentação endógena em *S. cerevisiae*, relatando que o substrato endógeno era constituído de três grupos metabólicos distintos. Dois grupos seriam de glicogênio, sendo que um requeria presença de oxigênio para sua utilização enquanto outro era metabolizado aeróbica e anaerobicamente. O terceiro era a trealose utilizada só anaerobicamente. Ainda segundo EATON, os lipídios não tiveram nenhuma ação como substrato para respiração endógena, como se poderia supor a partir dos resultados encontrados por STICKLAND (1956).

CHESTER (1963) trabalhando com um "strain" de *S. cerevisiae* observou o efeito das condições de aerobiose e anaerobiose, durante o desenvolvimento da cultura, no armazenamento de carboidrato de reserva. Os carboidratos de reserva, glicogênio e trealose, foram responsáveis por cerca de 40% do peso seco das leveduras cultivadas anaerobicamente durante 48 horas. A concentração de glicose residual no meio de cultura foi menor que 0,5%. A análise da cultura após 72 horas mostrou que o carboidrato de reserva foi utilizado depois que toda a glicose do meio havia sido fermentada.

Quando a levedura foi cultivada aerobicamente, a glicose no meio de cultura foi utilizada a taxas menores e após 48 horas, a concentração da glicose residual foi de 2,3%. Essa baixa utilização de glicose indica que a levedura mostrou efeito Pas

teur normal. Toda a glicose tinha sido utilizada quando as células foram coletadas a 72 horas e menos de 10% de seu peso seco pôde ser apontado como devido a carboidratos de reserva. A quantidade de trealose nessa cultura foi extremamente pequena.

O etanol formado sob condições anaeróbicas pelas leveduras foi 80-100% da quantidade calculada segundo a equação de Gay-Lussac. O dióxido de carbono liberado sob condições anaeróbicas correspondeu totalmente com a quantidade calculada.

Sob condições aeróbicas, muito mais carboidrato desapareceu durante o período experimental. O etanol liberado durante os 15 minutos iniciais foi o esperado pela equação de Gay-Lussac, porém, à hora seguinte foi somente 20% do esperado em relação ao carboidrato desaparecido.

PANEK (1962) estudou a síntese de trealose em células de *S. cerevisiae*, relatando que a formação de trealose ocorre na fase de adaptação quando a fonte de carbono externa é exaurida e antes das células iniciarem crescimento com etanol como substrato. Foi verificado também, que a trealose formada tendia a ser rapidamente utilizada quando a segunda fase exponencial era iniciada. Esses fatos dão consistência aos resultados observados por CHESTER (1963).

A possibilidade de inibição da síntese de trealose pela glicose é excluída desde que em células em repouso é grande a capacidade de síntese desse dissacarídeo a partir de glicose externa, ocorrendo a condição ótima para a síntese de trealose justamente em condições de não proliferação ou de repouso das células.

PANEK (1963) relatou que trealose e glicogênio, carboidratos de reserva de *S. cerevisiae* são formados em células não proliferantes na proporção de 5:1. Durante a exaustão, sob condições aeróbicas, a trealose não foi utilizada pelas células e, pelo contrário, durante a fase de "lag" inicial de uma curva de crescimento essa reserva foi rapidamente mobilizada e consumida em cerca de 90%. Sua degradação conduz grandemente à formação de CO<sub>2</sub> e a energia liberada é usada possivelmente para divisão celular.

OPERTI e PANEK (1968), estudando o metabolismo de trealose em leveduras, constatou que *S. carlsbergensis* sintetiza trealose durante a primeira fase exponencial de crescimento, de

gradando-a levemente antes da fase estacionária e tornando a a-cumulá-la na segunda fase exponencial. Em ensaio experimental, os resultados mostraram degradação de 64,5% da trealose a cumulada durante a primeira hora de crescimento, em *S. carlsbergensis*, ao passo que em *S. cerevisiae*, esse total correspondeu a 95%. Por outro lado, ambos os tipos de leveduras não metabolizaram suas reservas de trealose durante um período de mais de 6 horas de exaustão. O conteúdo de trealose, após esse período, permaneceu praticamente constante. Assim, algumas diversidades de comportamento entre essas duas espécies de levedura bem podem corresponder a certas diferenças essenciais em seu metabolismo.

Durante a utilização de um substrato, a célula incorpora certa quantidade da mesma, sem que haja consumo de oxigênio ou liberação de CO<sub>2</sub>, conforme sejam as condições ambientais.

Quando um microorganismo está em crescimento, parte da fonte de carbono é utilizada para a síntese de material celular. Em condições em que a reprodução celular é impossível, a assimilação também se verifica pelo menos durante um certo período.

LUNDIN (1923) verificou que células de levedura colocadas em meio contendo glicose, não aumentaram em número mas somente em tamanho. Não foi notada síntese de proteína ou de lipídeo, e aldeídos e ácidos orgânicos foram muito pouco produzidos. O CO<sub>2</sub> formado correspondeu a cerca de 33% do carbono do açúcar utilizado e a quantidade de etanol foi menor que a encontrada em fermentações típicas. A máxima quantidade foi encontrada imediatamente após o desaparecimento da glicose, diminuído em seguida.

MEYERHOF (1925), em seu estudo sobre o efeito do oxigênio na fermentação alcoólica, observou que, com leveduras prensadas, cerca de 50% do açúcar que tinha desaparecido do meio sob condições aeróbicas não foram estimados pela soma da fermentação aeróbica e da oxidação do substrato, sob condições anaeróbicas, essa discrepância foi de cerca de 25%.

MEYERHOF e SCHULZ (1936) determinaram o CO<sub>2</sub> produzido pela completa fermentação da glicose, por uma suspensão de leveduras em tampão fosfato e verificaram que o CO<sub>2</sub> produzido corrrespondia a 75-80% do valor teórico esperado. Os dados analíticos mostraram que o conteúdo de carbono total das células aument

ta em quantidade equivalente à assimilação de 18% do açúcar adicionado e que uma quantidade de álcool equivalente ao  $\text{CO}_2$  era produzida.

WINZLER e BAUMBERGER (1938) mostraram que o calor produzido durante a fermentação da glicose, por um "strain" de levedura de panificação, foi 63,2% do valor teórico embora todo substrato houvesse desaparecido, e que uma grande porcentagem de glicose que desaparece do sistema na presença de oxigênio é utilizada para síntese de carboidrato intracelular. A concentração crítica de glicose foi considerada como sendo  $2,25 \times 10^{-3}$  M, acima da qual a produção de calor foi independente da concentração do substrato. Abaixo desse valor a taxa foi diretamente proporcional à concentração de glicose. A partir do calor de formação e dos produtos principais medidos em respiração de substrato externo, foi encontrado que 26,5% da glicose desaparecida do meio foi oxidada e 73,5% armazenada. Similarmente, 58,7% do acetato-desaparecido foi oxidado e 41,3% assimilado. Em fermentação alcohólica, 70,5% da glicose foi fermentada e 29,5% assimilada.

Resultados semelhantes foram obtidos por VAN NIEL e ANDERSON (1941) estudando a fermentação de diversos açúcares, entre os quais, glicose, fructose, mannose, sacarose e maltose, que conduziram à produção de quantidades equimolares de  $\text{CO}_2$  e etanol, os quais juntos somavam somente cerca de 70% do carboidrato consumido. Essa discrepância foi considerada como sendo devido à assimilação fermentativa.

FALES e BAUMBERGER (1948) pesquisando a assimilação fermentativa da glicose por *S. cerevisiae*, assinalaram que durante a fermentação efetuada com "strain" comercial dessa levedura, 20% do açúcar adicionado foi assimilado e 70% foi convertido em  $\text{CO}_2$  e etanol. O restante foi transformado possivelmente em glicerol, ácido succínico, entre outros produtos.

Alguns ensaios foram efetuados com leveduras que tinham sido levadas à exaustão através de aeração do meio durante seis dias. Nessas condições, as células assimilaram a mesma proporção do açúcar adicionado, em relação às células com conteúdo normal de glicogênio, embora essa assimilação tivesse ocorrido mais rapidamente durante o processo. Grande quantidade de produtos intermediários foi acumulado durante as fases iniciais da fermentação. Foi assinalado, pela diferença entre o desaparecimento da glicose e a formação de produtos finais, que cerca de

40% do açúcar inicial surgia nas células como produtos intermediários.

Pesquisas conduzidas por SWANSON e CLIFTON (1948) mostraram que os estágios iniciais na utilização de glicose, de sacarose ou de maltose, por culturas em ativa proliferação de alguns "strains" de *S. cerevisiae*, cultivados aerobicamente, ocorria por processo de assimilação fermentativa. Pouco ou nenhum oxigênio foi utilizado durante os estágios iniciais e foi observada alguma indicação de que o oxigênio exercia uma ação inibitória. Células lavadas de culturas "jovens" não consumiram oxigênio com qualquer dos açúcares mencionados como substrato, mas fermentaram aerobicamente, enquanto células de culturas mais "velhas" utilizaram prontamente o oxigênio. A assimilação fermentativa predominou no sistema até que os açúcares desaparecessem do meio, quando então ocorreu uma assimilação oxidativa dos produtos intermediários da dissimilação, incluindo etanol, até praticamente todos terem sido utilizados, com exceção dos ácidos orgânicos.

Investigando a assimilação e a degradação de carboidratos pelas células de *S. cerevisiae*, FALES (1951) procurou descobrir a natureza dos produtos que chamara de intermediários dos primeiros estágios da fermentação, em estudo anterior (FALES e BAUMBERGER, 1948). Concluiu tratar-se de um carboidrato de reserva diferente de glicogênio e da trealose e que se formava transitoriamente no curso da fermentação. Segundo FALES, tratava-se de um carboidrato passível de ser oxidado ou fermentado endogenamente em razões proporcionais à sua concentração, sintetizadas e degradadas em taxas mais rápidas que os carboidratos solúveis em álcalis, como o glicogênio e a trealose, além de ser insolúvel em álcali como hidróxido de potássio a 30%.

SLONIMSKI (1949) fez um estudo comparativo da fisiologia de dois "strains" de *S. cerevisiae*, um diplóide e outro haplóide obtido a partir do primeiro, e dois "strains" mutantes, de mesma origem dos anteriores, um espontâneo e outro obtido pela ação da acriflavina.

Estudando a fermentação anaeróbica de glicose, pôde concluir, após séries de experiências, que a liberação de CO<sub>2</sub> era diretamente proporcional à quantidade de leveduras. A relação entre a idade da levedura e o poder fermentativo foi também estudada. As células com 24 e 48 horas de cultivo, isto é, em



pleno crescimento, utilizam a glicose praticamente com a mesma intensidade. Ensaio análogo foram realizados com diferentes concentrações de açúcar (0,2 a 4,0%) e com culturas mais velhas (48 a 72 horas) e os resultados obtidos foram os mesmos: ausência de diferença na fermentação anaeróbica dos "strains" comparados; diminuição do  $Q_{CO_2}^{N_2}$  com a idade das leveduras.

Em ensaios de respiração e fermentação aeróbica pôde concluir que a absorção de oxigênio é diretamente proporcional à quantidade de células. Grupos de experiências sobre respiração e fermentação aeróbica com culturas com 48 horas, em presença de glicose em solução a 4,0%, puzeram em evidência diferenças muito claras entre os "strains" normais e mutantes. As células normais apresentaram alta respiração endógena enquanto que nas mutantes ela foi quase nula. Em presença de açúcar, as células normais consumiram muito mais oxigênio que as mutantes. A fermentação aeróbica das células normais foi nitidamente inibida pelo oxigênio enquanto as mutantes não foram influenciadas de maneira perceptível. Essas mesmas diferenças foram encontradas em condições experimentais variadas, em concentrações diferentes de glicose e diferentes idades de cultivo.

LEMOIGNE et al (1954), estudando a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* sob condições aeróbicas e na presença de altas concentrações de glicose, encontraram uma fase de crescimento inicial rápida, envolvendo intensa fermentação, de cerca de 75% da glicose presente. A curva de crescimento apresentou duas fases distintas, num típico fenômeno de diauxia; o álcool formado acumulou-se no meio e após o desaparecimento da glicose foi assimilado pela levedura. Sendo a taxa de crescimento sobre glicose e sobre álcool, nitidamente diferentes, os dados vêm confirmar que o etanol é um produto lateral que se forma quando a glicólise é muito mais rápida que a síntese de material celular. Quando as leveduras foram colocadas em presença de baixas concentrações de glicose, a diauxia não ocorreu e o álcool não se acumulou. Dada a condição experimental adotada, de abundante oxigenação, concluiu-se que a aeração sozinha não pôde inibir completamente a formação de álcool, por leveduras de panificação em proliferação.

AUBERT e MILHAUD (1956), estudando o metabolismo de etanol em presença de glicose, efetuaram ensaios em aparelho convencional de Warburg, colocando 3 mg de leveduras em 2 ml de tampão fosfato 0,025 M, em presença de 5,2  $\mu$ M de glicose e de 5  $\mu$ M

de etanol  $1,2 - {}^{14}\text{C}$  ( $5 \mu\text{C}$ ). Após 25 minutos, as análises mostraram que houve consumo de  $3,6 \mu\text{M}$  de  $\text{O}_2$ ,  $3,7 \mu\text{M}$  de glicose, com formação de  $0,1 \mu\text{C}$  de  $\text{CO}_2$  radioativo, comprovando então o metabolismo de álcool em presença de glicose. Admitindo-se que  $2/3$  da glicose tenha sido transformada em álcool, pode-se ter idéia aproximada da quantidade de álcool metabolizada. Foram encontradas, ainda, incorporadas às células,  $0,12 \mu\text{C}$  de radioatividade donde se pôde concluir que cerca de  $0,2 \mu\text{M}$  de álcool foi metabolizado nesse tempo.

A capacidade de leveduras como *S. cerevisiae* e *S. carlsbergensis* oxidar glicose e acetato rapidamente, já havia sido relatada por NOVELLI e LIPMANN (1950).

EATON e KLEIN (1954), estudando a influência do estágio de desenvolvimento da cultura no momento da coleta, encontraram consideráveis diferenças na capacidade oxidativa de substratos como a glicose, o etanol e o acetato.

Células "jovens" de *S. cerevisiae*, coletadas durante os primeiros estágios da fase logarítmica de crescimento mostraram capacidade para oxidar glicose, comparável à células coletadas no fim da fase logarítmica ou na fase estacionária de crescimento. Todavia, essas células mostraram pequena capacidade de oxidação de etanol e de acetato. Ao contrário, células "velhas" mostraram possuir capacidade de oxidar etanol e acetato rapidamente, à mesma razão de consumo de glicose.

EATON e KLEIN (1957) pensaram, inicialmente, que a incapacidade de células "jovens" oxidarem acetato, etanol e piruvato poderia estar ligada à deficiência de citocromos e que a oxidação de glicose poderia se dar por intermédio do sistema flavina transportador. Entretanto, nenhuma diferença pôde ser encontrada no espectro dos citocromos de células "jovens" e "velhas".

Foi acompanhada oxidação de glicose com  ${}^{14}\text{C}$  nas posições 3 e 4 por células "jovens" e a quantidade total de glicose metabolizada aerobicamente pôde ser estimada desses dados. Trinta minutos após a adição do substrato, aproximadamente 85% do C-3 e C-4 da glicose foi liberado, todavia, durante esse tempo, somente pequena fração do oxigênio total foi consumido. Dada a rápida liberação inicial de C-3 e C-4 da glicose e o pequeno consumo de oxigênio durante os estágios iniciais, era de se esperar que alguma quantidade de etanol houvesse sido formado, mesmo em

condições aeróbicas. Realmente, grandes quantidades de álcool foram acumuladas no sistema, as quais desapareceram durante os últimos estágios da oxidação da glicose. Foi constatado que a quantidade de etanol formada era quase equivalente, em bases molares, à quantidade de  $\text{CO}_2$  formada a partir de C-3 e C-4 da glicose. Desses dados pôde-se calcular que cerca de 85% da glicose foi degradada com etanol como intermediário. Desde que 60-70% do carbono total da glicose puderam ser recuperados como  $\text{CO}_2$ , aparentemente, o etanol formado da glicose pode ser oxidado, mesmo considerando-se que células "jovens" não possuem capacidade para oxidar tal componente quando fornecido como único substrato.

Foi observado ainda, que para além da primeira hora, a maior porção do oxigênio consumido foi utilizado para oxidar etanol ao nível de acetato ou acetaldeído. Células "jovens" cultivadas em meio sintético liberaram cerca de 70% do carbono das posições 3 e 4 da glicose como  $\text{CO}_2$ . Entretanto, somente 44% da glicose adicionada pôde ser estimada como etanol. Em contraste, em células cultivadas em meio semi-sintético, a quantidade de  $\text{CO}_2$  de C-3 e C-4 da glicose foi essencialmente igual ao total de etanol produzido. Pode-se deduzir, então, que 26% da glicose foi degradada para algum componente  $\text{C}_2$  que não foi o etanol. Posteriormente oxidação desse componente  $\text{C}_2$  foi inibido pelo fluoroacetato, o que sugeriu participação do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Essa hipótese foi confirmada quando descobriu-se que glicose marcada foi oxidada e atividade específica do  $\text{CO}_2$  produzido de C-1, C-2, C-5 e C-6, foi comparável àqueles dos ácidos tricarbóxicos isolados das células. A oxidação do acetato acumulado é de natureza adaptativa; sua taxa aumenta durante a degradação de glicose.

KLEIN (1955), estudando síntese de lipídios em *S. cerevisiae* relatou que células cultivadas sob condições aeróbicas, contém quantidades consideravelmente mais altas de ácidos graxos e lipídios não saponificáveis do que células cultivadas anaerobicamente. A adição de acetato ao sistema não causou aumento na formação de lipídios, mas, glicose quando adicionada serviu para estimular a síntese de grande quantidade de lipídios, os quais se formaram quase que exclusivamente da fonte de carbono externa. É interessante notar-se, ainda, que quando se utilizou meio para cultivo contendo peptona 2%, glicose 2%, e extrato de levedura 1%, em condições aeróbicas, as células apresentaram conteúdo muito

menor de lipídios do que células cultivadas em meios mais simples ou sintéticos.

FALES (1960) fez um estudo comparativo do metabolismo aeróbico de células de leveduras de panificação, não proliferantes, com o uso de dois diferentes sistemas de aeração. Num dos sistemas o ar foi rapidamente borbuhlado através da suspensão e no outro, a aeração foi operada pela agitação de um respirômetro convencional de Warburg, com ar como fase gasosa. O padrão metabólico foi marcadamente diferente sob as duas condições experimentais.

Sob condições de alta tensão de oxigênio, a fermentação aeróbica foi fortemente inibida e o máximo acréscimo em carboidrato celular foi equivalente a 40% do açúcar adicionado e um acréscimo de cerca de 40% em comparação com a síntese observada no ensaio sob agitação do respirômetro de Warburg. Sob agitação do respirômetro de Warburg, houve intensa fermentação aeróbica e o incremento no conteúdo de ácidos graxos das células correspondeu a mais que 100% em relação ao observado no ensaio sob alta tensão de oxigênio. O consumo total de oxigênio estimado no ensaio sob alta tensão de oxigênio, foi equivalente à oxidação de cerca de 30% do açúcar adicionado, enquanto o equivalente a cerca de 43% do açúcar foi oxidado no ensaio sob agitação do respirômetro de Warburg. A taxa de consumo de glicose em ambas as instâncias foi consideravelmente menor que a observada sob condições anaeróbicas.

A medida operada em respirômetro de Warburg mostrou um período de 10 minutos de "lag" fase e nos 35 minutos subsequentes o RQ observado foi 2, indicando intensa fermentação aeróbica. Nos 25 minutos seguintes houve um período de transição - de 55 minutos onde o RQ caiu para 0,67, que é o RQ teórico para o catabolismo do etanol. O período transicional de catabolismo de glicose e álcool foi iniciado consideravelmente antes da concentração da glicose tornar-se limitante. Após o período de oxidação de álcool, o RQ entrou em nova fase de transição, aumentando até atingir o valor em torno de 1, após 3 horas. Esses dados confirmam plenamente aqueles obtidos por SLONIMSKI (1949).

Entretanto, a produção total de  $CO_2$  após a terceira hora superou em 13,7% em relação ao oxigênio consumido. Tal fato sugere que uma porção do álcool inicialmente formado não foi oxidado a  $CO_2$  e água, mas foi convertido em outros produtos. Os da

dos de produção de ácidos graxos são consistentes com a hipótese de considerável conversão de álcool a ácidos graxos durante a fase de oxidação de etanol. Esses fatos contribuem para confirmar os resultados de KLEIN (1955) e EATON e KLEIN (1957).

HABOUCHA e MASSCHELEIN (1960) estudaram um caso de deficiência respiratória em *S. carlsbergensis*. Foi constatado um tempo de geração "g" igual a 1 hora e 20 minutos para *S. cerevisiae* e 2 horas e 20 minutos para *S. carlsbergensis*. *S. carlsbergensis* apresentou fenômeno de diauxia durante o crescimento em meio contendo glicose na concentração de 8,25  $\mu$ moles por ml. No platô, após a primeira fase exponencial, toda a glicose havia sido consumida. Admitindo-se que 25% da glicose inicial tenha sido utilizada para síntese de polissacarídeos, o teórico esperado para formação de etanol seria 12,48  $\mu$ moles, caso o metabolismo de *S. carlsbergensis* ocorresse exclusivamente por glicólise fermentativa. O valor encontrado foi de 11,5  $\mu$ moles, confirmando essa hipótese.

Os ensaios para determinação do poder respiratório de glicose, etanol e acetato após crescimento aeróbico com glicose, revelaram fraco poder oxidativo quando comparado com *S. cerevisiae*, indicando que *S. carlsbergensis* utiliza a glicose, principalmente por fermentação. Com células colhidas na segunda fase exponencial, o poder respiratório foi bastante aumentado, aproximando-se aos valores encontrados para *S. cerevisiae*. Essa observação permite considerar que a deficiência respiratória deve ser de natureza adaptativa.

O estudo cinético da redução do citocromo c, bem como da oxidação do succinato no extrato livre de células, revelou que o local da deficiência deve estar ao nível da desidrogenase succínica. O funcionamento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos em *S. carlsbergensis* é considerado como sendo relacionado à atividade obtida pelas desidrogenases, succínica e isocítrica.

Estudos sobre as diferentes fases do crescimento celular e sua correlação com formação de mitocôndrias, enzimas respiratórias e repressão da respiração, foram efetuadas por SLONIMSKI (1956), EPHRUSSI et al (1956), YOTSUYANAGI (1962) entre outros.

POLAKIS et al (1964) pesquisaram o crescimento de *S. cerevisiae* em condições aeróbicas e anaeróbicas, em diferentes concentrações de glicose, a respiração nas diferentes condições e o respectivo conteúdo de enzimas. A estrutura das células foi

estudada por microscopia eletrônica.

As células da levedura converteram glicose, aerobicamente, em massa celular mais eficientemente à baixas concentrações. A respiração e a atividade do citocromo c-oxidase, NADH<sub>2</sub> oxidase, NADH<sub>2</sub>-citocromo c-oxido-reductase, desidrogenase succinica e desidrogenase isocítrica variaram inversamente com a concentração da glicose, na qual as células foram cultivadas as primeiras 12 horas. Após 12 horas de cultivo, as leveduras puderam oxidar glicose e etanol mas não acetato. Após 24 horas de cultivo, acetato foi oxidado pelas células a taxas que variaram inversamente com a concentração de glicose, originalmente presente no meio de cultivo. Após 36 horas de cultivo, a capacidade de oxidação de acetato foi perdida mas a respiração com glicose ou etanol foi mantida.

Nenhuma estrutura mitocondrial pôde ser vista em leveduras cultivadas anaerobicamente. Em células cultivadas aerobicamente em glicose ou cultivadas anaerobicamente mas que tinham desenvolvido respiração, surgiram estruturas vacuolares quando-essa respiração se desenvolveu.

Mitocôndrias surgiram nas leveduras quando o acetato pôde ser oxidado. O número de mitocôndrias diminuiu quando a capacidade de oxidar acetato foi perdida.

POLAKIS e BARTLEY (1965) estudaram a atividade das enzimas do ciclo do ácido cítrico, do ciclo do glioxilato e algumas outras enzimas com ação nos substratos desses ciclos, em células de *S. cerevisiae*, durante o cultivo aeróbico sob diferentes fontes de carbono e em diferentes meios de cultivo. Dos resultados obtidos, pôde-se concluir que os açúcares induziram um padrão anaeróbico de metabolismo, medido pela produção de etanol. Glicose foi mais efetiva que galactose na indução de padrão anaeróbico de metabolismo. Produção de etanol por células cultivadas em piruvato foi muito pequena. Glicose foi também mais efetivo repressor de enzimas do ciclo do ácido cítrico que a galactose embora fossem igualmente efetivas na repressão quase completa de enzimas do ciclo do glioxilato. O desaparecimento de açúcares do meio de cultivo resultou em aumento na atividade de enzimas do ciclo do ácido cítrico e aparecimento de substancial atividade das enzimas do ciclo do glioxilato.

POLAKIS et al. (1965) revelaram que *S. carlsbergensis* quando desenvolvido em baixa concentração de glicose 0,09% ou

galactose 0,9% , sintetizava enzimas respiratórias e possuía mitocondria funcional. Em contraste, células crescendo em presença de glicose 0,9% não continham mitocôndrias reconhecíveis e somente baixo nível de enzimas respiratórias foram detectadas.

Trabalho semelhante foi conduzido por GÖRTS (1967), estudando o metabolismo de carboidrato em *S. cerevisiae*. O autor verificou acentuada influência da concentração e da natureza do carboidrato no padrão metabólico. A presença de glicose no meio induziu a atividade catabólica por processo predominantemente glicolítico.

Células "jovens", em estado de não proliferação, cultivadas em meio contendo glicose a 2% e coletadas quando ainda havia glicose, mostraram, em ensaios respirométricos em aparelho convencional de Warburg, rápido consumo de glicose sob condições aeróbicas, produzindo CO<sub>2</sub> e etanol em iguais quantidades durante a primeira hora. Depois desse tempo, a produção de CO<sub>2</sub> decresceu levemente e a concentração de etanol diminuiu lentamente. Houve baixo consumo de oxigênio e parece que tal fato se deve, pelo menos parcialmente, à oxidação de etanol a acetato que foi acumulado vagarosamente no meio. Células de culturas mais velhas, nas quais glicose já houvera sido exaurida, mostraram padrão metabólico mais oxidativo. Durante os 30 minutos iniciais a razão de consumo de glicose foi de 60% em relação às células "jovens", enquanto o consumo de oxigênio foi 2,5 a 3 vezes maior. O CO<sub>2</sub> aeróbico foi maior que o etanol acumulado, o que sugere rápida oxidação de etanol ou oxidação direta de piruvato. Em células com mais tempo de cultivo, esse efeito foi mais pronunciado. As enzimas como  $\alpha$ -glicosidase, enzimas do ciclo do ácido cítrico, a cadeia respiratória, o ciclo do glioxilato, localizadas na mitocondria permaneceram em baixo nível, aumentando consideravelmente após a depleção de toda glicose. Esses resultados confirmam os dados obtidos por POLAKIS et al (1964).

O efeito repressor da glicose sobre o sistema respiratório é conhecido de longa data (CRABTREE, 1929). Esse fenômeno é conhecido como "contra efeito Pasteur" por ser o corolário do efeito Pasteur ou, como é mais conhecido, "efeito Crabtree".

SWANSON e CLIFTON (1948) já haviam feito observações sobre o crescimento aeróbico de leveduras em glicose, verificando que as mesmas utilizavam principalmente a via fermentativa. LEMOIGNE et al (1954), encontraram fenômeno da diauxia quando cul

tivavam leveduras em altas concentrações de glicose, constatando intensa fermentação aeróbica na primeira fase exponencial. Em baixas concentrações, tal fato não se verificou. EPHRUSSI et al. (1956), iniciando cultura em presença de glicose em solução a 3% com organismos inteiramente adaptados a condições aeróbicas observaram que a taxa de fermentação aeróbica aumentava rapidamente durante a fase de crescimento exponencial e que nesse mesmo tempo a taxa de respiração decrescia a valor muito baixo. Poucas gerações antes do fim da fase exponencial, quando a glicose já não mais saturava o sistema de fermentação, o  $Q_{CO_2}$  decresceu a baixo valor e, simultaneamente, o  $Q_{O_2}$  aumentou. Esse experimento mostrou claramente que o efeito Crabtree é parte importante da fisiologia de leveduras, crescendo em altas concentrações de glicose.

DE DEKEN (1966) relatou que quando *S. cerevisiae* crescia exponencialmente em glicose ou fructose como fonte de energia, em presença de ar, a degradação da glicose era procedida principalmente pela fermentação aeróbica. Quando estas eram cultivadas em mannose ou galactose, a degradação se processava simultaneamente por respiração e fermentação. Essa situação resultou de uma repressão parcial mas constante do sistema respiratório.

HOMMES (1965) observou que "strain" de *S. carlsbergensis* crescendo em meio com 0,6 e 2,0% de glicose, exibiu diferentes mecanismos de controle durante a glicólise aeróbica, ainda que a cinética de consumo de oxigênio tivesse sido qualitativamente a mesma. Contudo a cinética dos transportadores de cadeia respiratória foi encontrada como sendo diferente, embora a concentração de citocromos fosse igual em ambos os casos. Segundo HOMMES, com levedura cultivada nas condições mencionadas de concentração de glicose, redução nos transportadores de eletrons durante o efeito Crabtree, indica a possibilidade de controle pelo fosfato ou acceptor de fosfato.

Ainda HOMMES (1966), analisando o mecanismo do efeito Crabtree concluiu que na levedura cultivada em meio com 0,6% de glicose, o efeito Crabtree pode ser devido a uma inibição alostérica da fosfofrutoquinase causada por alta concentração de ATP e uma baixa concentração de ADP. A baixa concentração de ADP oferece uma explicação para as observações anteriores da redução de citocromos, durante o efeito Crabtree. Um ponto de controle na



conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato pôde ser identificado, resultando numa falta de substrato mitocondrial. Isso pode explicar a oxidação de citocromos observada durante o período de efeito Crabtree nas culturas com 2% de glicose.

Vários exemplos são conhecidos de fenômenos biológicos que mostram periodicidade, isto é, que se repetem a intervalos periódicos de tempo, funcionando, assim, como verdadeiros relógios biológicos.

Verificou-se que quando uma suspensão de células de *S. carlsbergensis*, entra em transição de aerobiose para anaerobiose, as trocas verificadas na óxido-redução dos citocromos são monotônicas, enquanto que a concentração intracelular de NAD-reduzido flutua de forma cíclica, dando uma sucessão de ciclos sinusoidais onde NAD-reduzido se oxida e se reduz, de modo sucessivo, em ciclos que podem variar de amplitude até se extinguirem.

Estudos procedidos no sistema glicolítico de *S. carlsbergensis* demonstraram que durante a transição de Pasteur, ocorrem flutuações nas concentrações dos intermediários glicolíticos que tem direta correlação com o fenômeno das oscilações biológicas. Foi verificado que o sistema glicolítico, pelo menos dessa levedura, é constituído por diversos pares de osciladores biológicos (veja BACILA, 1966).

BETZ e CHANCE (1965), verificaram que a oscilação do nível de piridina-nucleotídeos reduzidos, em células de *S. carlsbergensis*, durante o período de transição aerobiose-anaerobiose, pode ser paralisado pelo dinitrofenol, arseniato ou deoxi-glicose, bem como com acetaldeído e acetato. Tal fato, sugere que tanto o sistema do ATP-ADP como o sistema NADH-NAD, aos quais tem sido postulado funções de controle da glicólise, estão envolvidos na geração das oscilações. A frequência dos ciclos possui amplo coeficiente de temperatura, sendo sensivelmente constante entre 20° e 40°C mas grandemente distinto na faixa de temperatura abaixo de 20°C.

HESS e BOITEUX (1968) mostraram que a indução de oscilações glicolíticas em células de levedura é independente do estado biológico das leveduras e que oscilações podem ser obtidas com uma variedade de substratos, em células crescendo sob condições aeróbicas ou anaeróbicas, na fase logaritmica ou na fase estacionária e com numerosos substratos de cultivo. A indução

da máxima oscilação, em extrato livre de células, é obtida em extração com tampão fosfato de potássio, pH 6,5. Foi verificado que a resposta oscilatória em sistemas glicolíticos está ligada somente aos componentes já bem conhecidos da glicólise.

Entre outros trabalhos que tem contribuído para o estudo da cinética de fase dos intermediários glicolíticos e o mecanismo das oscilações em *S. carlsbergensis*, estão CHANCE et al (1965), BETZ (1966) e GHOSH et al (1971).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 *Microorganismo*

A levedura utilizada foi *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen, I.Z. nº 1831, procedente da Micoteca do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Culturas estoques foram mantidas em tubos com meio de cultivo inclinado, com a seguinte composição: glicose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1% e agar 1,2%. As culturas foram mantidas por 24 horas a 30°C e repicadas mensalmente.

#### 3.2 *Meio de cultura*

O meio de cultura utilizado foi essencialmente o mesmo daquele preparado para conservação da cultura ou seja: glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura em pó 1%. Para tornar o meio sólido, foi adicionado agar na concentração de 1,2%. A esterilização foi processada por autoclavagem, a 120°C por 20 minutos. O pH do meio foi 5,6. Esse meio foi empregado em sua forma sólida para contagem de células em placas de Petri.

#### 3.3 *Condições de cultivo celular*

As células foram cultivadas por 24 horas em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado, incubados a 30°C e a seguir retiradas com uma alça, inoculadas em 200 ml de meio líquido, previamente esterilizado, em frascos Erlenmeyer com 500 ml de capacidade.

A cultura foi incubada em sala de fermentação a 29 ± 1,5°C, sobre agitador recíproco, a 90 oscilações por minuto, por 24 horas.

Alíquotas de 1 ml dessa suspensão de células foram inoculadas em frascos contendo 200 ml do meio de cultura e incubadas em condições idênticas às acima descritas, por um período que variou de 24 a 120 horas.

### 3.4 *Padronização da suspensão de células*

Após cada período de cultivo pré-estabelecido, as células foram coletadas por centrifugação, em tubos de 250 ml de capacidade, à aproximadamente 2.500 rpm por 15 minutos.

As células foram lavadas 2 vezes com uma solução de KCl 0,154 M, centrifugando-se cada vez e ressuspensas em 100 ml da mesma solução, retornando às condições de crescimento, ou seja, permanecendo 24 horas em agitador recíproco, a 90 oscilações por minuto, em sala de fermentação a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , para permitir uma redução da taxa de respiração endógena a níveis negligenciáveis. Decorrido as 24 horas de exaustão, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com solução de KCl 0,154 M e a seguir suspensas em tampão fosfato de Sørensen com pH igual a 5,6 até dar absorvância igual a 1,00 a 430 nm em espectrofotômetro Beckman-DU. Esta suspensão foi utilizada para determinações manométricas e viabilidade das células.

### 3.5 *Determinação da viabilidade celular*

A viabilidade celular foi determinada, somente após a padronização da suspensão de células, antes da operação em aparelho convencional de Warburg. A determinação foi feita pelo processo de diluição em série, com plaqueamento de 0,1 ml da suspensão, convenientemente diluída, sobre meio sólido, em placas de Petri. Estas, foram incubadas 30 horas em estufa a  $30^\circ\text{C}$ , sendo então contadas as colônias que aí se desenvolveram. A contagem do total de células foi feita em câmaras de contagem tipo Fuchs-Rosenthal. Foram utilizadas sempre 10 placas para a contagem de colônias e as células contadas em câmara de contagem corresponderam a 4 amostragens por alíquota.

Para estimativa do número de leveduras existentes na suspensão, foram tomadas 2 alíquotas de 1 ml da suspensão previamente padronizada e diluídas de 1:2 em solução de lactofenol azul, segundo CARDOSO (1971), para posterior contagem em câmaras tipo Fuchs-Rosenthal.

As contaminações quando ocorreram, foram em níveis negligenciáveis.

### 3.6 *Determinação do ritmo de crescimento celular*

Células de *S. carlsbergensis* foram repicadas para tubo de ensaio contendo meio de cultura sólido, inclinado, e permanecidas em incubação durante 24 horas a 30°C. Partindo-se do tubo de ensaio, células foram transferidas, com alça de Drigalsky, para frasco Erlenmeyer de 500 ml de capacidade, contendo 200 ml de meio de cultivo líquido, esterilizado, e colocado em agitador recíproco, a 90 oscilações por minuto, a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Desse frasco, foram transferidas alíquotas de 1 ml para frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura, esterilizado, onde permaneceram em cultivo, por período máximo de 120 horas, em agitador recíproco, tal como nas condições acima descritas.

Após períodos de cultivo de 12, 18, 24, 48, 72, 96 e 120 horas foram tomadas alíquotas de 10 ml da suspensão e centrifugadas em tubos graduados de 15 ml de capacidade, a 2.500 rpm por 10 minutos e o volume de células sedimentadas foi observado.

### 3.7 *Determinações manométricas*

As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg.

Foram utilizados 2,5 ml da suspensão de leveduras em frascos de Warburg com um braço lateral contendo 0,2 ml de uma solução de glicose, correspondente a 10 umoles de substrato. O volume final de fluido do sistema foi de 2,85 ml.

A temperatura do banho foi fixada em 30°C e o conjunto sofreu 100 oscilações por minuto.

A absorção de  $\text{CO}_2$  foi efetuada por 0,15 ml de uma solução de KOH a 20% colocada juntamente com uma tira de papel de filtro no poço central. Quando não se utilizou KOH a 20%, esse volume foi substituído por 0,15 ml de tampão fosfato.

A liberação de  $\text{CO}_2$  em aerobiose foi calculada pelo método direto de Warburg (UMBREIT et al., 1959).

O tempo de equilíbrio antes da adição de substrato ao sistema foi de 20 minutos.

Para operações em aerobiose, a atmosfera no interior dos frascos foi ar e quando se utilizou de ambiente anaeróbico, foi passado um fluxo de nitrogênio livre de oxigênio, durante 15 minutos.

### 3.8 *Determinações analíticas*

Clarificação do meio fermentado: o método seguido foi aquele descrito em BACILA (1960).

Nitrogênio total foi determinado pelo processo micro Kjeldahl segundo descrição em TASTALDI (1965).

Carboidratos totais foram medidos como glicose pela reação de antrona, segundo o método descrito em UMBREIT et al (1959).

Etanol foi estimado pela taxa de redução de NAD em presença de desidrogenase alcoólica, segundo BRINK et al (1954).

Ácido láctico foi dosado colorimetricamente segundo método descrito em NEISH (1952).

### 3.9 *Drogas e reagentes*

As seguintes drogas e meios de cultura foram utilizadas como parte deste trabalho: Glicose para meio de cultivo (Reagen); como substrato para respiração ou fermentação (Difco). Peptona (Maknur Laboratories, Canadá). Extrato de levedura (Fisher). Agar (Oxoid nº 3). Nicotinamida adenina dinucleotídico e desidrogenase alcoólica (Calbiochem, Inc., U.S.A.). Lactato de lítio (QEEL-Tenant Química). P-Hidroxidifenil (BDH - The British Drug Houses, ltd., Inglaterra).

As substâncias inorgânicas foram todas de boa procedência e se tratam de reagentes pró-análise.

### 3.10 *Análise estatística*

A análise da variância foi efetuada seguindo-se o esquema conforme delineamento em parcelas subdivididas.

Tempo de cultivo (horas). parcela

Tempo de incubação (minutos): sub-parcela

Nos ensaios de respiração foram utilizadas 3 repeti-

ções, com uma observação por sub-parcela.

Nos experimentos de fermentação foram utilizadas 2 repetições, com 2 observações por sub-parcela (análise efetuada com a média das 2 observações).

*Esquema geral da análise da variância*

Fontes de variação	G.L.
Repetições	$r - 1$
Tempo de cultivo (H)	$h - 1$
Erro (a)	$(r - 1) (h - 1)$
Tempo de incubação (T)	$t - 1$
H x T	$(h - 1) (t - 1)$
Erro (b)	$h (r - 1) (t - 1)$
Total	$rht - 1$

sendo:

$r = n^{\circ}$  de repetições;

$h = n^{\circ}$  de tempos de cultivo ensaiados e,

$t = n^{\circ}$  de tempos de incubação ensaiados.

Conduziram-se análises complementares onde foram testados os efeitos de tempo de cultivo, tempo de incubação e H x T, com exclusão dos dados tomados a 24 horas. Tal análise foi feita com base numa hipótese estabelecida num ensaio preliminar, no qual se havia verificado existir um comportamento metabólico semelhante a partir de 48 horas de cultivo.

Outra análise foi feita para avaliar o efeito dos tempos de incubação dentro de cada tempo de cultivo.

Em caso de parcelas perdidas o resíduo a foi estimado excluindo-se o tratamento que apresentou a parcela perdida.

O esquema utilizado para a análise da variância segue aquele recomendado por STEEL e TORRIE (1960).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Condições de cultivo de Saccharomyces carlsbergensis

Para que fosse possível estabelecer as condições de cultivo a que eram submetidas as células de *S. carlsbergensis*, várias experiências foram levadas a efeito.

#### 4.1.1 Relação entre a viabilidade celular e tempo de cultivo

A fim de conhecer o estado fisiológico da população de células desenvolvidas aerobicamente nos cultivos de *S. carlsbergensis*, levadas a efeito em tempos que variaram de 24 a 120 horas, determinações de viabilidade das diferentes amostras foram conduzidas e os resultados obtidos são mostrados na Fig. 1.

A variação ocorrida na viabilidade celular durante os vários tempos de cultivo foi pequena. Os resultados mostraram que houve um pequeno acréscimo na viabilidade celular, de 14 a 72 horas, e uma queda muito leve quando as células atingiram de 96 a 120 horas de cultivo.

#### 4.1.2 Ritmo de crescimento celular

Paralelamente, determinou-se o ritmo de crescimento celular, tomando-se como base o volume de células sedimentadas por centrifugação, a partir de uma alíquota de 10 ml de suspensão retiradas do meio de cultivo. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela I.

Como pode ser observado, há um crescimento intenso durante as 24 horas iniciais, atingindo um platô praticamente após 48 horas de cultivo, onde a concentração de glicose se torna limitante. Após esse período, o acréscimo na massa celular é pouco intenso.



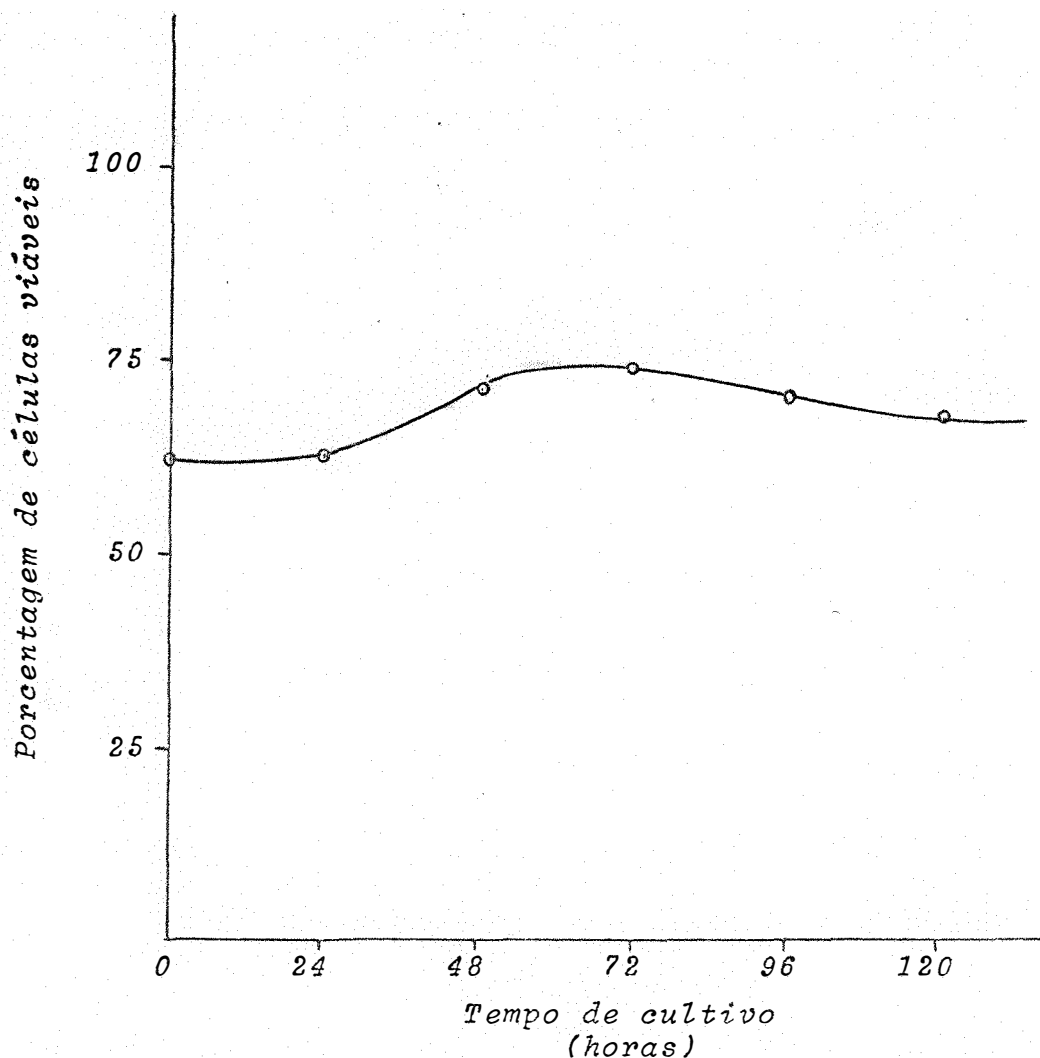


Figura 1 - Percentual de células viáveis de *S. carlsbergensis*, em relação ao tempo de cultivo

Células cultivadas em caldo contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, em tempos que variaram de 24 a 120 horas, a  $29 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ . em agitador recíproco, a 90 oscilações por minuto. Coleta das células feita por centrifugação, seguida de 2 lavagens com KCl 0,154 M, esterilizado, sendo ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas em jejum por 24 horas, em condições de temperatura e agitação acima descritas. Após essa operação, as células foram novamente coletadas por centrifugação, lavadas mais 2 vezes com solução de KCl 0,154 M e em seguida, suspensas em tampão fosfato 0,067M, pH 5,6, até obter-se absorvância igual a 1,00, em espectrofotômetro Beckman-DU. Uma alíquota dessa suspensão foi retirada para estimativa do número de células, por contagem em câmara tipo Fuchs-Rosenthal, e outra, após conveniente diluição em solução fisiológica (NaCl em solução a 0,85%), foi semeada em placas de Petri, contendo meio de cultivo sólido, para contagem de células viáveis. Foram utilizadas 10 placas para contagem de colônias, após incubação de 30 horas em estufa a  $30^{\circ}\text{C}$ . Para contagem em câmara, 2 alíquotas foram diluídas de 1:2 em lactofenol azul e 10 vezes em água. Para cada alíquota foram efetuadas 4 contagens.

*Tabela I - Crescimento de Saccharomyces carlsbergensis em meio contendo glicose 1,6% a 2,0%, peptona 2% e extrato de levedura 1%. Partiu-se de um tubo contendo meio sólido o qual, após repicagem, foi incubado por 24 horas a 30°C. Deste tubo foi transferido uma alça de cultura para frasco Erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 200 ml de meio de cultivo. O frasco permaneceu incubado a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$  por 24 horas em agitador recíproco, a 90 oscilações por minuto. Após crescimento por 24 horas, este frasco serviu de inóculo padrão. Um ml desta suspensão foi transferido para frascos onde se cultivaram as leveduras até 120 horas. Em tempos pré-estabelecidos, alíquotas de 10 ml da suspensão foram retiradas e centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos, e o volume de células sedimentadas foi observado para se ter idéia do ritmo de crescimento.*

Tempo de cultivo (horas)	Volume de células/10 ml; meio contendo 1,6% de glicose				Volume médio de células/10 ml
	Repetições				
12	0,12	0,13	0,16	0,13	0,14
18	0,16	0,18	0,19	0,17	0,18
24	0,18	0,20	0,19	0,22	0,20
48	0,22	0,21	0,23	0,21	0,22
72	0,21	0,22	0,20	0,22	0,21
96	0,21	0,24	0,21	0,22	0,22
120	0,23	0,22	0,20	0,23	0,22

Tempo de cultivo (horas)	Volume de células/10 ml; meio contendo 2% de glicose				Volume médio de células/10 ml
	Repetições				
24	0,21	0,21	0,20	0,22	0,21
48	0,24	0,26	0,28	0,29	0,27
72	0,30	0,32	0,27	0,29	0,29
96	0,32	0,32	0,27	0,29	0,30
120	0,28	0,30	0,30	0,34	0,30

#### 4.1.3 Consumo de glicose durante o crescimento celular e produção de etanol

Foram efetuadas medidas da glicose residual ao longo do período de cultivo da levedura, a fim de se estabelecer correlação entre o consumo de carboidrato e o crescimento celular. Paralelamente foi efetuado dosagem de etanol formado durante o período de cultivo em estudo, os quais podem ser vistos na Fig. 2.

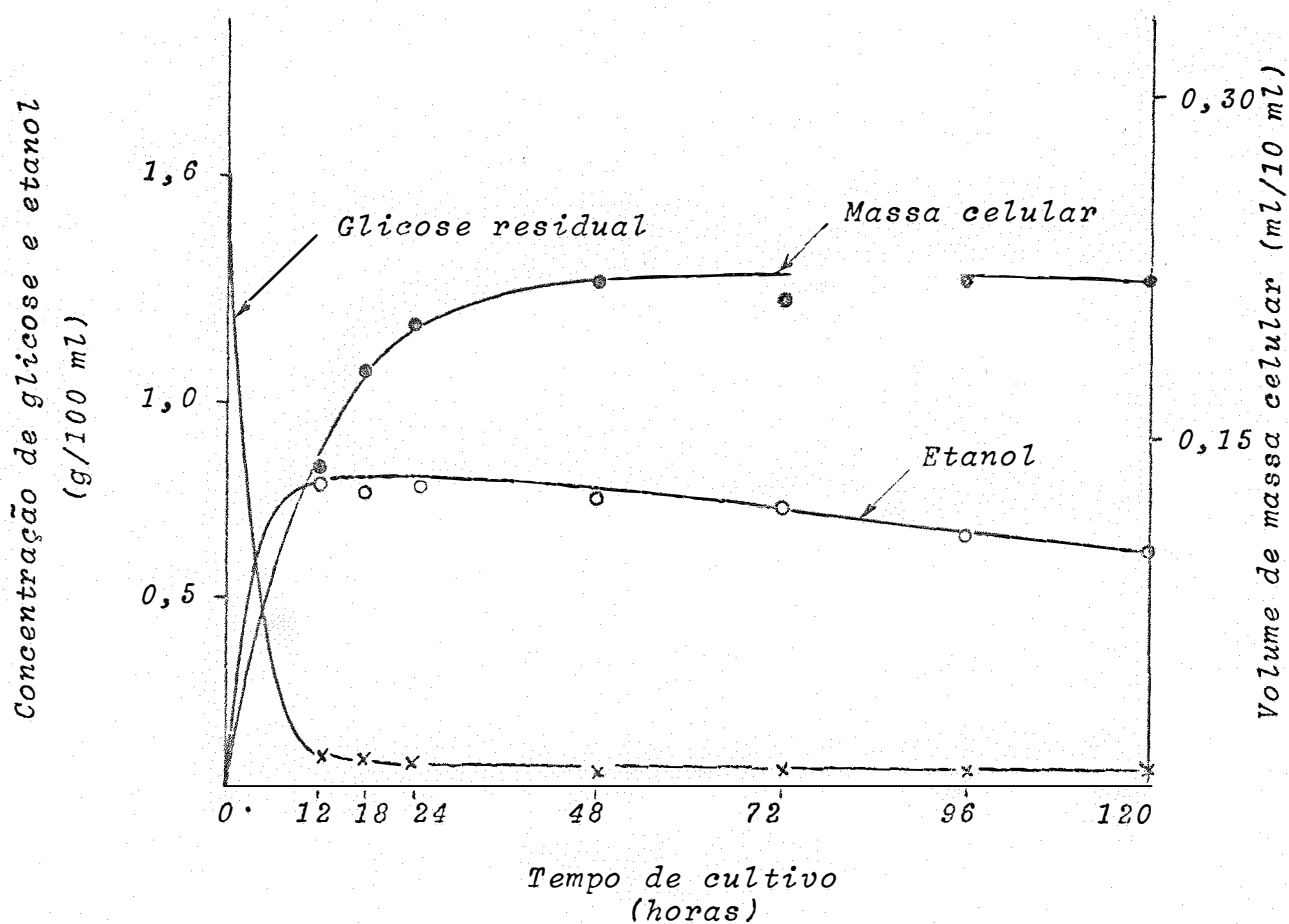


Figura 2 - Relação entre consumo de carboidrato, produção de massa celular e de etanol ao longo do tempo de cultivo. Células foram cultivadas em meio contendo glicose 1,6%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, em tempos que variaram de 12 a 120 horas, a  $29 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , em agitador recíproco, com 90 oscilações por minuto. Em períodos pré-estabelecidos, amostras foram retiradas e centrifugadas para separação de células e o sobrenadante foi analisado após prévia clarificação. Glicose residual foi determinada pela reação com antrona, e etanol foi dosado enzimaticamente.

#### 4.2 *Dissimilação aeróbica da glicose*

Várias experiências foram levadas a efeito com a finalidade de estudar a capacidade da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* de dissimilar glicose aerobicamente.

Para tanto, foram usadas partidas de células cultivadas aerobicamente em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, de 24 a 120 horas, levadas à exaustão em estado de não proliferação por 24 horas. Em experimentos respirométricos foram medidos, oxigênio consumido, dióxido de carbono produzido e em alíquotas retiradas aos 15, 30, 60 e 120 minutos, foram feitas determinações analíticas para glicose residual, etanol e ácido láctico produzidos.

A fim de avaliar, conjuntamente, o oxigênio consumido por respiração e o dióxido de carbono liberado pela soma da fermentação aeróbica e da respiração, foram utilizados, em determinações manométricas, pares de frascos, um contendo KOH a 20% e outro sem, para todos os tempos de incubação. No frasco com KOH a 20%, foi medido oxigênio consumido pela suspensão de leveduras e no outro, assumindo-se que a mesma quantidade de oxigênio tenha sido consumida, foi calculada a quantidade de dióxido de carbono liberada. Considerando-se que o padrão metabólico em ambas as instâncias tenha sido essencialmente o mesmo, os valores encontrados nas determinações analíticas foram dados em bases à média obtida em ambos os frascos.

As Figuras 3 a 7 mostram os resultados obtidos com a presente série de experimentos.

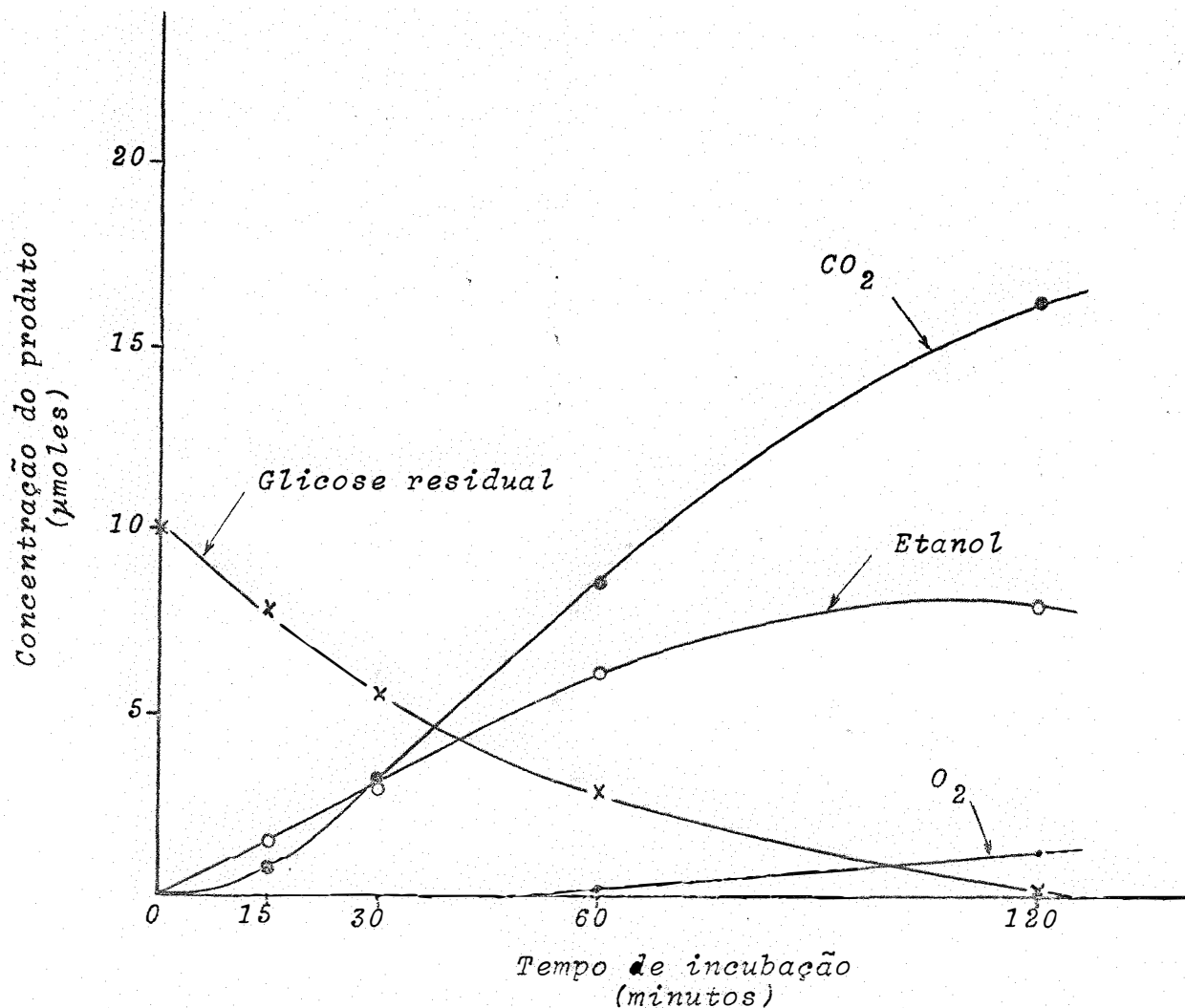


Figura 3 - Medida da respiração e da fermentação aeróbia por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 24 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 24 horas a  $29 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto, em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com cerca de 5 volumes de KCl 0,154 M, esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e de temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com a solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman-DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: 2,5 ml da suspensão de levedura; solução de glicose contendo 10  $\mu\text{moles}$  em 0,2 ml, no braço lateral; solução de KOH a 20%, 0,15 ml no poço central, e quando se mediu conjuntamente a fermentação aeróbica, a solução de KOH a 20% foi substituída por 0,15 ml de tampão fosfato. Temperatura  $30^{\circ}\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição de substrato, 20 minutos. Fase gasosa no interior dos frascos: ar atmosférico. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,441 mg. Para cada determinação aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram utilizadas 3 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  do produto ensaiado.

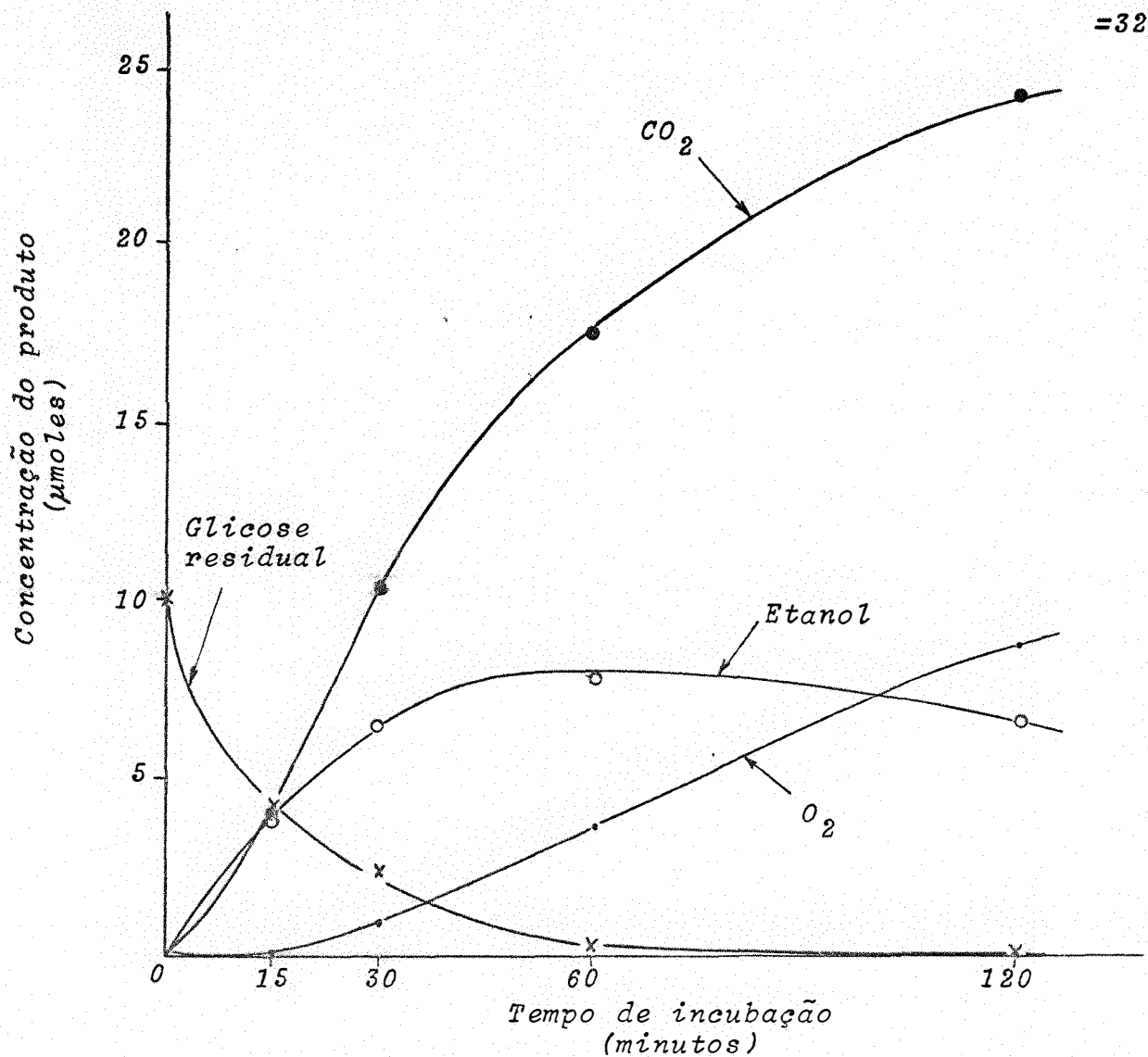


Figura 4 - Medida da respiração e da fermentação aeróbica por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 48 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 48 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto, em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com cerca de 5 volumes de KCl 0,154 M, esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e de temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com a solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até a sorbância igual a 1,00, em espectrofotômetro Beckman-DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: 2,5 ml da suspensão de levedura; solução de glicose contendo 10  $\mu\text{moles}$  em 0,2 ml, no braço lateral; solução de KOH a 20%, 0,15 ml no poço central, e quando se mediu conjuntamente a fermentação aeróbica, a solução de KOH a 20% foi substituída por 0,15 ml de tampão fosfato. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição de substrato, 20 minutos. Fase gasosa no interior dos frascos: ar atmosférico. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,479 mg. Para cada determinação aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram utilizadas 3 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, a baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  do produto ensaiado.

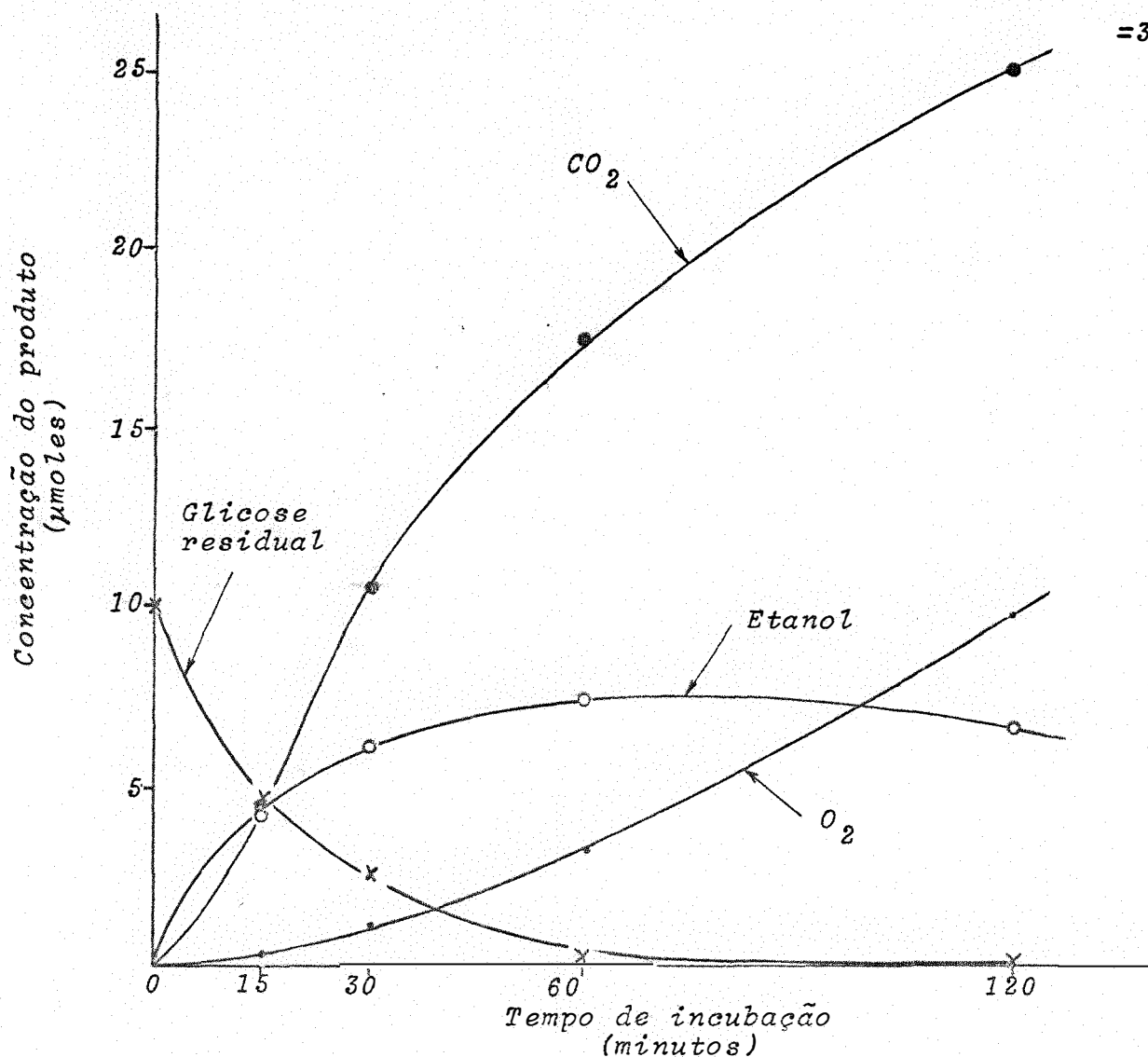


Figura 5 - Medida da respiração e da fermentação aeróbica por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 72 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 72 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto, em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com cerca de 5 volumes de KCl 0,154 M, esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e de temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com a solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00, em espectrofotômetro Beckman-DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: 2,5 ml da suspensão de levedura; solução de glicose contendo 10  $\mu\text{moles}$  em 0,2 ml, no braço lateral; solução de KOH a 20%, 0,15 ml no poço central, e quando se mediu conjuntamente a fermentação aeróbica, a solução de KOH a 20% foi substituída por 0,15 ml de tampão fosfato. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição de substrato, 20 minutos. Fase gasosa no interior dos frascos: ar atmosférico. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,441 mg. Para cada determinação aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram utilizadas 3 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, a baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  do produto ensaiado.

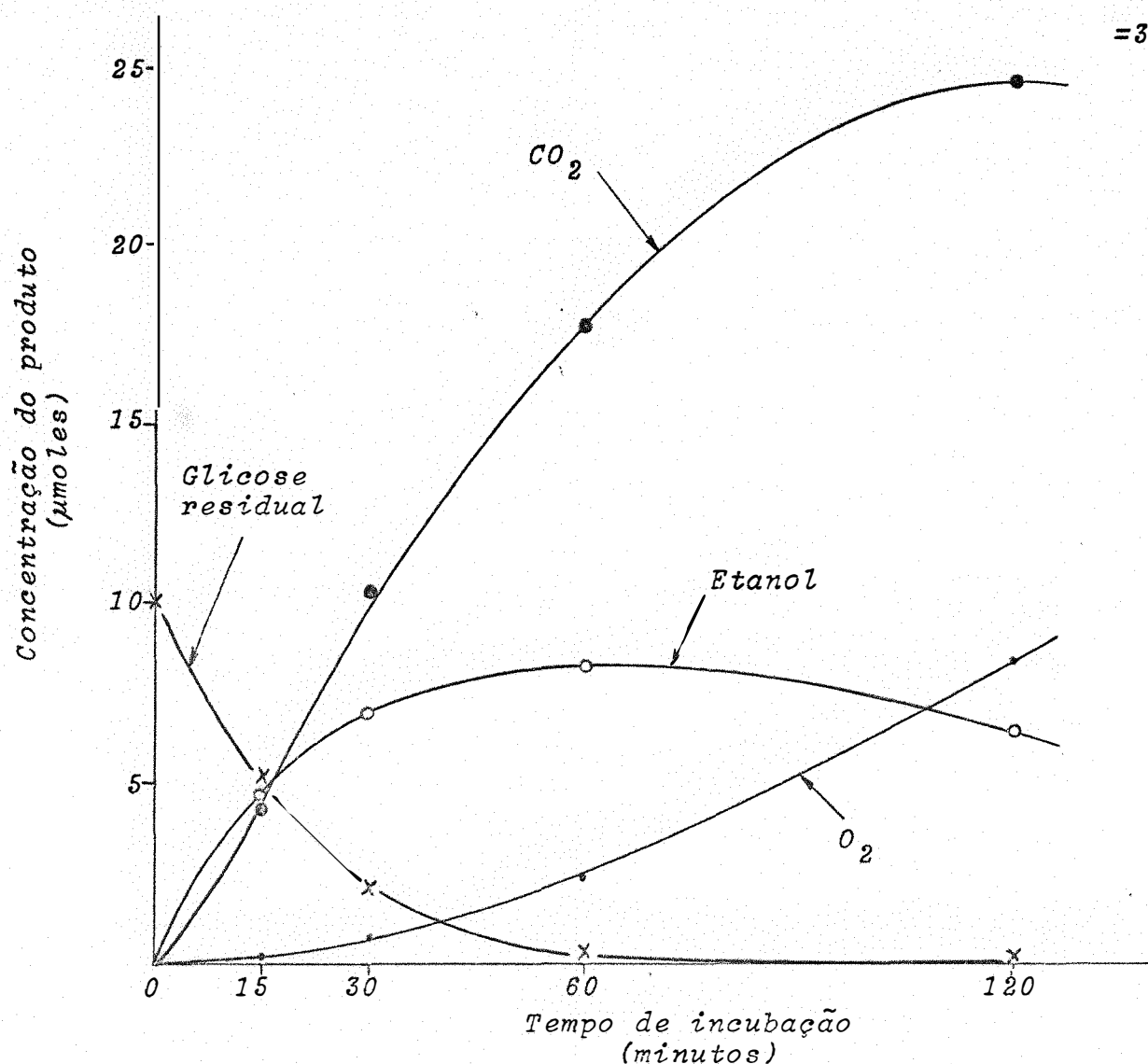


Figura 6 - Medida da respiração e da fermentação aeróbica por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 96 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 96 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto, em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com cerca de 5 volumes de KCl 0,154 M, esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e de temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com a solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorbância igual a 1,00, em espectrofotômetro Beckman-DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: 2,5 ml da suspensão de levedura; solução de glicose contendo 10  $\mu\text{moles}$  em 0,2 ml, no braço lateral; solução de KOH a 20%, 0,15 ml no poço central, e quando se mediu conjuntamente a fermentação aeróbica, a solução de KOH a 20% foi substituída por 0,15 ml de tampão fosfato. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição de substrato, 20 minutos. Fase gasosa no interior dos frascos: ar atmosférico. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,450 mg. Para cada determinação aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram utilizadas 3 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, a baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  do produto ensaiado.



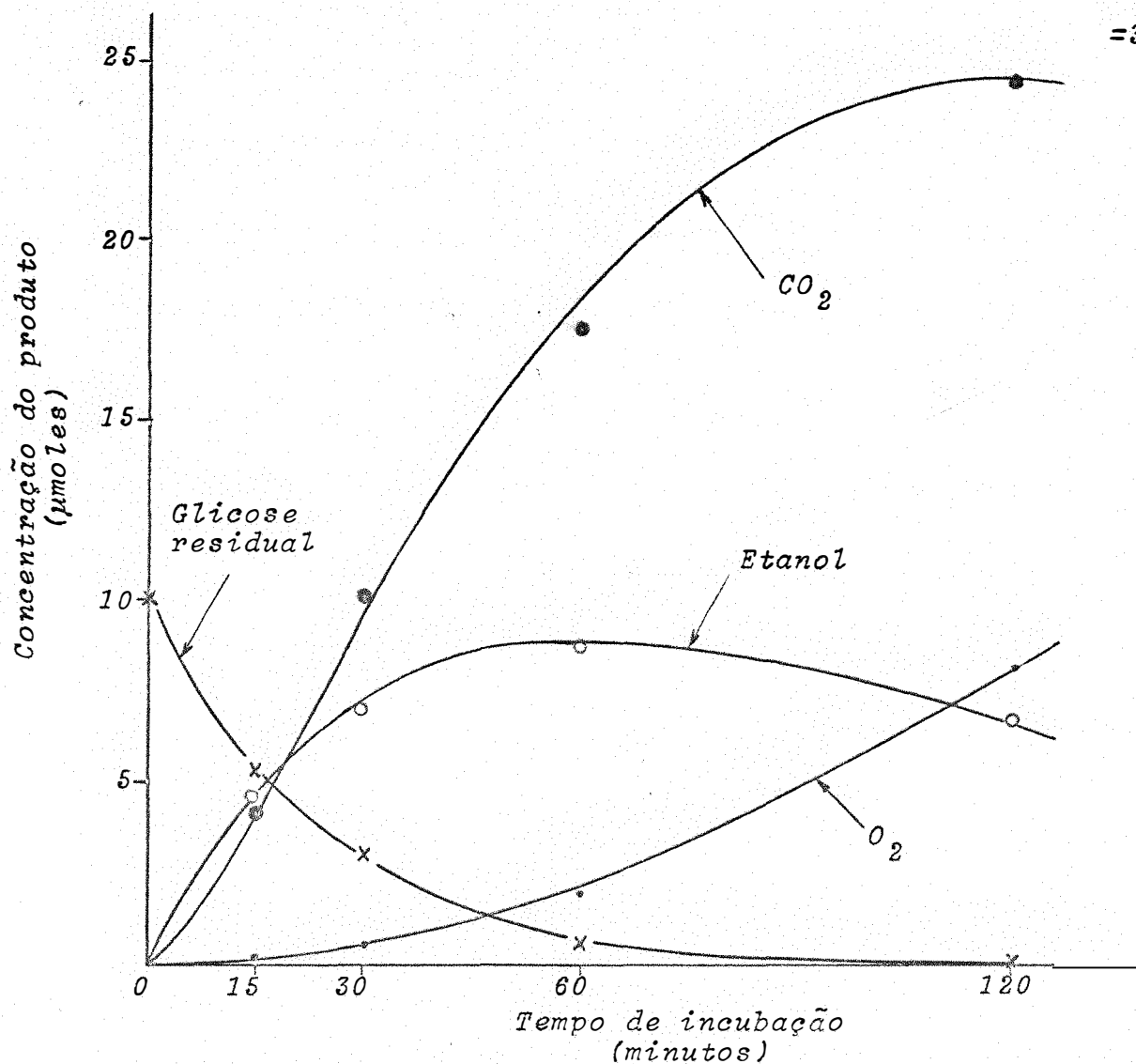


Figura 7 - Medida da respiração e da fermentação aeróbica por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 120 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 120 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto, em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas 2 vezes com cerca de 5 volumes de KCl 0,154 M, esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e de temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais 2 vezes com a solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman-DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: 2,5 ml da suspensão de levedura; solução de glicose contendo 10  $\mu\text{moles}$  em 0,2 ml, no braço lateral; solução de KOH a 20%, 0,15 ml no poço central, e quando se mediu conjuntamente a fermentação aeróbica, a solução de KOH a 20% foi substituída por 0,15 ml de tampão fosfato. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição de substrato, 20 minutos. Fase gasosa no interior dos frascos: ar atmosférico. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,460 mg. Para cada determinação aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram utilizadas 3 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, a baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  do produto ensaiado.

#### 4.2.1 Produção de ácido lático durante a dissimilação aeróbica da glicose

Foram feitas determinações da produção de ácido lático ao longo da dissimilação aeróbica da glicose, por células cultivadas em tempos que variaram de 24 a 120 horas.

Os dados estão mostrados na Fig. 8 e Tabelas II a VI.

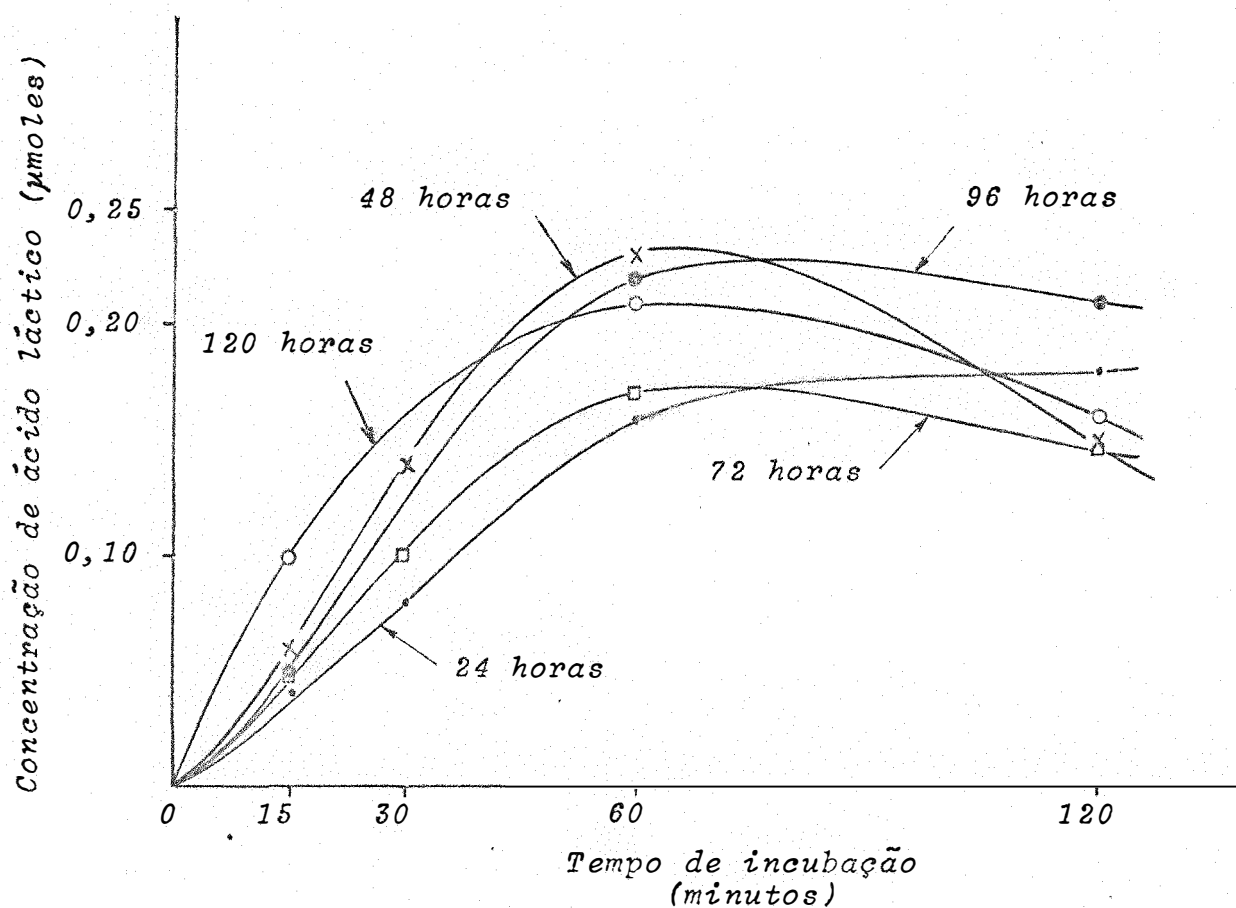


Figura 8 - Relação entre ácido lático produzido e tempo de cultivo. Células foram cultivadas aerobicamente em meio de cultura contendo 2% de glicose, em tempos variáveis de 24 a 120 horas. Determinações respirométricas da dissimilação da glicose foram efetuadas durante 120 minutos e alíquotas foram retiradas após 15, 30, 60 e 120 minutos da adição do substrato. As células foram separadas da suspensão, por centrifugação, e o sobrenadante foi analisado determinando-se a concentração de ácido lático formado.

Os dados apresentados estão expressos em µmoles de ácido lático.

### 4.3 Balanço de carbono na dissimilação aeróbica da glicose

O comportamento metabólico de *Saccharomyces carlsbergensis* cultivado em período variável de 24 a 120 horas, no que diz respeito à dissimilação de glicose, em condições aeróbicas, foi estudado em base a cálculos procedidos sobre os resultados analíticos mostrados nas Figuras 3 a 7. As Tabelas II a VI contém os resultados obtidos e a Tabela VII mostra os valores de F obtidos na análise da variância.

*Tabela II - Dissimilação aeróbica de glicose por células cultivadas por 24 horas.* As células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M. suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas a determinações manométricas em Warburg convencional, a 30°C e 100 agitações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, à baixa temperatura, para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente. O cálculo de liberação de CO<sub>2</sub> foi feito pelo método direto (UMBREIT et al., 1959).

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	8,30	6,99	3,46	0,71
Etanol produzido	1,50	2,91	6,09	7,99
Ácido láctico produzido	0,04	0,08	0,16	0,18
Oxigênio consumido	0,00	0,00	0,07	1,20
CO <sub>2</sub> produzido	0,74	3,09	8,46	16,18
Glicose assimilada	1,07	1,49	3,02	3,84
Percentual de assimilação de glicose ( % )	62,16	49,34	46,18	41,33

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado, média de 3 repetições.

*Tabela III - Dissimilação aeróbica de glicose por células cultivadas por 48 horas.* As células foram cultivadas por 48 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas a determinações manométricas em Warburg convencional, a 30°C e 100 agitações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, à baixa temperatura, para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente. O cálculo de liberação de CO<sub>2</sub> foi feito pelo método direto (UMBREIT et al, 1959).

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	4,80	2,53	0,75	0,50
Etanol produzido	3,93	6,41	7,76	6,59
Ácido láctico produzido	0,06	0,14	0,23	0,15
Oxigênio consumido	0,11	0,96	3,59	8,78
CO <sub>2</sub> produzido	4,05	10,28	17,55	24,26
Glicose assimilada	3,19	3,55	3,62	3,19
Percentual de assimilação de glicose ( % )	61,25	47,52	39,17	33,53

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado, média de 3 repetições.

*Tabela IV - Dissimilação aeróbica de glicose por células cultivadas por 72 horas.* As células foram cultivadas por 72 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas a determinações manométricas em Warburg convencional, a 30°C e 100 agitações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, à baixa temperatura, para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente. O cálculo de liberação de CO<sub>2</sub> foi feito pelo método direto (UMBREIT et al, 1959).

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	4,94	2,80	0,55	0,32
Etanol produzido	4,75	6,10	7,35	6,67
Ácido láctico produzido	0,05	0,10	0,17	0,15
Oxigênio consumido	0,28	1,07	3,24	9,80
CO <sub>2</sub> produzido	4,15	10,48	17,47	25,04
Glicose assimilada	2,76	3,37	4,00	3,21
Percentual de assimilação de glicose ( % )	54,55	46,81	42,38	33,13

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado, média de 3 repetições.

*Tabela V - Dissimilação aeróbica de glicose por células cultivadas por 96 horas.* As células foram cultivadas por 96 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas a determinações manométricas em Warburg convencional, a 30°C e 100 agitações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, à baixa temperatura, para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente. O cálculo de liberação de CO<sub>2</sub> foi feito pelo método direto (UMBREIT et al, 1959)

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	5,72	2,97	0,84	0,54
Etanol produzido	4,73	6,91	8,29	6,50
Ácido láctico produzido	0,05	0,14	0,22	0,21
Oxigênio consumido	0,07	0,67	2,35	8,47
CO <sub>2</sub> produzido	4,13	10,36	17,75	24,72
Glicose assimilada	1,99	2,93	3,33	3,07
Percentual de assimilação de glicose ( % )	46,50	41,69	36,34	32,43

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado, média de 3 repetições.

*Tabela VI - Dissimilação aeróbica de glicose por células cultivadas por 120 horas.* As células foram cultivadas por 120 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas a determinações manométricas em Warburg convencional, a 30°C e 100 agitações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, à baixa temperatura, para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente. O cálculo de liberação de CO<sub>2</sub> foi feito pelo método direto. (UMBREIT et al, 1959).

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	5,68	3,30	0,93	0,51
Etanol produzido	4,56	7,01	8,72	6,74
Ácido láctico produzido	0,10	0,14	0,21	0,16
Oxigênio consumido	0,04	0,47	1,93	8,15
CO <sub>2</sub> produzido	4,17	10,04	17,61	24,47
Glicose assimilada	2,06	2,62	3,12	3,09
Percentual de assimilação de glicose ( % )	47,57	39,10	34,44	32,51

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado, média de 3 repetições.

Tabela VII - Valores F com a respectiva significância, calculados com os resultados obtidos na respiração, referentes aos diversos efeitos testados para cada uma das características analisadas. Coeficiente de variação dos erros a e b.

Fontes de variação	Glicose consumida	Etanol produzido	Ácido láctico produzido	O <sub>2</sub> consumido	CO <sub>2</sub> formado
Tempo de cultivo (H)	23,40 <sup>++</sup>	6,48 <sup>+</sup>	2,29 ns.	45,14 <sup>++</sup>	33,39 <sup>+++</sup>
Tempo de incubação (T)	707,95 <sup>++</sup>	193,35 <sup>++</sup>	151,94 <sup>++</sup>	1137,04 <sup>++</sup>	1954,36 <sup>+++</sup>
(H) x (T)	13,40 <sup>++</sup>	16,03 <sup>++</sup>	3,91 <sup>++</sup>	50,92 <sup>++</sup>	7,43 <sup>++</sup>
Excluindo 24 horas de cultivo					
Tempo de cultivo (H)	1,05 ns.	0,79 ns.	1,71 ns.	4,55 <sup>+</sup>	0,05 ns.
(H) x (T)	1,14 ns.	1,78 ns.	3,41 <sup>++</sup>	3,05 <sup>+</sup>	0,19 ns.
Tempos de incubação dentro dos tempos de cultivo					
24 horas	311,08 <sup>+++</sup>	382,28 <sup>+++</sup>	42,04 <sup>++</sup>	7,22 <sup>++</sup>	256,37 <sup>+++</sup>
48 horas	103,77 <sup>+++</sup>	113,44 <sup>+++</sup>	39,38 <sup>+++</sup>	318,97 <sup>+++</sup>	420,04 <sup>+++</sup>
72 horas	123,66 <sup>+++</sup>	53,41 <sup>+++</sup>	24,32 <sup>+++</sup>	388,03 <sup>+++</sup>	442,86 <sup>+++</sup>
96 horas	150,41 <sup>+++</sup>	94,85 <sup>+++</sup>	59,33 <sup>+++</sup>	333,15 <sup>+++</sup>	436,36 <sup>+++</sup>
120 horas	66,69	56,76	8,79	293,37	428,05
C.V. (a)	16,20%	26,20%	47,50%	26,30%	14,90%
C.V. (b)	6,70%	10,00%	19,10%	14,10%	5,60%

ns. = não significativo; + = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ++ = significativo ao nível de 1% de probabilidade; +++ = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade.



#### 4.4 Dissimilação fermentativa da glicose

A fim de se estudar a capacidade da levedura *Saccharomyces carlsbergensis* de dissimilar glicose anaerobicamente, algmas experiências foram levadas a efeito.

Para esse estudo, partidas de células foram cultivadas aerobicamente, em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, nas mesmas condições dos ensaios de respiração, anteriormente descritos, cultivadas de 24 a 120 horas, levadas à exaustão em condições de não proliferação por 24 horas. Através ensaios manométricos foi medido o CO<sub>2</sub> liberado e em alíquotas retiradas aos 15, 30, 60 e 120 minutos foram feitas determinações analíticas de glicose residual, de etanol e de ácido láctico produzidos.

As Figuras 9 a 13 mostram os resultados obtidos com a presente série de experimentos.

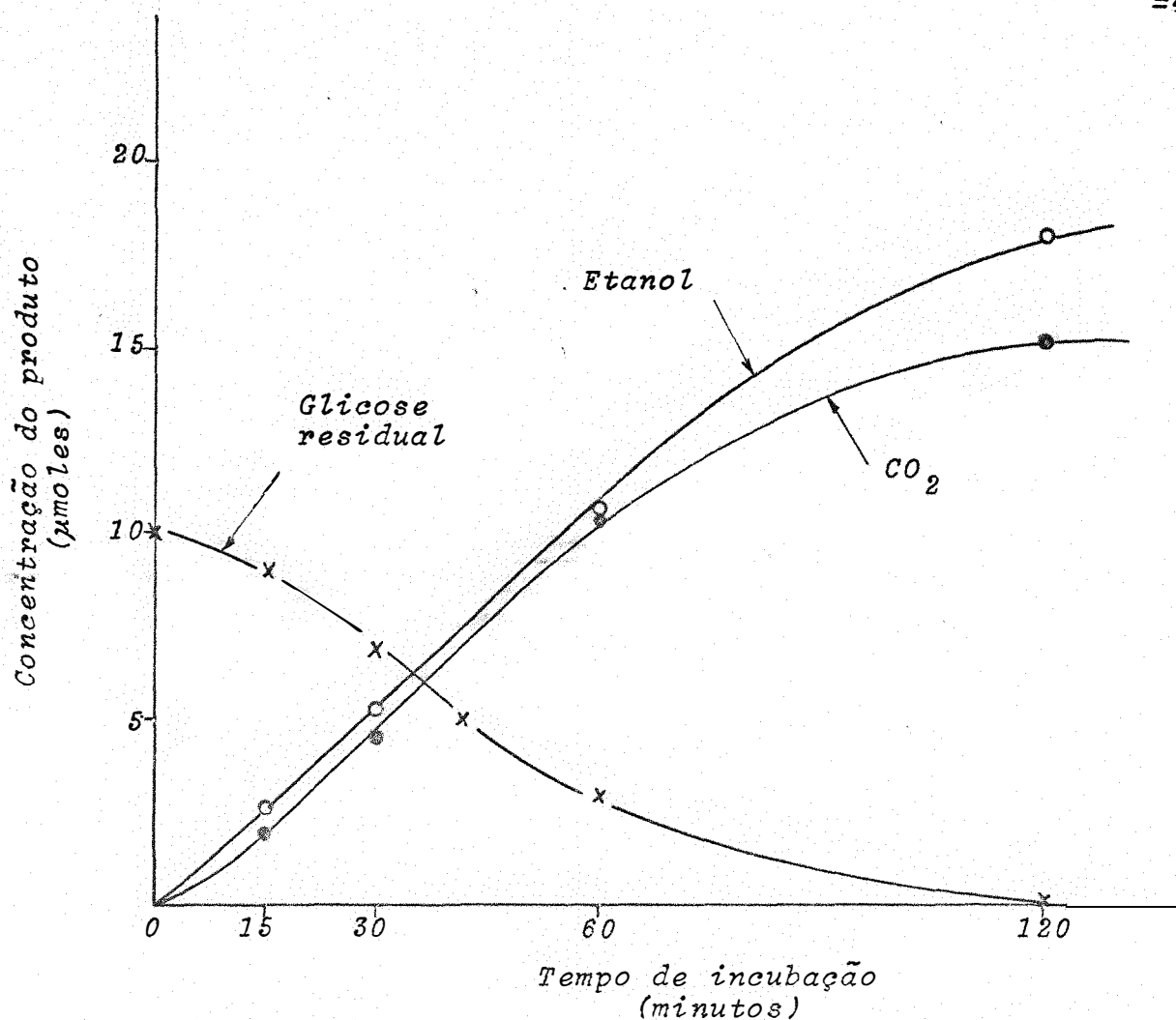


Figura 9 - Medida da fermentação anaeróbica de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 24 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 24 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com cerca de cinco volumes de KCl 0,154 M esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: suspensão de leveduras, 2,5ml; solução de glicose contendo 10 μmoles em 0,2 ml, no braço lateral; 0,15 ml de tampão fosfato no poço central, totalizando volume final de fluido de 2,85 ml. A fase gasosa no interior dos frascos foi nitrogênio, obtido pela passagem de nitrogênio livre de oxigênio durante 15 minutos. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição do substrato, 20 minutos. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,553 mg. Para cada amostra foram utilizadas 2 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em μmoles do produto ensaiado.

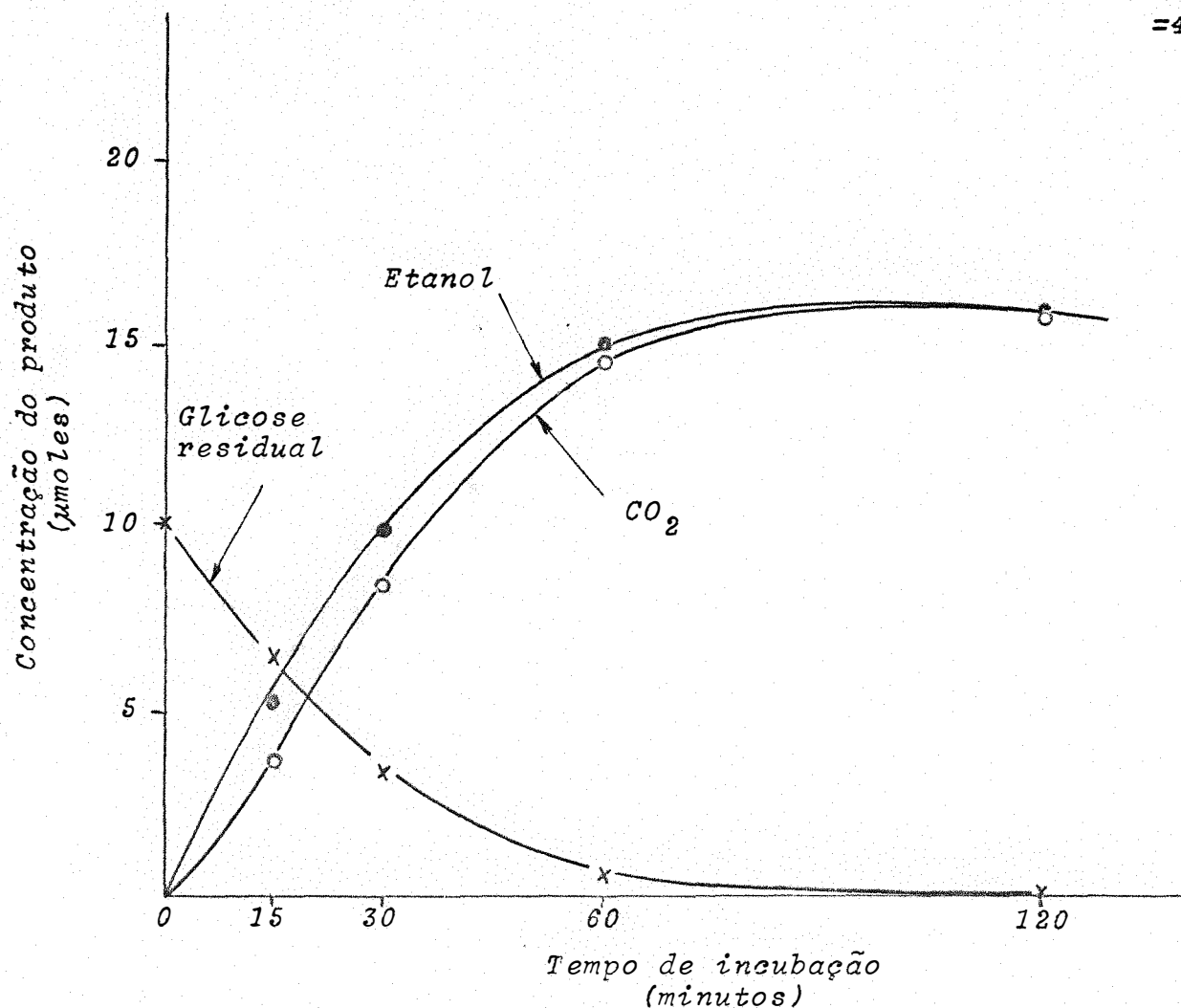


Figura 10 - Medida da fermentação anaeróbica de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 48 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 48 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com cerca de cinco volumes de KCl 0,154 M esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: suspensão de leveduras, 2,5 ml; solução de glicose contendo 10 μmoles em 0,2 ml, no braço lateral; 0,15 ml de tampão fosfato no poço central, totalizando volume final de fluido de 2,85 ml. A fase gasosa no interior dos frascos foi nitrogênio, obtido pela passagem de nitrogênio livre de oxigênio durante 15 minutos. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição do substrato, 20 minutos. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,551 mg. Para cada amostra foram utilizadas 2 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em μmoles do produto ensaiado.

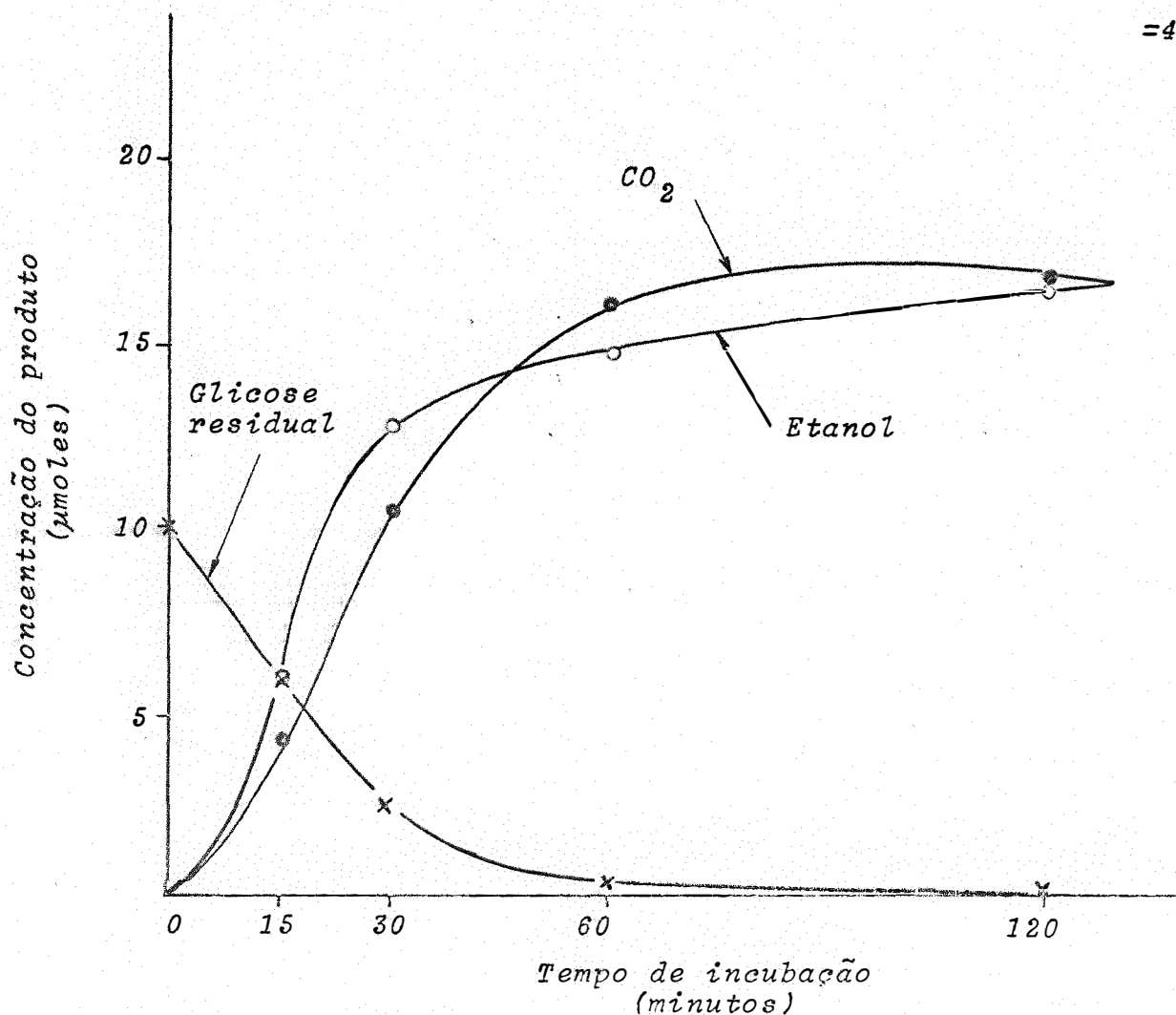


Figura 11 - Medida da fermentação anaeróbica de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 72 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 72 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com cerca de cinco volumes de KCl 0,154 M esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: suspensão de leveduras, 2,5 ml; solução de glicose contendo 10 μmoles em 0,2 ml, no braço lateral; 0,15 ml de tampão fosfato no poço central, totalizando volume final de fluido de 2,85 ml. A fase gasosa no interior dos frascos foi nitrogênio, obtido pela passagem de nitrogênio livre de oxigênio durante 15 minutos. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição do substrato, 20 minutos. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,557 mg. Para cada amostra foram utilizadas 2 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em μmoles do produto ensaiado.

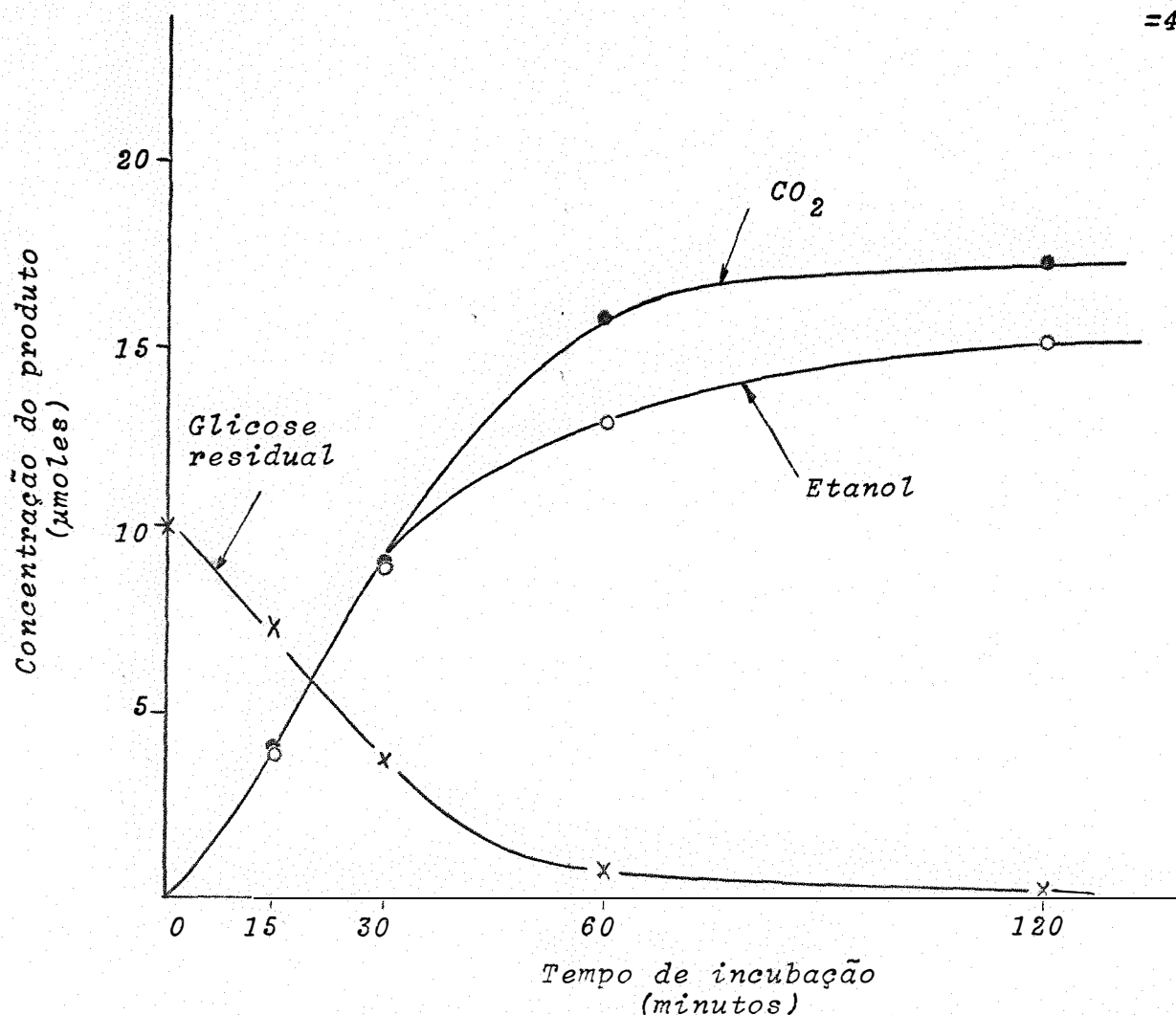


Figura 12 - Medida da fermentação anaeróbica de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 96 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 96 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com cerca de cinco volumes de KCl 0,154 M esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e temperatura idênticas às acima descritas. Foram a seguir coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6, esterilizado, até absorbância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: suspensão de leveduras, 2,5 ml; solução de glicose contendo 10 μmoles em 0,2 ml, no braço lateral; 0,15 ml de tampão fosfato no poço central, totalizando volume final de fluido de 2,85 ml. A fase gasosa no interior dos frascos foi nitrogênio, obtido pela passagem de nitrogênio livre de oxigênio durante 15 minutos. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição do substrato, 20 minutos. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,511 mg. Para cada amostra foram utilizadas 2 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em μmoles do produto ensaiado.

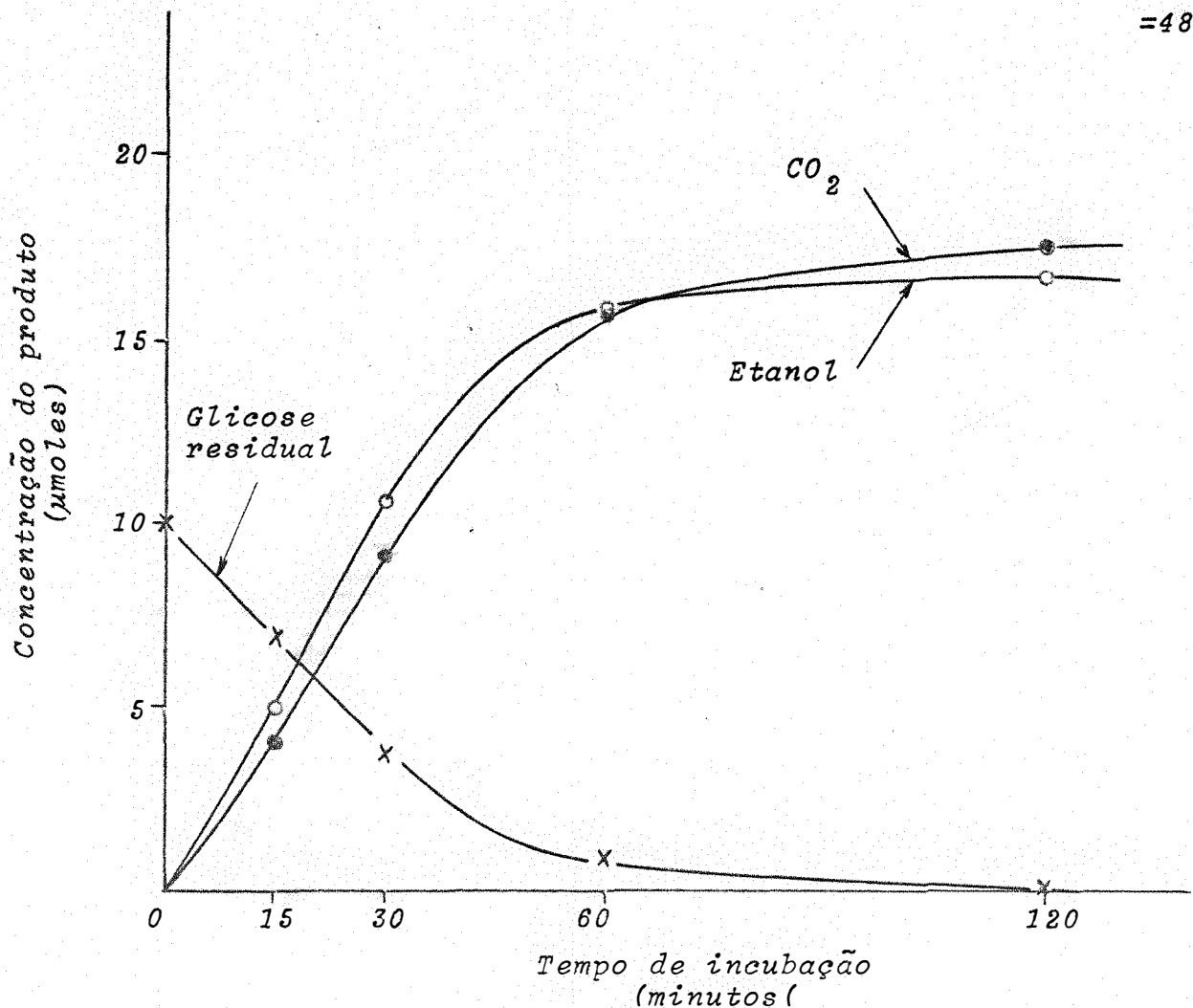


Figura 13 - Medida da fermentação anaeróbica de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* cultivada por 120 horas. Células cultivadas em glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, por 120 horas a  $29 \pm 1,5^\circ\text{C}$ , com agitação de 90 oscilações por minuto em agitador recíproco, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes com cerca de cinco volumes de KCl 0,154 M esterilizado. Depois da lavagem foram ressuspensas em 100 ml de KCl 0,154 M e conservadas por mais 24 horas, em condições de aeração e temperatura idênticas às acima descritas. Foram seguidamente coletadas novamente por centrifugação e lavadas mais duas vezes com solução de KCl 0,154 M. Após esta operação, as células foram suspensas em tampão fosfato 0,067M, pH 5,6, esterilizado, até absorvância igual a 1,00 em espectrofotômetro Beckman DU. As determinações manométricas foram efetuadas em aparelho convencional de Warburg. Sistema: suspensão de leveduras, 2,5 ml; solução de glicose contendo 10 μmoles em 0,2 ml, no braço lateral; 0,15 ml de tampão fosfato no poço central, totalizando volume final de fluido de 2,85 ml. A fase gasosa no interior dos frascos foi nitrogênio, obtido pela passagem de nitrogênio livre de oxigênio durante 15 minutos. Temperatura  $30^\circ\text{C}$ . 100 oscilações por minuto. Tempo de equilíbrio antes da adição do substrato, 20 minutos. Conteúdo de nitrogênio total igual a 0,519 mg. Para cada amostra foram utilizadas 2 repetições. Para determinações analíticas, após a operação manométrica, as células foram separadas por centrifugação, à baixa temperatura, e o sobrenadante foi examinado.

Todos os resultados constantes na Figura acima estão expressos em μmoles do produto ensaiado.

#### 4.4.1 Produção de ácido láctico durante a dissimilação anaeróbica da glicose

Foram feitas determinações da produção de ácido láctico ao longo da dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas em tempos que variaram de 24 a 120 horas.

Os dados estão mostrados na Fig. 14 e Tabelas VIII a XII.

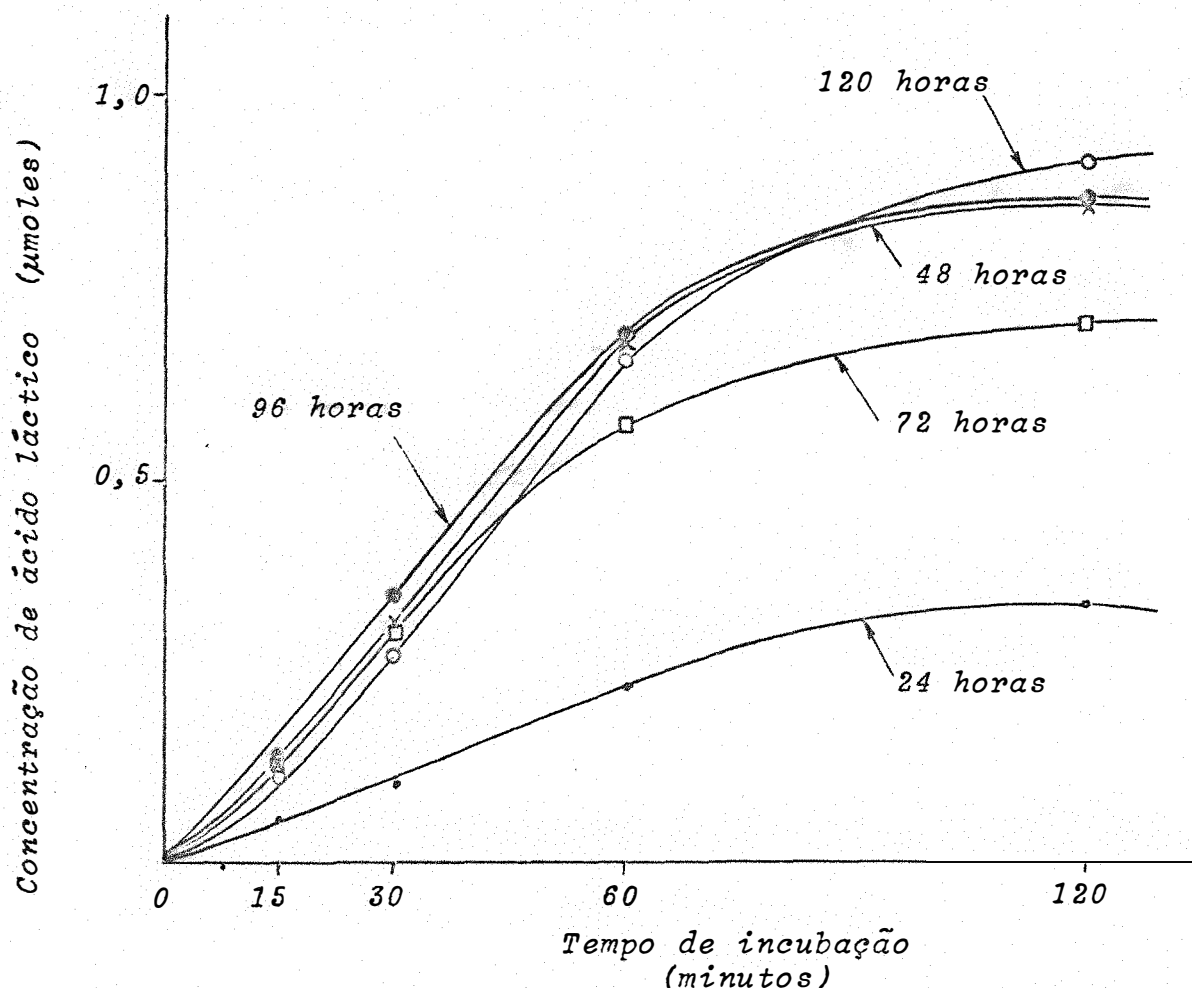


Figura 14 - Relação entre ácido láctico produzido e tempo de cultivo. Células foram cultivadas aerobicamente em meio de cultura contendo 2% de glicose, em tempos variáveis de 24 a 120 horas. Determinações manométricas da dissimilação fermentativa da glicose foram efetuadas durante 120 minutos e alíquotas foram retiradas após 15, 30, 60 e 120 minutos da adição do substrato ao sistema. As células foram separadas por centrifugação, e o sobrenadante foi analisado, determinando-se a concentração de ácido láctico formado.

Os dados apresentados estão expressos em µmoles de ácido láctico.

#### 4.5 Balanço de carbono na dissimilação anaeróbica da glicose

A dissimilação anaeróbica da glicose por células de *S. carlsbergensis* cultivadas em períodos que variaram de 24 a 120 horas, foi estudada com base a cálculos procedidos sobre os resultados analíticos mostrados nas Figuras 9 a 13. As Tabelas VIII a XII contêm os resultados obtidos e a Tabela XIII mostra os valores F obtidos na análise da variância.

*Tabela VIII - Dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas por 24 horas.* As células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidos a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas à determinações manométricas em aparelho convencional de Warburg, a 30°C e 100 oscilações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas à baixa temperatura para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente.

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	8,69	6,89	2,83	0,09
Etanol produzido	2,58	5,21	10,42	18,01
Ácido láctico produzido	0,06	0,10	0,23	0,34
CO <sub>2</sub> produzido	1,87	4,52	10,51	15,19
Glicose assimilada	0,11	0,57	1,83	1,21
Percentual de assimilação de glicose ( % )	8,27	18,33	25,52	12,16

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado.



*Tabela IX - Dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas por 48 horas.* As células foram cultivadas por 48 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidos a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas à determinações manométricas em aparelho convencional de Warburg, a 30°C e 100 oscilações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas à baixa temperatura para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido lático, colorimetricamente.

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	6,53	3,29	0,47	0,00
Etanol produzido	5,23	9,80	14,91	15,76
Ácido lático produzido	0,14	0,35	0,68	0,86
CO <sub>2</sub> produzido	3,65	8,42	14,48	15,86
Glicose assimilada	1,05	1,87	1,81	1,67
Percentual de assimilação de glicose ( % )	30,21	27,79	18,96	16,73

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado.

*Tabela X - Dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas por 72 horas.* As células foram cultivadas por 72 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidos a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas à determinações manométricas em aparelho convencional de Warburg, a 30°C e 100 oscilações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas à baixa temperatura para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente.

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	5,93	2,38	0,26	0,06
Etanol produzido	6,11	12,86	14,68	16,91
Ácido láctico produzido	0,11	0,31	0,57	0,70
CO <sub>2</sub> produzido	4,26	10,43	16,02	16,85
Glicose assimilada	1,27	1,44	1,89	1,15
Percentual de assimilação de glicose ( % )	31,16	18,90	19,42	11,52

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado.

*Tabela XI - Dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas por 96 horas.* As células foram cultivadas por 96 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidos a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas à determinações manométricas em aparelho convencional de Warburg, a 30°C e 100 oscilações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas à baixa temperatura para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente.

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	7,27	3,66	0,75	0,13
Etanol produzido	4,17	8,99	12,88	15,16
Ácido láctico produzido	0,13	0,30	0,69	0,87
CO <sub>2</sub> produzido	3,93	8,92	15,79	17,30
Glicose assimilada	0,62	1,71	1,98	1,50
Percentual de assimilação de glicose ( % )	22,71	26,92	21,41	15,18

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado.

*Tabela XII - Dissimilação anaeróbica da glicose por células cultivadas por 120 horas.* As células foram cultivadas por 120 horas em meio de cultura contendo glicose 2%, peptona 2% e extrato de levedura 1%, submetidas a exaustão por 24 horas em KCl 0,154 M, suspensas em tampão fosfato 0,067 M, pH 5,6 e levadas à determinações manométricas em aparelho convencional de Warburg, a 30°C e 100 oscilações por minuto. O volume final do sistema foi 2,85 ml. Após a operação manométrica, as amostras foram centrifugadas à baixa temperatura para separação das células. O sobrenadante foi analisado, determinando-se etanol enzimaticamente, glicose residual e ácido láctico, colorimetricamente.

Substrato e Produtos da Dissimilação	Tempo de incubação em minutos			
	15	30	60	120
Glicose residual	6,88	3,78	1,00	0,16
Etanol produzido	5,06	10,61	15,88	16,70
Ácido láctico produzido	0,13	0,27	0,66	0,91
CO <sub>2</sub> produzido	4,07	9,16	15,90	17,46
Glicose assimilada	0,69	1,02	0,73	0,91
Percentual de assimilação de glicose ( % )	22,12	16,43	8,07	9,23

Todos os dados acima apresentados correspondem a  $\mu$ moles do produto ensaiado.

Tabela XIII - Valores F com a respectiva significância, calculados com os resultados obtidos na fermentação anaeróbica, referentes aos diversos efeitos testados para cada uma das características analisadas. Coeficientes de variação dos erros a e b.

Fontes de variação	Glicose consumida	Etanol produzido	Ácido láctico produzido	CO <sub>2</sub> formado
Tempo de cultivo (H)	7,14 ns.	4,57 ns.	7,50 ns.	0,58 ns.
Tempo de incubação (T)	538,11 <sup>+++</sup>	178,78 <sup>+++</sup>	157,46 <sup>+++</sup>	14,33 <sup>++</sup>
(H) x (T)	5,21 <sup>+</sup>	3,86 <sup>+</sup>	1,66 ns.	2,86 ns.
Excluindo 24 horas de cultivo				
Tempo de cultivo (H)	0,26 ns.	1,00 ns.	0,38 ns.	0,19 ns.
(H) x (T)	0,62 ns.	0,57 ns.	0,14 ns.	0,09 ns.
Tempos de incubação dentro dos tempos de cultivo				
24 horas	123,03 <sup>+++</sup>	69,68 <sup>+++</sup>	42,92 <sup>+++</sup>	0,76 ns.
48 horas	72,47 <sup>+++</sup>	29,73 <sup>+++</sup>	26,95 <sup>+++</sup>	2,49 ns.
72 horas	53,01 <sup>+++</sup>	28,59 <sup>+++</sup>	28,34 <sup>+++</sup>	4,02 <sup>+</sup>
96 horas	71,35 <sup>+++</sup>	34,61 <sup>+++</sup>	33,74 <sup>+++</sup>	3,51 <sup>+</sup>
120 horas	59,72 <sup>+++</sup>	31,60 <sup>+++</sup>	32,18 <sup>+++</sup>	4,70
C.V. (a)	16,70%	17,80%	19,40%	86,20%
C.V. (b)	7,90%	11,50%	14,90%	44,00%

ns. = não significativo; + = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ++ = significativo ao nível de 1% de probabilidade; +++ = significativo ao nível de 0,1% de probabilidade. Observação: Os valores F são referentes aos quadrados médios da segunda repetição. Resíduo baseado nas duas repetições.

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Durante o cultivo de *S. carlsbergensis* em meio contendo 1,6% (w/v) de glicose, cerca de 95% da fonte de carbono é consumida dentro de 12 horas de cultivo. Entretanto, o crescimento celular máximo só é atingido em tempo que varia de 24 a 48 horas de incubação (Fig. 2). Ao longo dos diferentes períodos de cultivo celular, não houve sensíveis modificações no número de células viáveis (Fig. 1).

A curva de crescimento é talvez explicada pelo consumo de parte do etanol produzido que, aliás, atinge o máximo de sua concentração no meio celular, ao ponto em que a concentração de glicose se reduz praticamente ao mínimo verificado. A partir desse ponto a concentração do etanol no meio sofre lenta mas contínua diminuição, o que sugere o seu consumo pelas células em cultivo.

Aliás, o mecanismo de oxidação de etanol por levedura de panificação, foi estudado por AGUIAR e BACILA (1970), que medindo o consumo de oxigênio por células de levedura, tendo etanol como substrato de oxidação, verificaram que apenas parte do oxigênio consumido corresponde ao  $\text{CO}_2$  que resulta do processo, enquanto que o restante é explicado por mecanismo enzimático que envolve a oxidação direta do  $\text{NADH} + \text{H}^+$  pela mitocôndria.

Alguns fatos foram já analisados por VAN RIJN e VAN WIJK (1972), com respeito ao efeito do etanol como substrato para o crescimento de *S. carlsbergensis*. Assim, a adaptação da levedura ao etanol parece ser regulada por repressão catabólica. Em meio contendo maltose e etanol, a adaptação das células para fermentar maltose é mais significativa do que para consumir etanol.

Nas condições de cultivo usadas no presente trabalho, as concentrações de glicose como fonte de carbono variaram de 1,6 a 2%.

Utilizando condição similar e concentrações de glicose de 0,6 a 2% para o cultivo de um "strain" de *S. carlsbergensis*, HOMMES (1965) verificou que a célula era capaz de exibir diferentes mecanismos de controle durante a glicólise aeróbica. Se bem que a cinética de consumo de oxigênio era quantitativamente a mesma, a dos transportadores da cadeia respiratória, com igual

concentração de citocromos, em ambas as populações de leveduras, era diferente. Assim, inibição da respiração na levedura cultivada com glicose a 0,6% era associada com a redução dos transportadores que, segundo HOMMES, pode ser identificada com os estados 3 - 4 de transição, como foi observado na mitocôndria isolada por CHANCE e WILLIAMS (1956).

ESTABROOK et al (1964) já haviam observado a redução do citocromo b na fase inibida da respiração. Por esses fatos, HOMMES (1965) concluía que o controle operativo durante o "efeito Crabree" é principalmente via fosfato ou acceptor de fosfato, pois é nessas condições que o estado 3 - 4 de transição é observado na mitocôndria isolada.

Por outro lado, a fase inibida da respiração com leveduras cultivadas com glicose a 2% foi associada por HOMMES (1965) com oxidação dos transportadores, exatamente ao contrário do que ocorreria em cultivos com glicose a 0,6%, fato que teria origem num ponto de controle da via glicolítica, apesar de que um controle de fosfato ou de acceptor de fosfato precede à fase inibida da respiração.

As diferenças respiratórias entre leveduras cultivadas com baixas e com altas concentrações de glicose foram explicadas ainda por TUSTANOFF e BARTLEY (1964), em termos de uma inibição exercida pela glicose, de síntese de lipoproteínas, fato que poderia influir sobre o conteúdo lipídico das estruturas mitocondriais, segundo observação de LINNANE (1965).

A atividade respiratória da levedura cultivada por 24 horas foi sempre muito baixa, ao longo de todo o período de incubação. Decorridos 15 minutos da adição do substrato, verificou-se que 17% da glicose havia sido consumida, sem ter sido notado, entretanto, qualquer consumo de oxigênio. Foi encontrado, porém, formação de etanol, pondo em evidência a ocorrência de fermentação aeróbica. Foi verificada, nesse período, uma elevada taxa de assimilação, da ordem de 62% da glicose consumida. Após 30 minutos, 30% da glicose adicionada desapareceu do meio, tendo sido encontrado quantidades praticamente equimolares de etanol e  $CO_2$  e uma taxa de assimilação de cerca de 50% da glicose consumida. Não houve consumo de oxigênio durante o citado período. Em torno da primeira hora, foi iniciada fraca atividade oxidativa, quando praticamente 2/3 da glicose já

havia sido consumida fermentativamente. Ao final do experimento, 120 minutos após a adição do substrato, quase toda a glicose já havia sido consumida e a quantidade de  $\text{CO}_2$  liberada foi cerca de duas vezes a quantidade de etanol encontrada no meio. O total de oxigênio consumido atingiu apenas 1,20  $\mu\text{moles}$ , demonstrando sua baixa capacidade oxidativa e a taxa de assimilação da glicose declinou vagarosamente com o decorrer do tempo de incubação. A medida de ácido láctico formado foi também verificada e os dados mostram que sua produção foi sempre bastante reduzida. Com células cultivadas por 24 horas, os produtos formados pela dissimilação aeróbica da glicose foram sendo acumulados, lenta e gradativamente, pelo menos até o momento considerado como final do ensaio.

As células com 48 horas de cultivo, mostraram comportamento metabólico consideravelmente distinto das células de culturas com 24 horas, sendo que o consumo do substrato ocorreu muito mais rapidamente durante o período de incubação. Foi verificado que, após 15 minutos da adição do substrato, cerca de 50% da glicose adicionada ao meio havia sido consumida, enquanto em células mais "jovens", esse consumo foi da ordem de 17%. Nítida fermentação aeróbica ocorreu nesse período, tendo sido encontrado etanol e  $\text{CO}_2$  em quantidades iguais, e uma taxa de assimilação oxidativa correspondente a 61% da glicose adicionada. Houve indícios de que se iniciara baixa atividade respiratória. Após 30 minutos de incubação, 75% da glicose já havia sido consumida, ao passo que em células cultivadas por 24 horas essas cifras atingiram somente cerca de 30%. Todavia, a razão percentual de assimilação durante os primeiros 30 minutos foi bastante próxima para ambos os tempos de cultivo. O consumo de oxigênio permaneceu baixo, não ultrapassando 1  $\mu\text{mol}$ , embora a quantidade de  $\text{CO}_2$  liberada fosse quase 1,5 vezes maior que o etanol encontrado no meio. Decorridos 60 minutos de incubação, restava no meio apenas 7,5% de glicose residual, comparados a 35% em células com 24 horas de cultivo. A capacidade de assimilar oxidativamente diminuiu para cerca de 39% enquanto em células mais "jovens", esse valor foi em torno de 46%. O  $\text{CO}_2$  liberado foi mais que o dobro da quantidade de etanol encontrada, tendo sido o oxigênio utilizado, quase 4 vezes a quantidade consumida aos 30 minutos. A medida de etanol revelou que houve produção



crecente de álcool etílico, até 60 minutos de incubação, enquanto houve quantidades ponderáveis de glicose no meio, caindo levemente até o final do ensaio, inversamente ao que aconteceu com a utilização de oxigênio. O consumo de oxigênio manteve-se baixo enquanto houve glicose no meio, aumentando, de modo considerável, após praticamente toda a depleção da glicose. A medida de ácido láctico produzido revelou que este produto se forma em baixas concentrações e que, como o etanol, aumenta até os 60 minutos, decrescendo a seguir lentamente.

As células com 72 horas de cultivo revelaram um comportamento metabólico similar às células cultivadas por 48 horas.

As análises do consumo de glicose, nas alíquotas retiradas após 15, 30, 60 e 120 minutos de incubação, mostraram resultados muito semelhantes aos obtidos com células com 48 horas de cultivo, ou seja, ao redor de 50, 72, 95 e 97% de consumo, respectivamente. A liberação de  $\text{CO}_2$  e o etanol encontrado guardam praticamente as mesmas proporções do ensaio anterior. Pôde-se notar algumas diferenças na taxa de assimilação oxidativa, onde ocorreu um decréscimo da ordem de 6,5%, em relação ao ensaio com leveduras cultivadas por 48 horas, após 15 minutos de incubação.

O comportamento metabólico das células cultivadas por 96 e 120 horas foi muito semelhante ao verificado para células com menos tempo de cultivo, isto é, 48 e 72 horas, havendo entre tanto indícios de que a intensidade de consumo de glicose durante os 15 minutos iniciais de incubação decresce, embora a taxas reduzidas. Paralelamente, ocorreu também decréscimo da taxa de assimilação oxidativa, da ordem de 7%, aos 15 minutos de incubação, em relação as células cultivadas por 72 horas.

Observando-se a taxa de consumo de oxigênio, ao longo do tempo de cultivo, foi possível notar-se pequeno acréscimo na intensidade de consumo até 72 horas de cultivo, após o que ocorreu um ligeiro declínio até 120 horas.

Estudando-se os valores  $F$ , obtidos na análise da variância dos resultados da respiração por células de *S. carlsbergensis*, pode-se concluir que há uma marcante diferença no metabolismo oxidativo das células, devido ao efeito do tempo de cultivo, os quais variaram de 24 a 120 horas. Glicose e oxigênio consumidos e  $\text{CO}_2$  liberado forneceram valores  $F$  significativos ao nível de 0,1% de probabilidade. Etanol produzido mostrou significân -

cia ao nível de 5% de probabilidade. Ácido láctico não foi significativo em relação ao tempo de cultivo, ou seja, as diferenças havidas na formação de ácido láctico não podem ser atribuídas, seguramente, à idade das leveduras, embora haja indicações que tal produto se forma gradativamente, acumulando no meio de reação até o final do ensaio, com células cultivadas por 24 horas, e, acumulando até 60 minutos de incubação, decrescendo lentamente até o fim do ensaio, com células de 48 a 120 horas de cultivo.

As diferenças ocorridas entre as amostras devido ao tempo de incubação foram sempre altamente significativas, ao nível de 0,1% de probabilidade, para todas as características ensaiadas.

A interação entre tempo de cultivo e tempo de incubação revelou que para os fatores estudados, existe pronunciada influência do tempo de cultivo sobre o tempo de incubação.

A exclusão dos dados referentes ao cultivo por 24 horas, revelou que o comportamento das células cultivadas por 48 a 120 horas mostrou-se muito semelhante, sendo as diferenças não significativas para todos os fatores analisados, exceto oxigênio consumido que foi significativo ao nível de 5% de probabilidade e que as diferenças evidenciadas na análise anterior eram devidas ao comportamento das células cultivadas por 24 horas.

A interação entre tempo de cultivo e tempo de incubação revelou que somente para ácido láctico produzido e oxigênio consumido houve influência dos tempos de cultivo sobre os tempos de incubação.

As diferenças havidas entre as amostras devido ao efeito do tempo de incubação dentro de cada tempo de cultivo, foram sempre muito distintas, sendo significativas ao nível de 0,1% de probabilidade, praticamente para todos os fatores e tempos de cultivo analisados, como pode ser visto na Tabela VII.

Os coeficientes de variação obtidos para cada fator analisado podem ser considerados normais, sendo muito elevado apenas para o ácido láctico.

As medidas da fermentação anaeróbica de glicose por *S. carlsbergensis* cultivada durante 24 a 120 horas, foram analisadas do mesmo modo que a respiração, em termos de glicose residual, etanol, ácido láctico e CO<sub>2</sub> produzidos.

As células cultivadas aerobicamente por 24 horas, em condições similares aos ensaios de respiração, quando em completa anaerobiose, mostraram um padrão de fermentação onde a glicose foi consumida quase linearmente, pelo menos durante a primeira hora de ensaio, ao mesmo tempo que se formava etanol e  $\text{CO}_2$  em quantidades aproximadamente iguais, também linearmente. Comparativamente, a velocidade de consumo de glicose durante a fermentação não diferiu muito daquela observada durante a respiração, embora a capacidade de assimilar fermentativamente fosse sempre muito menor. O ácido láctico produzido pelas células foi acumulado gradativamente no meio de reação e ainda que sua quantidade fosse bastante pequena, foi sempre maior que a encontrada quando se processou a respiração.

As células cultivadas por 48 horas mostraram maior intensidade de consumo de glicose, sendo quase o dobro a quantidade de açúcar consumido durante os 30 minutos iniciais de ensaio, em relação às células com 24 horas de cultivo. Mesma observação pode ser feita para etanol e  $\text{CO}_2$  produzidos.

As células cultivadas por 72, 96 e 120 horas mostraram comportamento consideravelmente semelhante às células de 48 horas, embora haja indícios de que o consumo de glicose ao longo do tempo de cultivo tenha sido intensificado até 72 horas, declinando ligeiramente até 120 horas de cultivo.

Consideráveis diferenças foram notadas, ao longo do tempo de cultivo, no que diz respeito à taxa de assimilação fermentativa, o qual será abordado mais adiante.

Estudando-se os valores  $F$  obtidos pela análise da variância dos resultados colhidos durante a fermentação da glicose (Tabela XIII), pôde-se verificar que nenhum dos fatores ensaiados mostrou-se significativo devido ao efeito dos tempos de cultivo, embora haja indicações da diferença de consumo de glicose entre células cultivadas por 24 e 48 horas. Aliás, a interação entre tempo de cultivo e tempo de incubação mostrou que a glicose consumida foi significativa ao nível de 1% de probabilidade, e etanol ao nível de 5% de probabilidade, indicando, portanto, influência dos tempos de cultivo sobre os tempos de incubação.

A exclusão dos resultados obtidos com células de 24 horas, mostrou que para os tempos de 48 a 120 horas, todos os fatores ensaiados não foram significativos nem para o efeito do tem

po de cultivo, nem para a interação tempo de cultivo e tempo de incubação, indicando que os produtos da dissimilação fermentativa da glicose são identicamente formados ao longo do citado período e que as diferenças mostradas na análise anterior devem-se ao comportamento das células com 24 horas de cultivo.

As diferenças havidas entre as amostras devido ao efeito do tempo de incubação foram sempre altamente significativas, ao nível de 0,1%, de probabilidade.

Os coeficientes de variação, para cada fator, foram considerados normais, excetuando-se o coeficiente de variação encontrando para ácido lático.

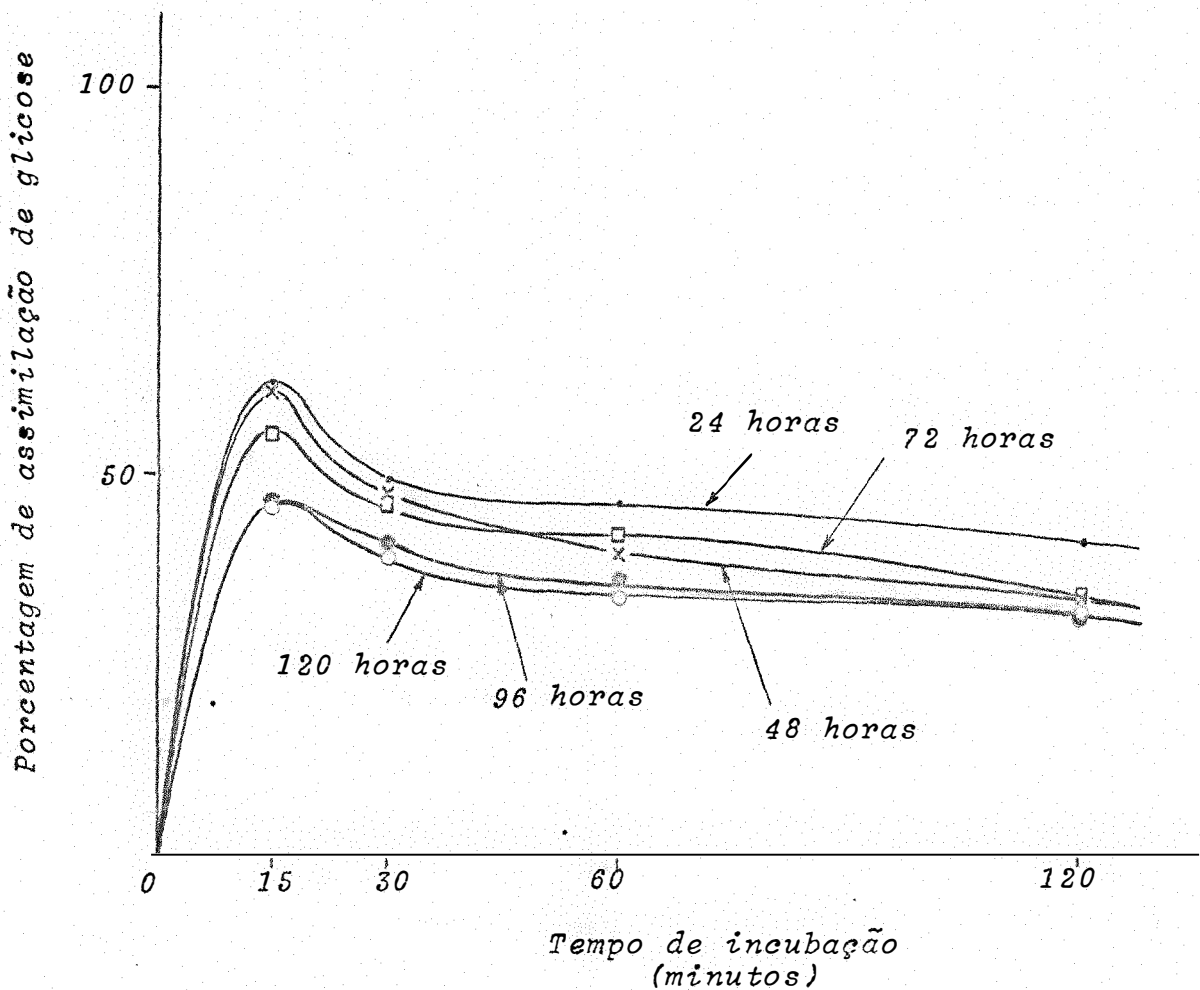


Figura 15 -Perfis da dissimilação aeróbica da glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* IZ - 1831, cultivada em tempos que variaram de 24 a 120 horas. As condições experimentais que levaram à obtenção dos dados mostrados na presente Figura, correspondem aos das Tabelas II a VI.

Uma das mais importantes características desenvolvidas pelo "strain" de *S. carlsbergensis* aqui estudado, diz respeito à propriedade que exibe quanto à assimilação oxidativa e à assimilação fermentativa da glicose durante o período de incubação, ao longo das experiências manométricas relatadas.

Ao analisar os dados relativos ao percentual de glicose metabolizada e de glicose incorporada como material celular, tanto durante a glicólise aeróbica como durante a atividade fermentativa da levedura (Fig. 15 e 16), verifica-se que, em respiração, as células cultivadas por 24 a 120 horas possuem elevada atividade assimilatória, já que da glicose do meio que é consumida pela célula, de 48 a 62% são incorporadas como material celular, quando as medidas são levadas a efeito aos 15 minutos do início da experiência, sendo os valores mais altos da atividade assimilatória, correspondentes às células mais "jovens". Após os 15 minutos iniciais de incubação, a assimilação oxidativa ainda se mantém considerável, diminuindo, porém, gradativamente, ao longo do tempo de experiência.

Por outro lado, quando as células são submetidas a condições anaeróbicas, próprias da fermentação alcoólica, ainda assim, levam a efeito razoável atividade de assimilação fermentativa.

Células cultivadas durante 24 horas, comportam-se de modo muito distinto em relação às cultivadas por tempo mais prolongado, já que exibem atividade fermentativa muito mais pronunciada que as demais. Assim, aos 15 minutos de incubação, do total da glicose removida do meio, apenas 8,5% é incorporada por assimilação fermentativa, enquanto que 91,5% é fermentada a etanol e  $\text{CO}_2$ . As células cultivadas por 48 horas, por sua vez, fermentaram apenas 70% da glicose tomada ao meio, incorporando, na forma de material celular, 30%.

Analisando os valores encontrados, verifica-se que a população de células de 24 horas de cultivo e a de 48 horas, foram utilizadas em condições perfeitamente comparáveis quanto ao peso total de nitrogênio. Nessas condições, a de 24 horas retirou do meio de reação, 2,37  $\mu\text{moles}$  de glicose por mg de nitrogênio total, em 15 minutos, enquanto que a população de 48 horas, retinha 6,75  $\mu\text{moles}$ , cerca de 2,66 vezes mais, portanto. Por sua vez, as células de 24 horas fermentaram 91,5% da glicose retira

da do meio celular, enquanto que a de 48 horas fermentou apenas 70%. Em termos absolutos, porém, a célula de 48 horas produz, em 15 minutos, mais etanol que a de 24 horas, retendo entretanto mais material fermentescível, na forma de glicose, do que a de 24 horas.

Além dos aspectos econômicos que esse problema pode envolver, o fato em si, é sem dúvida de interesse bioquímico, considerando-se os padrões metabólicos distintos exibidos por ambas populações de células. Aliás, células cultivadas por 72 horas, exibem padrões metabólicos perfeitamente comparáveis com os de 48 horas.

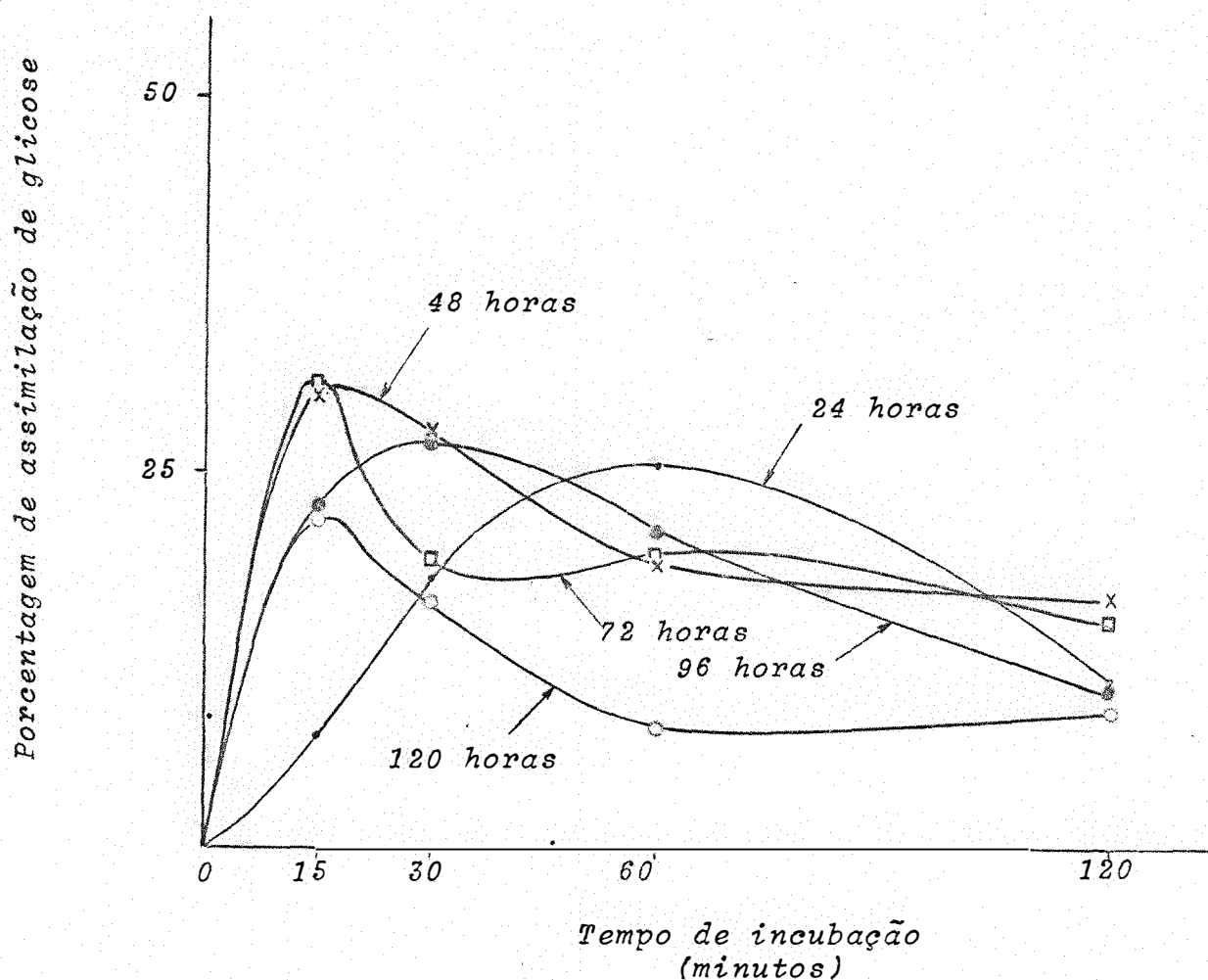


Figura 16 - Perfis da dissimilação anaeróbica da glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* IZ-1831, cultivada em tempos que variaram de 24 a 120 horas. As condições experimentais que levaram à obtenção dos dados mostrados na presente Figura corresponde aos das Tabelas VIII a XII.

Merece análise especial, o comportamento metabólico de células "jovens", isto é, cultivadas por 24 horas e de células "velhas", ou seja, cultivadas por 120 horas (Fig. 16). Verifica-se assim, aos 15 minutos de incubação, que o consumo de glicose é da ordem de 1,31 a 3,12  $\mu$ moles de glicose, com assimilação fermentativa de 8,27 e 22,12%, respectivamente, para células de 24 a 120 horas. Já, aos 60 minutos, o consumo de glicose é de 7,17 e 9,00  $\mu$ moles, para células de 24 a 120 horas, respectivamente, mas o índice percentual de assimilação fermentativa se inverte, já que as células "jovens" assimilaram 22,55% da glicose consumida, enquanto que as células "velhas" assimilaram apenas 8,06%. Aos 120 minutos de incubação, o nível de consumo de glicose é equivalente para ambas as populações de células, com resultado global de 12,16% de assimilação para células "jovens" e 9,23% para as "velhas". Assim, as células "velhas" se mostraram com maior capacidade fermentativa que as "jovens", as quais, entretanto, se mostram altamente eficientes como produtoras de álcool etílico no início do processo de dissimilação da glicose. É interessante notar, ainda, que as células de 24 horas de cultivo incrementam sua atividade assimilatória, quando em fermentação, até os 60 minutos de experiência, voltando depois a intensificar o seu trabalho fermentativo até 120 minutos, o que sugere a possibilidade de que parte ponderável da glicose incorporada ao material celular, fermentativamente, até os 60 minutos de experiência, seja degradada a seguir, já que no cálculo global efetuado aos 120 minutos, apenas cerca de 12,16% do total da glicose consumida, havia permanecido como material celular, sofrendo o restante, fermentação.

Os níveis de ácido láctico encontrados no meio de reação não são ponderáveis, tanto em células respirantes como nas que foram estudadas em fermentação alcoólica, se bem que nesta última situação sempre houve maior produção da substância. Entretanto, quando se estabelece relação molar entre etanol e ácido láctico produzidos, aos 120 minutos de experiência (Tabela XIV), verifica-se que a não ser para o caso das células cultivadas durante 24 horas, os valores numéricos são da ordem de 40 moléculas de etanol para 1 de ácido láctico formados em respiração e cerca de 20 de etanol para 1 de ácido láctico, em fermentação. Esse fato aparentemente contraditório, pode ser, entretanto, ex

plicado em termos de utilização do ácido láctico formado durante a respiração, possivelmente pelos mecanismos de gliconeogênese celular.

*Tabela XIV -Relação molar entre etanol e ácido láctico produzidos durante a atividade metabólica de Saccharomyces carlsbergensis.*

Tempo de cultivo (horas)	Condição da experiência	Etanol ( $\mu$ moles)	Ác. Láctico ( $\mu$ moles)	Relação molar entre Etanol e Ácido Láctico
24	Respiração	7,99	0,18	44
	Fermentação	18,01	0,34	53
48	Respiração	6,59	0,15	44
	Fermentação	15,76	0,86	18
72	Respiração	6,67	0,15	44
	Fermentação	16,91	0,70	24
96	Respiração	6,50	0,21	31
	Fermentação	15,16	0,87	17
120	Respiração	6,74	0,16	42
	Fermentação	16,70	0,91	18

Os valores indicados referem-se ao total de etanol e de ácido láctico formados nas condições das experiências mostradas nas Tabelas II a VI e VIII a XII.

As células de 24 horas, nesse particular, se comportam ainda como melhores fermentadores, já que mostram relação molar entre ácido láctico e etanol, da ordem de 53 moléculas de etanol produzidas para 1 de ácido láctico, o que em termos de fermentação alcoólica revela padrão metabólico de muito maior eficiência do que o mostrado pelas demais células. É necessário ponderar, entretanto, que os altos coeficientes de variação encontrados para ácido láctico e os valores F, estatisticamente pouco ou não significativos, não impedem que as considerações formuladas deixem de ser feitas.



## 6. CONCLUSÕES

Do presente trabalho podem ser tiradas as seguintes conclusões:

1. A determinação do número de células viáveis de *Saccharomyces carlsbergensis* IZ-1831, cultivadas na presença de glicose mostrou que elas se mantêm em percentual similar ao longo dos cultivos de 24 a 120 horas.

2. Até 12 horas de cultivo, cerca de 95,0% da glicose do meio é consumida mas o máximo de crescimento celular é atingido entre 24 e 48 horas. Nessas mesmas condições, o máximo de etanol produzido ocorre entre 12 a 24 horas de cultivo.

3. A partir de 24 horas de cultivo, a concentração de etanol presente no meio começa a decrescer, acentuando-se, tal fato, entre 96 e 120 horas de cultivo.

4. Células em respiração perfazem intensa assimilação oxidativa. Aos 15 minutos de atividade respiratória, cerca de 62,0% do total da glicose consumida é incorporada como material celular, em populações com 24 horas de cultivo. A atividade assimilatória continua bastante significativa ao longo de 120 minutos de incubação, decrescendo em intensidade, entretanto, a partir de 15 minutos da experiência.

5. A capacidade de assimilação oxidativa diminui na dependência direta da idade do cultivo, já que, populações de células de 48 a 120 horas vão gradativamente perdendo tal capacidade, em relação ao que acontece com células de 24 horas.

6. Na dissimilação anaeróbica da glicose, células com 24 horas de cultivo apresentam elevado grau de capacidade fermentativa, uma vez que dissimilam a álcool etílico cerca de 91,5% da glicose consumida do meio de reação, nos primeiros 15 minutos de incubação.

7. A capacidade de células, com 24 horas de cultivo, de assimilar fermentativamente, aumenta até 60 minutos ao longo do período de incubação, decrescendo logo a seguir quando a população de células ativa seu processo de fermentação alcoólica.

8. Em células com 48 a 72 horas de cultivo, a capaci-

dade de consumir glicose do meio, nos 15 minutos iniciais é -  
cerca de 2,7 vezes maior que a das células com 24 horas de cultiv  
vo, assimilando fermentativamente, porém, cerca de 30% da glicos  
se consumida.

9. Comparando-se a atividade fermentativa das células "jovens" (24 horas de cultivo) e células "velhas" (120 horas de cultivo), verifica-se que ambas apresentam padrões metabólicos nitidamente distintos, já que aos 15 minutos de incubação, as células "jovens" mostram-se altamente fermentativas, aumentando - sua capacidade de assimilar glicose até aos 60 minutos de incubação. As células "velhas", por sua vez, aos 15 minutos de incubação, mostram-se com grande capacidade assimilativa, tornando-se altamente fermentativas aos 60 minutos de incubação.

## 7. SUMÁRIO

Estudo comparativo do metabolismo aeróbico e anaeróbico de glicose por *Saccharomyces carlsbergensis* IZ-1831, foi efetuado com células em estado não proliferante, ao longo do tempo de cultivo que variou de 24 a 120 horas.

Foi observado que o número de células viáveis manteve percentual similar durante todo o período de cultivo em estudo. Cerca de 95,0% da glicose do meio foi consumida durante as primeiras 12 horas e o máximo de crescimento celular foi atingido entre 24 e 48 horas de cultivo. A máxima produção de etanol ocorreu entre 12 e 24 horas de cultivo e sua concentração decresceu ao longo do período de cultivo, acentuando-se de 96 a 120 horas.

Células em respiração promoveram intensa assimilação oxidativa, sendo que cerca de 62% do total da glicose consumida foi incorporada como material celular, após 15 minutos de incubação. A capacidade de assimilação oxidativa diminuiu na dependência direta da idade da cultura, uma vez que, células com 48 a 120 horas vão gradativamente diminuindo tal capacidade, em relação as de 24 horas. Células com 24 horas de cultivo metabolizaram anaerobicamente a glicose, apresentando elevada capacidade fermentativa, dissimilando a etanol cerca de 91,5% da glicose consumida durante os 15 minutos iniciais de ensaio. A capacidade de assimilação fermentativa, em populações com 24 horas de cultivo, aumentou até 60 minutos ao longo do período de incubação, decrescendo a seguir. Em células com 48 a 72 horas de cultivo, após 15 minutos de incubação, a capacidade de consumo de glicose do meio foi 2,7 vezes maior do que em células com 24 horas, tendo assimilado fermentativamente, porém cerca de 30% da glicose consumida.

Células "jovens", com 24 horas de cultivo, e células "velhas", com 120 horas de cultivo, apresentaram padrões metabólicos distintos. Células "jovens", após 15 minutos de incubação, apresentaram-se altamente fermentativas, aumentando sua capacidade de assimilar glicose até 60 minutos de incubação, enquanto células "velhas" mostraram grande capacidade assimilativa aos 15 minutos, tornando-se altamente fermentativas aos 60 minutos de incubação.

## 8. SUMMARY

A comparative study of the aerobic and anaerobic metabolism of glucose by *Saccharomyces carlsbergensis* (IZ-1831) was carried out with nonproliferating cells during a growth period which varied from 24 to 120 hours.

It was observed that the percentage values of viable cells were much the same through the whole growth period. The maximum cell growth was reached after 24 up to 48 hours of incubation. However, 95.0% of glucose was consumed within the first 12 hours. The most significant ethanol yield occurred after 12-24 hours of growth and its concentration slowly decreased later, mainly after 96 hours of the growth period. About 62.0% of the total glucose consumed were incorporated as cellular material after 15 min. of incubation, by the cells grown for 24 hours. This assimilation activity decreased during the incubation period. The oxidative assimilation was observed to depend on the age of the cultures, since cells grown from 48 to 120 hours showed slow rates of assimilation as compared to those obtained with cells developed for 24 hours. Cells grown for 24 hours showed a high fermentative capacity by dissimilating, anaerobically, 91.5% of glucose to ethanol, during the first 15 min. of incubation. The fermentative capacity in cultures developed for 24 hours increased up to 60 min., decreasing afterwards. With cells developed for 48 to 72 hours, the utilization capacity of glucose was 2.7 times higher than those cells developed for 24 hours, however they assimilated by fermentation about 30% of the glucose utilized, during the first 15 min. of incubation. Cells developed for 24 hours and cells developed for 120 hours showed distinct metabolic patterns. The "young" cells, after 15 min. of incubation, showed high fermentative activity increasing their glucose assimilation capacity up to 60 min. of incubation, while the "old" cells showed high assimilation capacity at 15 min. of incubation and a high fermentative activity at 60 min. of incubation.

## 9. LITERATURA CITADA

- AGUIAR, M.E. & BACILA, M. Vias de oxidação do etanol pela levedura de panificação. Resumos da XXII Reunião Anual da Soc. Bras. Progr. Ciências, Salvador, 1970. Seção P ( P-200), p. 400.
- AUBERT, J.P. & MILHAUD, G. Étude du métabolisme de la levure de boulangerie a l'aide de glucose et d'éthanol radioactifs. Annls Inst. Pasteur, Paris 90: 320-332, 1956.
- BACILA, M. Curso de Fisiologia de Microorganismos. Curitiba, 1960, Universidade do Paraná, vol. 2, 209 p.
- BACILA, M. Interrelações e regulação da atividade metabólica. In VILLELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. Bioquímica. Rio de Janeiro, 1966, Guanabara-Koogan, p. 663-672.
- BETZ, A. Metabolic flux in yeast cells with oscillatory controlled glycolysis. Physiol. Plant. 19: 1049-1054, 1966.
- BETZ, A. & CHANCE, B. Influence of inhibitors and temperature on the oscillation of reduced pyridine nucleotides in yeast cells. Archs Biochem. Biophys. 109: 579-584, 1965
- BRADY, T.G.; MCGANN, C. & TULLY, E. Initiation of fermentation in baker's yeast cells by removal of oxygen. Biochem. J. 64: 44p., 1956.
- BRINK, N.G.; BONNICHSEN, R. & THEORELL, H. A modified method for enzymic microdetermination of ethanol. Acta pharmac. - tox. 10: 223-236, 1954.
- CAMARGO, R. Ecologia das leveduras, In I Sem. Ferm. Alcoólica. Piracicaba, Inst. Zimotécnico, 1966. Vol. 1, p. 58-67.
- CARDOSO, C.O.N. Accumulation of phenols and phytoalexins in hypocotyls of bean infected with *Fusarium solani f. phaseoli* (Burk) Snyder and Hans. PhD. Thesis. The Ohio State University, 1971, 100 p.

- CHANCE, B.; SCHOENER, B. & ELSAESSER, S. Metabolic control phenomena involved in damped sinusoidal oscillations of reduced diphosphopyridine nucleotide in a cell-free extract of *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Biol. Chem. 240 (7): 3170-3181, 1965.
- CHANCE, B. & WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Advances in Enzymology 17: 65-134, 1956.
- CHESTER, V.E. Endogenous metabolism of freshly harvested cells of a brewer's yeast. Nature, Lond. 183; 902-903, 1959a.
- CHESTER, V.E. Effect of oxygen on endogenous metabolism of a respiratory-efficient brewer's yeast. Nature, Lond. 184, Suppl. 25: 1956-1957, 1959b.
- CHESTER, V.E. The dissimilation of the carbohydrate reserves of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 86: 153-160, 1963.
- CRABTREE, H.G. Observation on the carbohydrate metabolism of tumors. Biochem. J. 23: 536-545, 1929.
- DE DEKEN, R.H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. J. gen. Microbiol. 44: 149-156, 1966.
- EATON, N.R. Endogenous respiration of yeast. I. The endogenous substrate. Archs Biochem. Biophys. 88: 17-25, 1960.
- EATON, N.R. & KLEIN, H.P. The oxidation of glucose and acetate by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact. 68: 110-116, 1954.
- EATON, N.R. & KLEIN, H.P. Aerobic degradation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 67: 373-81, 1957.
- EPHRUSSI, B.; SLONIMSKI, P.P.; YOTSUYANAGI, Y. & TAVLITZKI, J. Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aerobie. C. r. Trav. Lab. - Carlsberg, sér. physiol. 26 (6): 87-102, 1956.

- ESTABROOK, R.W.; MAITRA, P.K. & CHANCE, B. Symp. Mech. Cell. Regulation Bacteria, 1964 C.N.R.S. Paris. Apud HOMMES, F.A. Metabolic control Mechanisms in yeast grown with different glucose concentrations. Archs Biochem. Biophys. 109: 168-172, 1965.
- FALES, F.W. Assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. J. biol. Chem. 193: 112-124, 1951.
- FALES, F.W. Aerobic assimilation of glucose by yeast cells. J. biol. Chem. 235: 1255-1257, 1960.
- FALES, F.W. & BAUMBERGER, J.P. The anaerobic assimilation of glucose by yeast cells. J. biol. Chem. 173: 1-8, 1948.
- GHOSH, A.K.; CHANCE, B. & PYE, E.K. Metabolic coupling and synchronization of NADH oscillations in yeast cell populations. Archs Biochem. Biophys. 145: 319-331, 1971.
- GÖRTS, C.P.M. effect of different carbon sources on the regulation of carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek. 33: 451-463, 1967.
- HABOUCHA, J. & MASSCHELEIN, CH.A. Étude d'une déficience respiratoire chez *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochem. Biophys. Acta. 38: 1-11, 1960.
- HESS, B. & BOITEUX, A. Mechanism of glycolytic oscillation in yeast. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349: 1567-1574, 1968.
- HOMMES, F.A. Metabolic control mechanisms in yeast grown with different glucose concentrations. Archs Biochem. Biophys. 109: 168-172, 1965.
- HOMMES, F.A. Mechanism of the Crabtree effect in yeast grown with different glucose concentrations. Archs Biochem. Biophys. 113: 324-330, 1966.

- KLEIN, H.P. Synthesis of lipids in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact. 69: 620-627, 1955
- LEMOIGNE, M.; AUBERT, J.P. & MILLET, J. La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulangerie cultivée en aérobiose. Annls Inst. Pasteur, Paris 87: 427-439, 1954.
- LINNANE, A.W. Apud HOMMES, F.A. Metabolic control mechanisms in yeast grown with different glucose concentrations. Archs Biochem. Biophys. 109: 168-172, 1965.
- LUNDIN, H. The influence of oxygen on the assimilatory and dissimilatory activity of yeast. Biochem. Z. 141: 310-369, 1923. Apud Chem. Abstr. 18 (2): 1684, 1924.
- MEYERHOF, O. Effect of oxygen on the alcoholic fermentation of yeast. Biochem. Z. 162: 43-86, 1925. Apud Chem. Abstr. 20: 1817, 1925.
- MEYERHOF, O. & SCHULZ, W. Determination of hexoses by fermentation. Biochem. Z. 287: 206-211, 1936. Apud Chem. Abstr. 31 (1): 70, 1937.
- NEDER, R.N. Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana. Tese de Doutorado. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz", 1957, 79 p.
- NEISH, A.C. Analytical methods for bacterial fermentations. National Research Council of Canada. Report n° 46-8-3. 2nd. ed., 1952. p. 42-43.
- NOVELLI, G.D. & LIPMANN, F. The catalytic function of coenzyme A in citric acid synthesis. J. biol. Chem. 182: 213-228, 1950.
- OPERTI, M.S. & PANEK, A.D. Trehalose phosphate and trehalose metabolism in brewer's yeast. Ciênc. Cult., São Paulo, 20 (4): 747-754, 1968.



- PANEK, A. Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Archs Biochem. Biophys. 98: 349-355, 1962.
- PANEK, A. Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Archs Biochem. Biophys. 100: 422-425, 1963.
- POLAKIS, E.S. & BARTLEY, W. Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. Biochem. J. 97: 284-297, 1965.
- POLAKIS, E.S.; BARTLEY, W. & MEEK, G.A. Changes in the structure and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environment. Biochem. J. 90: 369-374, 1964.
- POLAKIS, E.S.; BARTLEY, W. & MEEK, G.A. Changes in the activity of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeast on different carbon sources. Biochem. J. 97: 298-302, 1965.
- SHEHATA, A.M. El-Tabey Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. Appl. Microbiol. 8: 73-75, 1960.
- SLONIMSKI, P.P. Action de l'acriflavine sur les levures. Annls Inst. Pasteur, Paris, 76: 510-530, 1949.
- SLONIMSKI, P.P. Adaptation respiratoire: développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. Brussels. Proc. 3rd. Intern. Congr. Biochem. 1956, p. 242-252.
- SPIEGELMAN, S. & NOZAWA, M. On the inability of intact yeast cells to ferment their carbohydrate reserves. Archs Biochem. Biophys. 6: 303-322, 1945.
- STEEL, R.G.O. & TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. New York, McGraw Hill, 1960. 481 p.
- STICKLAND, L.H. Endogenous respiration and polysaccharide reserves in baker's yeast. Biochem. J. 64: 498-503, 1956.

- STIER, T.J.B. & STANNARD, J.N. A kinetic analysis of the endogenous respiration of baker's yeast. J. gen. Physiol. 19: 461-477, 1936a.
- STIER, T.J.B. & STANNARD, J.N. The metabolic systems involved in dissimilation of carbohydrate reserves in yeast. J. gen. Physiol. 19: 479-494, 1936b.
- SWANSON, W.H. & CLIFTON, C.E. Growth and assimilation in cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bact. 56 (1): 115-124, 1948.
- TASTALDI, H. Práticas de bioquímica, 7<sup>a</sup> ed. São Paulo, Gremio - Politécnico, 1965. Vol. 2, p. 328-332.
- TUSTANOFF, E.R. & BARTLEY, W. The effect of glucose on the development of respiration by anaerobically grown yeast. Can. J. Biochem. 42 (5): 651-665, 1964.
- UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. Manometric techniques and related methods for the study of tissue metabolism. Minneapolis, Burgees, 1959, 338 p.
- VALSECHI, O. Aguardente de cana-de-açúcar. São Paulo. Ed. Ceres, 1960. 116 p.
- VAN NIEL, C.B. & ANDERSON, E.H. Fermentative assimilation. J. cell. comp. Physiol. 17: 49-56, 1941.
- VAN RIJN, J. & VAN WIJK, R. Differential sensitivities of the two malate dehydrogenases and the maltose permease to the effect of glucose in *Saccharomyces carlsbergensis*. J. Bact. 110 (2): 477-484, 1972.
- WINZLER, J.R. & BAUMBERGER, J.P. Degradation of energy in the metabolism of yeast cells. J. cell. comp. Physiol. 12: 183-211, 1938.

YOTSUYANAGI, Y. Études sur le condriome de la levure. I. Va  
riations de l'ultrastructure de condriome au cours de la croiss  
sance aérobie. J. Ultrastruct. Res. 7: 121-140, 1962.

A P E N D I C E

Tabela XV - Glicose consumida durante a dissimilação aeróbica da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
24	15	1,96	1,51	1,64	1,70
	30	2,93	3,57	2,54	3,01
	60	6,70	7,89	5,03	6,54
	120	9,23	9,18	9,48	9,29
48	15	4,37	5,46	5,76	5,20
	30	6,54	7,89	8,00	7,47
	60	8,74	9,37	9,63	9,25
	120	9,29	9,48	9,74	9,50
72	15	4,74	4,97	5,46	5,06
	30	6,93	7,03	7,65	7,20
	60	9,18	9,35	9,83	9,45
	120	9,39	9,69	9,97	9,68
96	15	4,36	3,48	5,00	4,28
	30	6,36	7,05	7,67	7,03
	60	8,69	9,34	9,45	9,16
	120	9,12	9,65	9,62	9,46
120	15	4,57	--	4,07	4,32
	30	6,26	--	7,14	6,70
	60	8,92	--	9,22	9,07
	120	9,31	--	9,68	9,49

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de glicose.

Tabela XVI- Etanol produzido durante a dissimilação aeróbica da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições			Média
		1ª	2ª	3ª	
24	15	1,73	1,82	0,94	1,50
	30	3,00	3,97	1,76	2,91
	60	7,16	6,52	4,58	6,09
	120	8,80	7,81	7,37	7,99
48	15	3,52	4,58	3,70	3,93
	30	6,25	6,90	6,08	6,41
	60	7,78	8,25	7,25	7,76
	120	6,95	6,22	6,61	6,59
72	15	4,61	4,82	4,82	4,75
	30	5,84	6,14	6,31	6,10
	60	7,31	7,10	7,63	7,35
	120	6,32	6,64	7,05	6,67
96	15	4,38	4,79	5,02	4,73
	30	6,26	6,72	7,75	6,91
	60	8,42	7,80	8,66	8,29
	120	6,40	6,14	6,96	6,50
120	15	4,57	--	4,55	4,56
	30	6,65	--	7,37	7,01
	60	9,04	--	8,40	8,72
	120	7,25	--	6,22	6,74

Os resultados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de etanol.

Tabela XVII-Ácido láctico produzido durante a dissimilação aeróbica da glicose por *S. carlsbergensis*.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições			Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
24	15	0,07	0,03	0,02	0,04
	30	0,07	0,09	0,07	0,08
	60	0,21	0,17	0,11	0,16
	120	0,21	0,21	0,12	0,18
48	15	0,06	0,06	0,07	0,06
	30	0,13	0,11	0,17	0,14
	60	0,22	0,20	0,26	0,23
	120	0,18	0,13	0,15	0,15
72	15	0,05	0,05	0,05	0,05
	30	0,11	0,10	0,09	0,10
	60	0,17	0,21	0,13	0,17
	120	0,15	0,16	0,15	0,15
96	15	0,06	0,04	0,05	0,05
	30	0,15	0,11	0,16	0,14
	60	0,22	0,20	0,26	0,22
	120	0,24	0,19	0,22	0,22
120	15	0,13	--	0,07	0,10
	30	0,16	--	0,12	0,14
	60	0,24	--	0,18	0,21
	120	0,17	--	0,15	0,16

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de ácido láctico.

Tabela XVIII-  $CO_2$  liberado durante a dissimilação aeróbia da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições			Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
24	15	0,96	1,12	0,14	0,74
	30	3,04	4,63	1,59	3,09
	60	8,95	11,47	4,97	8,46
	120	16,76	16,90	14,87	16,18
48	15	3,26	4,92	3,97	4,05
	30	8,72	12,20	9,93	10,28
	60	16,02	19,63	17,01	17,55
	120	22,60	26,96	23,90	24,26
72	15	4,28	4,04	4,12	4,15
	30	10,61	10,38	10,46	10,48
	60	17,32	17,48	17,62	17,47
	120	24,68	25,60	24,85	25,04
96	15	4,37	4,05	3,97	4,13
	30	9,78	10,46	10,84	10,36
	60	17,23	18,39	17,62	17,75
	120	23,92	25,82	24,42	24,72
120	15	4,05	--	4,29	4,17
	30	9,63	--	10,46	10,04
	60	17,61	--	17,61	17,61
	120	23,81	--	25,13	24,47

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de  $CO_2$ .



Tabela XIX- Oxigênio consumido durante a dissimilação-aeróbica da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições			Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
24	15	0,00	0,00	0,00	0,00
	30	0,00	0,00	0,00	0,00
	60	0,07	0,00	0,14	0,07
	120	1,29	1,50	0,82	1,21
48	15	0,00	0,28	0,07	0,11
	30	0,74	1,54	0,40	0,96
	60	3,38	4,49	2,90	3,59
	120	8,32	10,64	7,37	8,78
72	15	0,35	0,28	0,21	0,28
	30	1,14	1,28	0,80	1,07
	60	3,45	3,38	2,90	3,24
	120	9,69	10,30	9,42	9,80
96	15	0,00	0,21	0,00	0,07
	30	0,47	0,80	0,74	0,67
	60	2,00	2,69	2,35	2,35
	120	8,94	9,07	8,39	8,47
120	15	0,07	--	0,00	0,04
	30	0,40	--	0,54	0,47
	60	2,07	--	1,79	1,93
	120	7,84	--	8,46	8,15

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de oxigênio.

Tabela XX - Glicose consumida durante a dissimilação anaeróbica da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições				Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	
24	15	1,66	1,79	0,94	0,83	1,31
	30	3,49	3,45	2,70	2,80	3,11
	60	7,25	7,23	7,52	6,68	7,17
	120	9,76	9,79	10,04	10,05	9,91
48	15	3,76	3,56	3,25	3,31	3,47
	30	6,84	6,73	6,67	6,58	6,71
	60	9,30	9,24	9,78	9,78	9,53
	120	9,94	9,93	10,08	10,09	10,01
72	15	--	--	4,15	3,99	4,07
	30	--	--	7,65	7,59	7,62
	60	--	--	9,74	9,74	9,74
	120	--	--	9,94	9,94	9,94
96	15	2,71	2,16	3,32	2,73	2,73
	30	5,60	5,41	7,15	7,18	6,34
	60	8,92	8,87	9,62	9,60	9,25
	120	9,91	9,90	9,82	9,85	9,87
120	15	2,70	2,50	3,74	3,52	3,12
	30	5,73	5,55	6,83	6,75	6,22
	60	8,49	8,55	9,45	9,50	9,00
	120	9,77	9,79	9,89	9,89	9,84

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de glicose.

Tabela XXI- Etanol produzido durante a dissimilação anaeróbica da glicose por S. carlsbergensis.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições				Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	
24	15	2,93	3,52	1,88	2,00	2,58
	30	5,87	6,46	4,17	4,34	5,21
	60	8,80	11,15	10,21	11,50	10,42
	120	18,19	17,61	18,08	18,14	18,01
48	15	5,28	5,28	4,70	5,64	5,23
	30	9,39	9,39	9,89	10,57	9,80
	60	15,85	15,85	13,85	14,09	14,91
	120	15,26	15,85	15,85	16,08	15,76
72	15	--	--	6,34	5,87	6,11
	30	--	--	13,38	12,33	12,86
	60	--	--	14,91	14,44	14,68
	120	-	--	17,02	16,79	16,91
96	15	4,11	4,11	4,34	4,11	4,17
	30	7,63	7,04	11,56	9,74	8,99
	60	11,74	12,91	13,96	12,91	12,88
	120	14,09	15,20	16,20	16,18	15,16
120	15	4,11	5,28	5,58	5,28	5,06
	30	9,39	11,74	9,98	11,33	10,61
	60	16,20	16,20	14,67	16,44	15,88
	120	17,61	17,61	15,73	15,85	16,70

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de etanol.

Tabela XXII- Ácido láctico produzido durante a dissimilação anaeróbica da glicose por *S. carlsbergensis*.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições				Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	
24	15	0,04	0,05	0,06	0,07	0,06
	30	0,05	0,06	0,17	0,12	0,10
	60	0,17	0,18	0,28	0,27	0,23
	120	0,39	0,38	0,32	0,29	0,34
48	15	0,21	0,22	0,07	0,08	0,14
	30	0,47	0,47	0,21	0,24	0,35
	60	0,99	0,97	0,40	0,38	0,68
	120	1,16	1,16	0,54	0,56	0,86
72	15	--	--	0,10	0,12	0,11
	30	--	--	0,30	0,32	0,31
	60	--	--	0,57	0,56	0,57
	120	--	--	0,69	0,71	0,70
96	15	0,16	0,18	0,09	0,10	0,13
	30	0,29	0,31	0,29	0,31	0,30
	60	0,82	0,90	0,53	0,53	0,69
	120	1,06	1,13	0,64	0,64	0,87
120	15	0,14	0,13	0,11	0,14	0,13
	30	0,27	0,27	0,25	0,28	0,27
	60	0,73	0,72	0,59	0,61	0,66
	120	1,08	1,08	0,74	0,72	0,91

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu$ moles de ácido láctico.

Tabela XXIII -  $CO_2$  produzido durante a dissimilação anaeróbica da glicose por *S. carlsbergensis*.

Tempo de cultivo (horas)	Tempo de incubação (minutos)	Repetições				Média
		1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	
24	15	2,88	3,10	0,77	0,71	1,87
	30	6,32	6,45	2,56	2,73	4,52
	60	11,35	11,32	9,96	9,41	10,51
	120	14,43	13,33	16,26	16,74	15,19
48	15	3,34	3,18	3,96	4,13	3,65
	30	7,97	8,27	8,65	8,80	8,42
	60	13,89	13,54	15,36	15,14	14,48
	120	15,27	16,03	15,57	16,58	15,86
72	15	--	--	4,35	4,13	4,26
	30	--	--	10,38	10,47	10,43
	60	--	--	15,98	16,06	16,02
	120	--	--	16,57	17,13	16,85
96	15	4,12	4,13	3,88	3,58	3,93
	30	8,13	7,66	9,71	10,17	8,92
	60	15,21	14,99	16,29	16,67	15,79
	120	17,10	17,29	17,18	17,61	17,30
120	15	4,04	4,13	4,12	3,97	4,07
	30	8,27	8,42	10,08	9,86	9,16
	60	15,44	15,29	16,59	16,29	15,90
	120	17,02	18,01	17,18	17,61	17,46

Os dados da Tabela acima estão expressos em  $\mu\text{moles}$  de  $CO_2$ .