ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA POR LEVEDURAS
MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATÓRIAS DE
Saccharomyces cerevisiae IZ-270 E *Saccharomyces uvarum* IZ-1904

NORMA REGINA GASPARINI

Orientador: Prof. Dr. JORGE HORII

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1986

À minha família,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela orientação precisa e apoio prestados na realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira e Dr. João Gustavo Brasil Caruso pelas sugestões e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", pelos auxílios prestados.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação pelo convívio e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida.

À bibliotecária Eliana Maria Garcia Sabino, pela orientação bibliográfica.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Características gerais das leveduras	6
2.2. Metabolismo das leveduras.....	7
2.3. Mutação	9
2.4. Indução de Mutação	10
2.5. Fatores que afetam o desenvolvimento das leveduras	16
2.5.1. Oxigênio	17
2.5.2. Temperatura	20
2.5.3. Etanol	20
2.5.4. Glicose	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Material biológico: microrganismos	33
3.2. Obtenção de mutantes	34
3.3. Conservação dos microrganismos	35
3.4. Obtenção do inóculo das linhagens normais L. N. e linhagens mutantes R.D.	36
3.5. Determinações analíticas	36
3.6. Variáveis aplicáveis para o estudo da fermentação alcoólica	37
3.6.1. Variação do inóculo e da concentração de glicose no meio de fermentação ...	37

	Página
3.6.2. Variação da concentração de glicose em fermentação com e sem agitação	38
3.6.3. Acompanhamento da produção de etanol em sistema agitado	39
3.6.4. Fermentações alcoólicas consecutivas com reciclagem de fermento	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Variação do inóculo e da concentração de glicose no meio de fermentação	43
4.2. Variação da concentração de glicose em fermentação com e sem agitação	49
4.3. Acompanhamento da produção de etanol em sistema agitado	55
4.4. Fermentações alcoólicas consecutivas com reciclagem de fermento	57
5. CONCLUSÕES	65
6. LITERATURA CITADA	67

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Valores médios do crescimento celular, produção de etanol e eficiência em fermentação alcoólica com inóculo de 1,0 ml	44
02	Valores médios do crescimento celular, produção de etanol e eficiência em fermentação alcoólica com inóculo de 10,0 ml	48
03	Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 1,0% de glicose	51
04	Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 2,0% de glicose	52
05	Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 5,0% de glicose	53
06	Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 10,0% de glicose	54
07	Variação da produção alcoólica em sistema agitado	56
08	Glicose consumida em fermentações com reciclagem de fermento	59

TABELA Nº		Página
09	Massa celular produzida em fermentações com reciclagem de fermento	60
10	Etanol produzido em fermentações com <u>re</u> ciclagem de fermento	61
11	Eficiência de fermentações com <u>recicla</u> gem de fermento	62

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
1	Inter-relação entre as vias metabólicas de degradação de carboidratos pela célula de levedura	8
2	Estrutura química do brometo de etídio.	16
3	Esquema de fermentação consecutivas com reciclagem de fermento	41

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA POR LEVEDURAS MUTANTES DEFICIENTES RESPIRATÓRIAS DE *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 E *Saccharomyces uvarum* IZ-1904

Autora : NORMA REGINA GASPARINI
Orientador: PROF. DR. JORGE HORII

RESUMO

A presente investigação foi feita para comparar o comportamento fermentativo de células de leveduras normais e mutantes deficientes respiratórias das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904, sob condições variáveis de concentração, de substrato, concentração de inóculo, com e sem agitação contínua do substrato.

Sob condições de agitação com 2% de concentração de glicose, leveduras mutantes deficientes respiratórias foram capazes de acumular mais etanol que leveduras normais ou selvagens pois estas últimas consomem o etanol produzido tão logo torna-se limitante o substrato para a produção de álcool. Em meios de cultura com maior concentração de substrato, como 5 e 10% de glicose, o efeito repressivo do substrato sobre a cadeia respiratória torna as linhagens similares quanto ao padrão metabólico de consumo da glicose e pro

dução de etanol.

Com respeito a concentração do inóculo observou-se que esse efeito foi mascarado pela ação da concentração de substrato.

A utilização industrial de linhagens deficientes respiratórias é indicada para exploração de substratos de baixa concentração de açúcares fermentáveis, principalmente quando se deseja processos mais econômicos.

STUDY OF ALCOHOLIC FERMENTATION BY MUTANT DEFICIENT RESPIRATORY STRAINS OF *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 AND *Saccharomyces uvarum* IZ-1904

Author : NORMA REGINA GASPARINI

Adviser: JORGE HORII

SUMMARY

The present investigation was made to compare the fermentative behavior of normal yeast cells and mutant yeast cells from strains of *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 and *Saccharomyces uvarum* IZ-1904, under variable conditions of substrate concentration, inocule concentration, with and without continuous substrate agitation.

Under shaking conditions at 2% of glucose concentration, mutant deficient respiratory yeasts were capable of accumulate more ethanol than normal or wild yeasts because these last ones consume the ethanol produced as soon the substrate became limited for the ethanol production. In culture media with higher substrate concentration, as 5% and 10% of glucose, the blocking effect of substrate on the respiratory chain makes the strains similar in respect to the metabolic pattern of glucose consumption and ethanol production.

In respect to the concentration of inocule it

was observed that this effect was masked by the substrate concentration action.

The industrial utilization of respiratory deficient strains is indicated for substrat exploration of low concentration of fermentable sugar mainly when cheaper processes are desired.

1. INTRODUÇÃO

A indústria alcooleira tornou-se uma das mais importantes dentro da agroindústria brasileira e cresceu de ano para ano. A crise mundial de petróleo endossou em nosso país a procura de fontes alternativas para a produção de energia, e a principal fonte renovável escolhida para a produção de álcool foi a cana de açúcar. Outras matérias primas têm sido estudadas e testadas, porém, do ponto de vista econômico, apenas algumas delas são hoje importantes para a produção de álcool. No caso especial do Brasil, apenas duas matérias primas são utilizadas na exploração do álcool sendo uma delas o mel final da usina de açúcar e a outra o próprio caldo da cana de açúcar.

A procura de melhores rendimentos em termos de produção de álcool não tem ficado apenas na busca de outras matérias primas; muito tem-se procurado em termos de microrganismos melhorados geneticamente. Para tanto, a Engenharia Genética tem colaborado com técnicas sofisticadas.

A competição entre indústrias, particularmente na indústria da fermentação alcoólica, mostrou a necessidade de se melhorar linhagens de leveduras, a fim de que estas produzam altas concentrações de álcool no menor tempo possível. Para isso, as clássicas técnicas de mutação apresentam-se válidas, e são bastante usadas.

O álcool pode ser produzido sinteticamente a partir do petróleo ou biologicamente através do processo de fermentação por microrganismos a partir de uma solução açucarada. No Brasil, o álcool etílico é produzido exclusivamente por via fermentativa.

Do ponto de vista econômico, as leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. As espécies mais usadas industrialmente são as *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. A levedura sobrevive tanto em presença como na ausência do oxigênio do ar. Entretanto, o seu modo de vida se traduz por reações absolutamente diferentes diante de um caso ou de outro. Em presença de ar e, portanto, de oxigênio livre, a levedura vive normalmente, isto é, oxida os nutrientes que têm à sua disposição para as necessidades vitais. Neste caso, a sua função multiplicativa é máxima, podendo o peso das células produzidas atingir a cerca da metade do peso do açúcar consumido. Quando a levedura tem à sua disposição oxigênio livre conseguirá energia a partir do processo da respiração. Nesse processo atuam sistemas multienzimáticos que catalizam a oxi

dação dos substratos orgânicos, o transporte de elétrons e a atividade do oxigênio, até a formação da água e dióxido de carbono. Ao contrário, em ausência do oxigênio livre a função multiplicativa se reduz ao mínimo, tornando-se máxima a função da fermentação. O açúcar é, na sua maioria, desdobrado com produção de álcool e dióxido de carbono. Uma situação e outra - respiração e fermentação - podem existir ao mesmo tempo dependendo este fato da quantidade de oxigênio presente ao meio e à disposição da célula.

Conclui-se, desta maneira, que é possível se "forçar" a levedura alcoólica a caminhar no sentido que se deseja.

É óbvio que qualquer aumento na produção de álcool será de grande valia. Pesquisas realizadas com indução de mutação usando-se agentes químicos levaram a descobrir leveduras com deficiência respiratória. Estas leveduras testadas quanto à capacidade de fermentação alcoólica, mostraram-se mais eficientes que as linhagens selvagens normalmente utilizadas para a conversão de açúcar em álcool, BACILA e HORII (1979).

Em decorrência desse achado, pensou-se em promover um estudo da fermentação alcoólica por tais leveduras deficientes respiratórias.

As leveduras deficientes respiratórias RD (Respiratory Deficient) apresentam diferenças evidentes quando comparadas com as linhagens normais LN. Essas diferenças estão relacio-

nadas com a morfologia e caracteres enzimáticos. O mutante RD é mais eficiente na utilização de açúcares que a levedura normal, entretanto cresce mais vagarosamente quando em aerobiose, pois fermentam produzindo álcool e dióxido de carbono como se estivessem em anaerobiose. Colônias de leveduras mutantes RD são menores que as colônias de leveduras normais quando a concentração de açúcar no meio nutriente é baixa. As células de leveduras RD sofrem a perda de uma ou mais enzimas respiratórias associadas à mitocôndria, principalmente, a citocromo oxidase e a citocromos a_1 ; a_3 e b. Tais células perdem a capacidade de oxidar substratos não fermentescíveis como o etanol, acetato e glicerol, e produzem álcool e dióxido de carbono sem sofrerem repressão pelo oxigênio, de modo que nelas o efeito Pasteur está ausente.

Diante dessas características e sendo essas leveduras mutantes deficientes respiratórios, organismos dotados de capacidade exclusivamente fermentativa, teoricamente são microrganismos bioquimicamente mais perfeito para essa função. Assim sendo, poderá vir a ser brevemente um fator de acréscimo de rendimento fermentativo, colaborando para o aumento da produção de álcool.

Porém, buscando a literatura sobre a fermentação alcoólica utilizando-se esses mutantes RD, pouco se encontrou especificamente. As leveduras normais LN são alvos de estudos relacionados com a fermentação alcoólica e assim, procurou-se comparar dados da literatura com os resultados

encontrados neste trabalho.

Partindo de que pouco se sabia a respeito dos mutantes RD, procurou-se estudar determinados parâmetros que permitissem melhor eficiência dessas leveduras em comparação com as leveduras normais. Assim, os objetivos dessa pesquisa foram estudar a melhor concentração de açúcar para obtenção de um fermentado com maior rendimento alcoólico, eficiência, produtividade e que permite maior número de utilizações, sem perda das características já citadas. Fazer comparações entre fermentações consecutivas, verificar a relação da massa celular inoculada, tempo da fermentação e fator aeração.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características Gerais das Leveduras

Dentre os microrganismos existentes, as leveduras representam um grupo relativamente pequeno, composto de 39 gêneros e 350 espécies. As leveduras se apresentam sob a forma unicelular, seu tamanho variando de 1-5 μm de comprimento, com formas variadas desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas. Estas células apresentam membrana citoplasmática lipoproteica, cuja função é regular as trocas com o meio ambiente, e parede celular rígida que dá a forma à célula. No citoplasma, encontram-se um ou mais vacúolos, delimitados por uma membrana; retículo endoplasmático; ribossomos; grânulos de material de reserva - hidratos de carbono, gorduras ou proteínas, e estruturas membranosas relacionadas com o processo respiratório denominadas mitocôndrias, PELCZAR *et alii* (1981).

As mitocôndrias das células de leveduras são equipadas com enzimas capazes de oxidar vários substratos ,

com sistemas de transporte de elétrons, e com enzimas que convertem energia livre das reações oxidativas para ATP. Partículas submitocondriais, presumivelmente representando fragmentos da membrana mitocondrial interna, contêm flavina, coenzima Q, ferro, cobre e os citocromos a; b; e c₁. A função principal da mitocôndria é a conversão aeróbica da energia.

2.2. Metabolismo das Leveduras

Do ponto de vista técnico e industrial as leveduras que têm sido utilizadas com maior intensidade são principalmente as representantes do gênero *Saccharomyces*. Essas leveduras apresentam capacidade de conseguir energia vital através de processos respiratório e fermentativo.

Quando é fornecido oxigênio livre às células de levedura, essas executam o processo respiratório, fazendo uso da via glicolítica, seguindo-se o ciclo de Krebs e finalmente obtendo grande quantidade de ATP através da cadeia respiratória. Com a energia produzida as células se multiplicam e crescem.

Quando porém o oxigênio livre não está presente, a levedura faz uso do processo fermentativo, através da via glicolítica, chegando à formação de ácido pirúvico que será transformado em álcool e dióxido de carbono. A Figura 1 mostra esquematicamente a inter-relação existente entre as vias metabólicas de degradação de carboidratos pela célula de levedura, HORII (1980).

FIGURA 1: Inter-relação entre as vias metabólicas de degradação de carboidratos pela célula de levedura.

2.3. Mutação

O termo mutação foi primeiramente empregado para descrever alterações hereditárias súbitas, não explicadas, que se verificam na ausência de recombinação. Tais alterações ocorriam espontaneamente, e à uma frequência muito baixa; mais recentemente, tornou-se possível induzir mutações por uma variedade de agentes químicos e físicos, STANIER *et alii* (1969).

Segundo EPHRUSSI *et alii* (1949), quando uma levedura é semeada em um meio de cultura sólido, cerca de 1 a 2% de colônias apresentam menor tamanho que as outras; essas formas foram denominadas de "petites".

Esses mutantes espontâneos aparecem em uma frequência de 0,3% em trabalhos realizados por SARACHEK (1959) e SARACHEK e FOWLER (1959).

NAGAI *et alii* (1961) dizem que a frequência de mutantes "petites" espontâneos em cultura de levedura normalmente se encontra por volta de 1%. Essa mesma porcentagem foi encontrada em trabalho realizado por AVERS *et alii* (1965). Trabalho realizado por SMITH *et alii* (1969) mostra uma frequência de 2% para mutantes "petites" espontâneos. Uma frequência de 1,1% a 1,4% foi encontrada por SILHANKOVA *et alii* (1970) em leveduras de cervejaria.

Entretanto, a aplicação de vários agentes químicos e físicos aumenta a frequência de mutantes "petites" para 100% sob condições apropriadas, NAGAI *et alii* (1961).

2.4. Indução de Mutação

Deficiência respiratória em espécies do gênero *Saccharomyces* pode resultar de uma mutação a nível nuclear ou a perda de fatores citoplasmáticos. Em relação ao comportamento genético, conhece-se dois tipos de mutantes deficientes respiratórios RD: mutantes citoplasmáticos, que são produzidos pela exposição a agentes químicos, e mutantes nucleares que são produzidos por agentes físicos.

Os primeiros trabalhos sobre mutantes deficientes respiratórios em leveduras começaram com STIER e CASTOR (1941), quando estes descreveram uma variante não respiratória de levedura representante do gênero *Saccharomyces* após exposição ao cianeto. Essas leveduras mutantes quando comparadas às linhagens normais, apresentavam falta de citocromo c, respiração diminuída e glicólise aumentada.

Experimento sobre o efeito tóxico do óxido de etileno sobre uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* realizados por WHELTON e PHAFF (1947), mostraram o aparecimento de linhagens mutantes pela falta de citocromos a e b.

EPHRUSSI *et alii* (1949) submeteram linhagens de levedura ao tratamento com acriflavina e encontraram mutantes com deficiência respiratória, os quais eram estáveis. Esses mutantes RD não eram tão eficientes na utilização de açúcares quanto às células normais, e se apresentavam em colônias pequenas.

Características semelhantes foram encontradas

em mutantes induzidos por cloridrato de 2,8-diamino-10 - metil acridina, os quais eram incapazes de utilizar glicose por processo respiratório, utilizando a via fermentativa mesmo na presença de oxigênio, TAVLITZKI (1949).

SLONIMSKI (1949), encontrou que mutantes deficientes respiratórios espontâneos e induzidos com acriflavina apresentam a mesma deficiência de sistema respiratório, e que em aerobiose os mutantes RD utilizam o substrato exógeno quase que exclusivamente por via fermentativa, estando a respiração reduzida a 8% do valor apresentado pelas leveduras normais. Em anaerobiose, os mutantes fermentam a glicose da mesma maneira que as leveduras normais.

Fazendo-se uma comparação entre o conteúdo em citocromos de leveduras normais e mutantes, SLONIMSKI e EPHRUSI (1949), encontraram que os mutantes são desprovidos de citocromos a e b, mas contêm o citocromo a_1 ; o conteúdo de citocromo c é mais elevado que aquele das leveduras normais, e que os mutantes não apresentam atividade das enzimas citocromo - oxidase e da desidrogenase succínica. Essas mesmas características de deficiência respiratória foram encontradas por EPHRUSI e HOTTINGUER (1950), quando expuseram leveduras ao agente químico euflavina.

HABOUCHA e MASSCHELEIN (1960), estudaram uma linhagem mutante RD provocada pela acriflavina e verificaram que a redução de citocromo c, tanto quanto a oxidação do succinato revelam que a deficiência pode ser o nível da enzima

desidrogenase succínica.

A existência de leveduras que são transformadas em mutantes deficientes respiratórios foi confirmada por BULDER (1964) que trabalhando com o agente mutagênico acriflavina encontrou populações que continham geralmente 50 a 100% de deficientes respiratórios. Esse mesmo autor encontrou leveduras que não sofrem mutação após tratamento com acriflavina.

A descoberta de que a enzima citocromo c redutase da levedura *Saccharomyces cerevisiae* está localizada em partículas distintas de mitocôndria foi feita por SCHATZ e KLIMA (1964), após tratamento da mesma com o agente acriflavina.

Mutantes deficientes respiratórios induzidos por acriflavina mostraram variação no conteúdo de citocromo oxidase e de desidrogenase succínica, AVERS *et alii* (1965).

MOUSTACCHI e WILLIAMSON (1966), induziram mutação deficiente respiratória com acriflavina e evidenciaram que a mesma é uma consequência da perda do DNA mitocondrial.

Além das leveduras do gênero *Saccharomyces*, leveduras do gênero *Candida* têm sido usadas e testadas por agentes mutagênicos acriflavinas, e desses testes foram selecionadas linhagens que se mostraram incapazes de crescerem em meio de acetato e ainda, apresentavam evidências de alterações do sistema de citocromos, WATKINS *et alii* (1974).

Outros agentes mutagênicos foram testados quan

to à capacidade de induzirem mutação para deficiência respiratória. Dentre eles, os agentes físicos raio X e luz ultra violeta foram usados por RAUT e SIMPSON (1955), que verificaram que a luz ultra violeta pode produzir defeitos hereditários, os quais são extracromossomais. O efeito do raio X é relativamente menos efetivo que a luz ultra violeta na produção de mutantes RD.

Uma eficiência de 20% em mutantes RD foi encontrada em experimento realizado por SMITH *et alii* (1969), onde verificaram que os mutantes RD somente apresentavam o citocromo c, estando os citocromos a e b ausentes.

Os íons inorgânicos mostraram-se eficientes na indução de mutantes deficientes respiratórios. LINDEGREN *et alii* (1958), trabalhando com os íons manganês, cobre, cobalto e níquel, nas seguintes formas e concentrações, 0,05% $Mg\ SO_4 \cdot 7H_2O$; 0,006% $Cu\ SO_4 \cdot 5H_2O$; 0,013 - 0,038% $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ e 0,013-0,050% $Ni\ Cl_2 \cdot 6H_2O$, verificaram que estes elementos induzem deficiência respiratória em leveduras com alta eficiência e que isso era devido à destruição ou inativação de grânulos citoplasmáticos. SARACHEK (1959), usando uma concentração fixa de $4 \cdot 10^{-3} N$ de $Mn\ SO_4$ e variando as concentrações de íons Mg^{++} encontraram que a habilidade do íon Mn^{++} em induzir mutantes deficientes respiratórios e inativar células é inversamente proporcional à concentração dos íons Mg^{++} no meio e diretamente proporcional ao nível de aminoácidos livres da célula. KEYHANI (1979) trabalhando com mutantes deficientes

respiratórios induzidos previamente com íons manganês, verificou que esses mutantes não apresentavam citocromos e oxidase.

A indução de mutantes não cromossomais que apresentavam deficiência respiratória foi feita em levedura *Saccharomyces cerevisiae* por agentes desnaturantes de proteína e primeiramente demonstrados por COSTA e BACILA (1973), com o dodecil sulfato de sódio (SDS), e JULIANI *et alii* (1973) com cloridrato de guanidina (GuHCL). Um grupo derivado de acilsarcosinato, o palmitoil sarcosinato de sódio (SPS), pesquisado por XAVIER (1976) mostrou-se potente indutor de mutação deficiente respiratória. O efeito desnaturante de derivados de acilsarcosinatos foram estabelecidos por NICOLAU e BACILA (1969), que mostraram que em concentrações de 10^{-2} M a 3×10^{-2} M para SLS e 10^{-2} M a $2,5 \times 10^{-4}$ M para SPS, ambos compostos causam desdobramento progressivo da frutose 1 - 6-difosfato aldolase em músculo de coelho.

Pesquisa realizada por BACILA *et alii* (1978), com os agentes desnaturantes de proteínas cloridrato de guanidina (GuHCL), dodecil sulfato de sódio (SDS) e palmitoil sarcosinato de sódio (SPS), confirmou a eficiência desses agentes para a indução de mutantes deficientes respiratórios RD.

O brometo de etídio usado por WARING (1966), como indutor de deficiência respiratória, mostrou-se bastante eficiente como mutagênico intercalador.

SLONIMSKI *et alii* (1968), verificaram a ação de brometo de etídio em induzir mutantes RD não cromossomais

em leveduras e compararam sua ação com a ação da acridina. Encontraram que o brometo de etídio é um mutagênico extremamente eficiente, e que na sua presença mais de 99,8% das células são mutantes RD. Evidenciaram também que os mutantes obtidos após o tratamento com o brometo apresentavam deficiências idênticas no sistema de citocromos como aqueles mutantes citocromos a; a₃ e b. Não cresciam em meios com substratos não fermentescíveis e não respiravam. O brometo atua não somente em células-filhas como também nas células mães, transformando todas em mutantes RD.

GOLDRING *et alii* (1970) usaram o brometo para indução de mutantes RD, e investigaram o mecanismo dessa conversão em *Saccharomyces cerevisiae*. O brometo mostrou que atua inibindo a síntese de DNA mitocondrial, e que na sua presença o DNA pré existente é degradado. Essa ausência de DNA mitocondrial também foi investigada por NAGLEY e LINNANE (1970) usando o brometo como agente indutor.

Trabalho de pesquisa foi realizado por GOLDRING *et alii* (1971) onde se examinou a degradação e eventual eliminação do DNA mitocondrial a nível celular pelo isolamento e cultivo de mutantes RD a diferentes intervalos de tempo, durante o tratamento com brometo de etídio. Encontraram que o aumento do tempo de tratamento, o DNA, mitocondrial isolado dos mutantes RD, mostravam-se bastante diminuídos em seu tamanho.

O brometo de etídio é um agente intercalador

que se liga ao DNA. Acredita-se que ele intercala entre 2 pares de bases sucessivas. Em concentrações baixas de corante, ele fica preferencialmente ligado ao DNA circular super enrolado, como nas mitocôndrias, LEHNINGER (1977). A Figura 2 mostra a estrutura química do agente brometo de etídio.

FIGURA 2 - Estrutura Química do Brometo de Etídio

Da revisão levada a efeito sobre indução de mutantes com deficiência respiratória, verifica-se fundamentalmente que quando agentes mutagênicos são usados ocorrem modificações nas enzimas respiratórias, nas enzimas do ciclo de Krebs, em algumas enzimas da via pentose-fosfato, e de poucas enzimas glicolíticas.

Conclui-se, dessa maneira, que os mutantes RD derivam a energia de que necessitam unicamente da degradação glicolítica, sendo dotados de fermentação aeróbica tão intensa quanto a anaeróbica.

2.5. Fatores que afetam o desenvolvimento das leveduras

As leveduras são organismos que mantêm a vida tanto na presença de oxigênio como na ausência do mesmo, principalmente os representantes do gênero *Saccharomyces*.

Esses organismos apresentam a habilidade de produzir energia para uso próprio de compostos tanto em condições aeróbicas quanto em condições anaeróbicas. Nas células de leveduras, sob condições aeróbicas, a glicose é metabolizada a dióxido de carbono e água, para a produção de energia, provendo a célula. Se o oxigênio não está presente, ou seja, as condições são totalmente anaeróbicas, a produção de energia por molécula de glicose é pouca, pois sob estas condições, a fermentação é conduzida primeiramente para a formação de álcool, SUOMALAINEN e OURA (1971).

A energia livre desprendida pela fermentação é de 56 kcal/mol, enquanto que para a combustão completa da glicose (respiração), a energia livre é de 688 kcal/mole. Fica evidente que a fermentação é um processo menos eficiente que a respiração desde que a primeira obtém menos energia (menos ATP) por mole de glicose utilizada, SOLS *et alii* (1971).

A via fermentativa da glicose até a formação do ácido pirúvico é idêntico àquela utilizada pela levedura na via respiratória. O que distingue a respiração da fermentação é o destino do ácido pirúvico, SOLS *et alii* (1971).

Dentre os fatores que afetam o desenvolvimento das leveduras citaremos:

2.5.1. Oxigênio

Um dos fatores que têm influência sobre o destino do ácido pirúvico é a concentração de oxigênio, que inibe a fermentação alcoólica. Esse fenômeno é conhecido como efeito Pasteur. Um meio de cultura arejado tenderá a produzir menor quantidade de álcool, oxidará totalmente o açúcar com alto rendimento energético, e favorecerá a proliferação da levedura que disporá de energia suficiente para a realização de sínteses biológicas.

Um estudo feito por LEMOIGNE *et alii* (1954), sobre o efeito Pasteur mostrou que em um meio onde as condições de oxigenação são bem asseguradas, a aeração não impede a formação de álcool pela levedura normal em via de proliferação. Porém, as leveduras ficam impossibilitadas de alcançarem crescimento intenso na ausência total de oxigênio, CANTARELLI (1956).

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. Em um deles a tensão de oxigênio foi mantida a 150 mm Hg e no outro a tensão foi de 50 mm Hg. O padrão metabólico foi bem diferente sob essas duas condições experimentais. Sob a condição altamente aeróbica a fermentação aeróbica foi fortemente inibida.

LINDENMAYER e SMITH (1964), estudaram e compararam qualitativamente e quantitativamente as enzimas oxida-

tivas de leveduras desenvolvidas na presença e ausência de oxigênio. Como resultado encontraram que as leveduras desenvolvidas anaerobicamente não apresentavam os citocromos a e a_3 , embora apresentassem evidências de que outra oxidase deveria estar presente. As quantidades de citocromo c peroxidase foram encontradas serem semelhantes tanto nas leveduras desenvolvidas aerobicamente como anaerobicamente. À medida que a concentração de oxigênio aumenta, aumenta o conteúdo em citocromos da levedura, favorecendo assim a via oxidativa da respiração para a produção de energia, OURA e SUOMALAINEN (1970).

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* quando desenvolvidas em meio com baixas ou altas concentrações de oxigênio apresentam sistemas de citocromos perfeitamente ativos, desde que a concentração de glicose estivesse baixa, RICKARD *et alii* (1971). Esses mesmos microrganismos apresentam rendimento em massa celular, a partir de uma dada quantidade de açúcar, na ausência de oxigênio, de somente 4% daquele obtido na presença de oxigênio, HARRISON (1971).

O aparecimento ou não de mitocôndrias foi investigado por FERDOUSE *et alii* (1972), que revelaram que as células desenvolvidas em condições totais de anaerobiose nem mitocôndrias foram detectáveis. Porém, usando condições de microaerobiose foi possível a visualização de mitocôndrias e citocromos. OURA (1974), evidenciou que baixas quantidades -

de oxigênio maximizam os níveis de citocromos a; a₃; b; c e de algumas enzimas.

Em *Saccharomyces cerevisiae*, a seleção da via metabólica para a produção de energia depende da concentração de glicose como também da concentração de oxigênio dissolvido no meio, YERUSHALMI e VOLESKI (1981).

2.5.2. Temperatura

Segundo WALSH e MARTIN (1977), as temperaturas ótimas para o crescimento de todas as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* encontram-se na faixa de 30,0°C-35,0°C. As linhagens de *Saccharomyces uvarum* formam 2 grupos distintos: grupo A (incluem todas as leveduras de cervejarias) apresentam temperaturas ótimas para crescimento na faixa de 26,8°C-30,4°C; grupo B apresentam temperaturas ótimas na faixa de 30,0°C-34,6°C.

De acordo com SLATOR (1906), leveduras alcoólicas fermentam açúcar numa faixa de 0 a 43°C, e a fermentação é mais rápida a 40 a 42°C.

Com leveduras de panificação, WHITE e MUNNS (1951), encontraram que a taxa de fermentação de sacarose aumentou quase linearmente entre 20°C e 40°C e, então, diminuiu rapidamente a altas temperaturas.

2.5.3. Etanol

Quando a levedura desenvolve-se através da fermentação, o açúcar é transformado em álcool e dióxido de car

bono. O álcool formado, mesmo em concentrações baixas, tem um poder inibitório ao desenvolvimento da levedura *Candida pseudotropicalis*, MOULIN *et alii* (1980).

O fator limitante primário na produção de etanol é o efeito do próprio etanol produzido pela célula de levedura. Quando a concentração de etanol aumenta, uma diminuição na taxa de crescimento é a manifestação inicial dessa inibição. Tolerância a alta concentração de etanol é dependente da linhagem da levedura. Com uma concentração máxima ao redor de 10% (P/V) para leveduras em multiplicação, e 20% (P/V) para as leveduras produtoras de etanol. De todos os gêneros de levedura somente algumas espécies de *Saccharomyces* e *Schizosaccharomyces* exibem alta tolerância a etanol, JONES *et alii* (1981).

2.5.4. Glicose

Observações sobre o metabolismo de carboidratos em células tumorais levaram CRABTREE (1929) a descobrir que na presença de glicose os valores da respiração foram mais baixos do que aqueles obtidos na ausência desse açúcar. Esse fenômeno passou a ser conhecido como "contra efeito Pasteur" ou "efeito Crabtree".

LEMOIGNE *et alii* (1954), estudando o efeito Pasteur verificaram que em concentrações de 20 mg glicose/100ml, ocorre o fenômeno de diauxia, constatando-se intensa fermentação na primeira fase exponencial. Em baixas concentrações, tal

fato não se verificou.

A concentração de glicose foi correlacionada com a atividade de algumas enzimas e como resultado, SCHATZ (1963) encontrou que a atividade de algumas enzimas testadas foi aumentando de acordo com a diminuição da concentração da glicose no meio de cultura. Entretanto, o efeito da glicose sobre a atividade da enzima succinato citocromo c oxidase reductase, foi particularmente pronunciado.

O efeito Crabtree é conhecido como um fenômeno de estimulação do metabolismo fermentativo em cultura aeróbica de algumas linhagens de leveduras na presença de uma quantidade suficiente de glicose. Este efeito foi observado mais acentuadamente no crescimento da levedura *Saccharomyces uvarum*, quando POLAKIS *et alii* (1964) evidenciaram que a respiração e a atividade das enzimas respiratórias variaram inversamente com a concentração de glicose na qual a levedura se desenvolvia nas primeiras 12 horas. Nenhuma estrutura mitocondrial pode ser vista em leveduras cultivadas anaerobicamente. Em células cultivadas aerobicamente em glicose ou cultivadas anaerobicamente mas que tinham desenvolvido respiração, surgiram estruturas vacuolares quando a respiração se desenvolveu.

TUSTANOFF e BARTLEY (1964) realizaram experimento sobre o comportamento da levedura *Saccharomyces cerev*i*siae* desenvolvida anaerobicamente em várias concentrações de glicose e subsequentemente exposta a condições aeróbicas. Os

resultados mostraram que a habilidade dessas células em desenvolver respiração era criticamente dependente da concentração e tempos de exposição à glicose durante seu crescimento.

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 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, durante o cultivo aeróbico sob diferentes fontes de carbono, e em diferentes meios de cultivo. Dos resultados encontrados os autores concluíram que os açúcares induziram um padrão - anaeróbico de metabolismo, medido pela produção de etanol. Glicose foi mais efetiva que a galactose na indução de padrão anaeróbico de metabolismo. A 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 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 glioxilato.

POLAKIS *et alii* (1965) investigando a influência do tipo e concentração de açúcar sobre o tipo de metabolismo em *Saccharomyces uvarum*, revelaram que quando a concentração de glicose era de 0,09% ou galactose 0,9%, a levedura

sintetizava enzimas respiratórias, e possuía mitocôndrias funcionais. Em contraste, quando a concentração de glicose - era de 0,9% as células não continham mitocôndrias reconhecíveis e apresentavam baixo nível de enzimas respiratórias.

A repressão da glicose sobre a síntese do citocromo **a** e a atividade respiratória em leveduras mutantes RD em citocromos e em leveduras normais foi estudada por REILLY e SHERMAN (1965). Esses organismos sofreram vários graus de repressão catabólica pela glicose. Com uma concentração - de 2% de glicose, o conteúdo em citocromos foi bastante reduzido. Na fase de repressão os citocromos foram visíveis. Os autores verificaram ainda que todas as bandas de citocromos, embora fracas, podiam ser detectadas em células desenvolvidas em meio com concentração inicial de glicose de 30%. Concluíram que era difícil a ocorrência de repressão completa - da síntese de citocromos em levedura normal, mesmo em concentrações extremamente altas de glicose. Em contraste, em experimentos realizados por JAYARAMAN *et alii* (1966), os resultados mostraram que a repressão da glicose em mutantes RD resulta no não desenvolvimento de mitocôndrias e que mitocôndrias pré-existent desaparecem, enquanto que durante o período da derrepressão as mitocôndrias reaparecem. Verificaram ainda que o período de repressão foi máximo dentro das primeiras 4 horas do experimento, e vai diminuindo nas 2 horas seguintes.

DE DEKEN (1966) encontrou em seus experimen-

tos, que quando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* desenvolve-se exponencialmente em glicose ou frutose como fonte de energia, em presença de ar, a degradação da glicose se dava principalmente pela fermentação aeróbica. Quando as leveduras eram cultivadas em manose ou galactose, a degradação se dava simultaneamente por respiração e fermentação. Esta situação é resultante de uma repressão da síntese das enzimas respiratórias pelas altas taxas de fermentação.

Trabalho semelhante foi conduzido por GORTS (1967), estudando o efeito da glicose e maltose sobre o desenvolvimento da capacidade oxidativa das células de levedura em relação à taxa de degradação glicolítica. Enquanto a glicose está presente no meio de crescimento, as células possuem a via glicolítica de degradação e baixa concentração de enzimas do ciclo do ácido cítrico, da cadeia respiratória e do ciclo glioxilato, as quais estão localizadas nas mitocôndrias. Após a depleção da glicose, o nível dessas enzimas aumenta consideravelmente.

NEGROTTI e WILKIE (1968) comprovaram o fenômeno da repressão da glicose usando em seus experimentos concentração de 20% de glicose, que causou a troca da via metabólica respiratória para a via fermentativa em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

A concentração da glicose é que determina se via de metabolismo será a anaeróbica (glicolítica) ou aeróbica (oxigênio como acceptor final de hidrogênio), mesmo quando

o oxigênio está disponível, CHAPMAN e BARTLEY (1968).

Concentração de 1% de glicose favorece o efeito repressivo da glicose que pode durar até por 3 horas. DHAR MALINGAN e JAYARAMAN (1977) encontraram que a glicose pode induzir uma enzima hidrolítica que atacaria a membrana mitocondrial, desintegrando-a ou inativando as enzimas aí existentes.

O conteúdo em citocromos das células de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces carlsbergensis* - (uvarum) também é afetado pela concentração da glicose. Em baixas concentrações de glicose, as células de levedura apresentam o máximo de citocromos, RICKARD *et alii* (1971).

FERDOUSE *et alii* (1972) encontraram que as células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* desenvolvidas em excesso de glicose continham concentrações baixas de citocromos e um número reduzido de mitocôndrias quando comparadas às células desenvolvidas em meio de cultura com concentração limitante de glicose.

Uma diminuição no número de mitocôndrias e um declínio na proporção relativa de DNA mitocondrial foi verificado por BLEEG *et alii* (1972) quando usavam altas concentrações de glicose.

AKBAR *et alii* (1974) verificando as trocas no padrão catabólico de *Saccharomyces cerevisiae*, efetuada pela alteração nas concentrações de glicose, constatou que a taxa de respiração era máxima às concentrações baixas de glicose e

e um aumento dessa concentração resultava em diminuição da respiração e aumento da taxa de fermentação etanólica.

Ainda, HOSONO *et alii* (1974) verificaram a repressão da glicose quando cultivaram células de leveduras em meio de cultura com concentração de 5% de glicose.

O efeito repressivo da glicose foi verificado por FERRERO *et alii* (1978) ocorrer em leveduras do gênero *Kluyveromyces* que com altas concentrações de glicose sofre alterações na atividade respiratória e em algumas enzimas citoplasmáticas.

O efeito da adição da glicose para as células de levedura no estado de derrepressão sobre os componentes da cadeia de transporte de elétrons foi estudada por CHANDRA SEKARAN *et alii* (1978) e os resultados sugerem que o efeito primário da glicose é a inibição da síntese de proteínas mitocondriais.

Um estudo pormenorizado efetuado por RICKARD e HOGAN (1978) sobre o efeito da glicose na atividade e síntese das vias fermentativas e respiratórias em *Saccharomyces* sp, mostraram que o metabolismo é controlado por dois níveis de resposta: nível I, governa a expressão da enzima (inibição e ativação da atividade da enzima) e nível II, governa a expressão gênica (repressão, derrepressão e indução de síntese de enzimas). Parece que o valor do quociente respiratório é afetado pelo menos por quatro respostas reguladas pela glicose: repressão da respiração e indução da fermentação etanó

lica opera o nível II e inibição da respiração e ativação da fermentação etanólica opera o nível I. Três dessas quatro respostas também foram manifestadas pelo *S. carlsbergensis* - (*uvarum*) sendo exceção a falta de uma resposta a nível II na fermentação etanólica.

RICKARD e HEWETSON (1979) verificaram que a levedura *Candida utilis* também apresenta as quatro respostas regulatórias relatadas para *S. cerevisiae*.

Influência da glicose sobre a atividade da enzima α glicosidase permease em *S. cerevisiae*, foi levado a efeito por SIRO e LOVGREN (1979) e como resultado encontrou-se três efeitos separados desse açúcar sobre a enzima permease: um efeito imediato que envolve uma transformação conformacional da permease, uma inativação da permease antes do início do crescimento, e uma repressão e derrepressão da síntese da permease.

YERUSHALMI e VOLESKY (1981), evidenciaram que em *S. cerevisiae* a seleção da via metabólica para produção de energia é dependente da concentração de glicose. Quando o efeito repressivo da glicose ocorre, significantes quantidades de glicose foram convertidas a etanol, e muito menos biomassa foi produzida em comparação com os resultados da respiração aeróbica simples.

Alguma maneira de repressão pela glicose existe em microrganismos do gênero *Kluyveromyces lactis*, desde que a glicose reprime a síntese de enzimas catabólicas não

mitocondriais tais como glutamato desidrogenase NAD dependente e β galactosidase, FERRERO *et alii* (1981).

Segundo COTTRELL (1981) uma concentração de 5% de glicose acarreta uma repressão que leva a uma diminuição na quantidade de DNA mitocondrial, e sob condições de derrepressão crescimento em meio com 0,25% de glicose mais 3% de etanol deixa a célula com o dobro da sua quantidade de DNA mitocondrial.

De acordo com MOULIN *et alii* (1982), os resultados obtidos para a produção de álcool mostraram que o mutante RD é superior em relação à linhagem normal, desde que a levedura não apresente o efeito glicose no seu metabolismo respiratório. Os processos de fermentação industrial para a produção de etanol sempre empregam leveduras do gênero *Saccharomyces*, devido ao papel do oxigênio na fermentação alcoólica (efeito Pasteur) e ao metabolismo dessas linhagens. Algum oxigênio no meio é de fato requerido pela levedura para a biossíntese de esteróis e ácidos graxos insaturados. Linhagens desse gênero são sensíveis ao efeito glicose, e tem um metabolismo fermentativo dominante mesmo em meio aerado. Sob essas condições é possível obter uma boa fermentação sem perda de produção com linhagens do gênero *Saccharomyces*. O uso de linhagens de outros gêneros aumenta o número de substratos potenciais. Mostrou-se que o uso de *Kluyveromyces fragilis* e linhagem de *Candida pseudotropicalis* implicou em problemas devido ao seu metabolismo respiratório e fermentativo.

Na presença de oxigênio, a qualquer concentração de glicose essas linhagens não mostram o efeito glicose, e têm um metabolismo respiratório dominante, o que causa uma queda na produção de álcool.

Ainda segundo MOULIN *et alii* (1981), os resultados obtidos de experimentos realizados com linhagens de *Candida pseudotropicalis* e seu mutante RD mostraram que na linhagem normal a atividade fermentativa é máxima tanto para a glicose como para a lactose. Para um mutante RD, a taxa de fermentação é sempre menor com o mutante RD que com a linhagem normal. Em relação ao tipo de substrato e concentração do mesmo, a glicose mostra um efeito inibitório a altas concentrações mas para as células normais o efeito inibitório aparece quando a concentração de glicose é maior que 100 g/l, enquanto para células mutantes RD, a glicose é inibitória somente em concentrações acima de 150 g/l. O mutante exibe uma pequena inibição pela glicose quando há uma alta concentração de substrato. O mutante RD é então melhor para a produção de etanol em um meio com um alto teor de açúcar.

Segundo ALEXANDER e DETROY (1983), linhagens mutantes RD e linhagens normais de *Saccharomyces cerevisiae* apresentam crescimento celular, taxa de produção de álcool e produção total de álcool similares sob as mesmas condições de cultura, ou seja, mesma concentração de glicose, pH, e agitação.

De acordo com ZIFFER (1983), o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* sobre glicose, como a principal fon

te de energia e compostos de carbono, levanta problemas complexos nas necessidades metabólicas competitivas potencialmente integradas. A fim de crescer e multiplicar, *S. cerevisiae* pode ser capaz de utilizar glicose para obter energia, poder reduzido e os carbonos intermediários requeridos como componentes iniciadores para as principais vias biossintéticas. A concentração de glicose, entretanto, tem um importante papel na mediação da via metabólica envolvida.

A via da fermentação anaeróbica, a qual produz normalmente e principalmente etanol e CO_2 , é inibida pelo oxigênio no fenômeno referido como o efeito Pasteur. Na presença de oxigênio e níveis fisiológicos de glicose, a via final oxidativa produtora de energia é predominantemente através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), acoplado à cadeia respiratória. Essa via aeróbica produz mais energia que o processo anaeróbico e menos carboidrato é requerido para suprir necessidades de energia.

BACILA e HORII (1979) relataram que mutantes RD de leveduras do gênero *Saccharomyces uvarum* apresentaram um crescimento menor em comparação à linhagem normal, porém, produziram duas vezes mais etanol, após 24 horas de fermentação. Estes experimentos foram realizados em meio de cultura com 2% de glicose sob condições aeróbicas.

Por outro lado ESSER *et alii* (1982), relataram que mutantes deficientes respiratórios de *Saccharomyces cerevisiae* são inferiores às linhagens normais com respeito à

produtividade de etanol sob condições aeróbicas na presença de repressão catabólica.

Experimento sobre crescimento celular e produção de etanol foi feito por JOHANSSON e SJOSTROM (1984) utilizando-se linhagem normal e mutante RD de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de aeração. A fim de comparar a produção de etanol na ausência de repressão catabólica a linhagem normal e seu mutante RD desenvolveram-se em um meio após uma fermentação de 24 horas mostra que a produção de etanol foi maior nas linhagens mutantes RD do que nas linhagens normais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Biológico: Microrganismos

Foram utilizados microrganismos tipicamente leveduras do gênero *Saccharomyces*, linhagem normal quanto à respiração (L.N.) e linhagem mutante deficiente respiratória (R.D.).

As linhagens tipo normal quanto à respiração (L.N.) foram *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904, procedentes da Micoteca do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz".

As linhagens mutantes deficientes respiratórias (R.D.), foram obtidas por transformação de células normais (L.N.) para células mutantes (R.D.) induzidas por agente mutagênico intercalador.

3.2. Obtenção de Mutantes

Os mutantes RD foram obtidos por ação de agente químico intercalador sobre células normais LN. O agente químico mutagênico usado foi o Brometo de Etídio (2,7 - diamino - 10 - ethyl - 9- phenylphenanthridinium bromide) de Sigma Chemical Company.

As linhagens mutantes RD foram obtidas por indução com o brometo de etídio sobre as células normais LN de *Saccharomuces cerevisiae* IZ-270 e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904. Para a obtenção do mutante RD, foi preparado um meio de crescimento contendo 0,6% de extrato de levedura; 0,8% de peptona e 2% de glicose. O mesmo foi distribuído em frascos erlenmeyer de 500 ml com 100 ml de meio. Após a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos e com pH inicial de 5,5, os frascos foram inoculados com as linhagens normais LN e, deixados à temperatura de 32°C, sem agitação, durante 24 horas. Dos 100 ml de cada frasco foram retirados 1,0 ml que foram inoculados em frascos com meio de cultura contendo 0,6% de extrato de levedura; 0,8% de peptona; 2% de glicose e 10 µg/ml de brometo de etídio. Os frascos contendo esse meio de cultura, porém, não adicionados de brometo de etídio foram inoculados com o mesmo volume de 1,0 ml e deixados como testemunhas. As condições de crescimento foram as mesmas citadas acima. Após as 24 horas de incubação, foi feita uma diluição usando-se tubos com 9,0 ml de água destilada e esterilizada. As diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueadas, em volu-

me de 0,1 ml em meio contendo 0,6% de extrato de levedura; 0,8% de peptona; 2% de glicose e 1% de agar-agar. O inóculo de 0,1 ml foi colocado sobre placas de Petri com o meio já solidificado, e espalhado com alça de Drygalsky. Esse plaqueamento serviu como testemunha. Mesma quantidade de inóculo foi colocada em placas de Petri com o meio já solidificado contendo 0,6% de extrato de levedura; 0,8% de peptona; 0,1% de glicose; 3% de glicerol e 1% de agar-agar. Todas as placas de Petri foram colocadas em estufa a 32°C durante 24 horas.

Todos os ensaios foram feitos com três repetições.

A seleção dos microrganismos mutantes foi feita a partir das colônias crescidas em meio contendo glicerol. Para a detecção das colônias mutantes RD foi feita uma modificação na técnica TTC (cloridrato de 2,3,5 - trifeniltetrazôlio) de OGUR *et alii* (1957). Agar-agar semi-sólido contendo 0,05% de TTC foi suavemente derramado sobre as colônias de amostras de cultura em placas YPD e YPDG. As culturas, assim cobertas com 3 a 4 mm de espessura, foram incubadas a 32°C por 1 a 3 horas. Clones mostrando capacidade para reduzir o TTC foram considerados como estoque de mutantes RD.

3.3. Conservação dos Microrganismos

Tanto as linhagens normais LN como as linhagens mutantes RD de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e *Saccha*

romyces uvarum IZ-1904 foram semeadas em tubos de ensaio com meio inclinado contendo 1% de extrato de levedura; 1% de peptona; 3% de glicose e 1% de agar-agar, e incubados em estufa a 32°C durante 24 a 48 horas e, depois conservados à temperatura de 5°C. As culturas foram renovadas a cada 30 dias.

3.4. Obtenção do Inóculo das Linhagens Normais LN e dos Mutantes RD

Para a obtenção de levedura em massa suficiente para os estudos levados a efeito neste trabalho, foram feitas semeaduras a partir de cada cultura original em erlenmeyer de 500 ml contendo 100 ml de meio YPD (1% de extrato de levedura; 1% de peptona e 5% de glicose) e colocados em incubadora com agitação de 100 rpm e temperatura de 32°C durante 24 horas mais ou menos, dependendo da intensidade do seu crescimento. A massa celular resultante era separada do sobrenadante através da centrifugação a 555 G por 10 minutos. A seguir, eram lavadas de 2 a 3 vezes com água destilada e esterilizada.

3.5. Determinações Analíticas

A clarificação do meio fermentado e a determinação dos açúcares redutores pelo método Somogyi/Nelson foram feitos segundo descrição em BACILA (1960).

Determinação de pH foi feita em peagâmetro - CORNING DIGITAL 109.

A determinação da massa celular foi feita por

secagem em estufa a 105°C até peso constante e os resultados foram dados em g ou mg de peso seco.

O meio fermentado foi destilado em aparelho de destilação tipo Micro-Kjeldahl e, em seguida, determinado o teor alcoólico através de densimetria em densímetro digital A-PAAR DMA-46, NYKANEN (1968).

3.6. Variáveis Aplicáveis para o Estudo da Fermentação Alcoólica

3.6.1. Variação do inóculo e da concentração de glicose no meio de fermentação

O inóculo foi preparado segundo descrito no item 3.4., e a massa celular resultante foi ressuspensa com água destilada e esterilizada até absorvância 1,000 em espectrofotômetro COLEMAN JR III, a 430 nm de comprimento de onda. O meio de fermentação principal apresentava as concentrações de 2% e 5% de glicose, sendo os outros constituintes extrato de levedura 1% e peptona 1%. Foram utilizados inóculos de 1,0 ml e de 10,0 ml da suspensão de células padronizadas a 1,000 de absorvância. As condições usadas para a fermentação foram temperatura de 32°C , com agitação de 100 rpm em Shaker New Brunswick e tempo de 24 horas. Ao final da fermentação determinou-se crescimento da massa celular, açúcares redutores residuais e produção de álcool.

3.6.2. Variação da concentração de glicose em fermentação com e sem agitação.

O inóculo para as fermentações realizadas com 1%, 2% e 5% de glicose foi preparado usando-se meio de cultura contendo 2% de glicose; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona. As leveduras de linhagens normais e mutantes foram inoculadas em frascos erlenmeyer de 500 ml e colocadas em um agitador a temperatura de 32°C. Após 24 horas de incubação, 10 ml de inóculo foram transferidos para três erlenmeyer por linhagem contendo 100 ml de meio de cultura com 1% de extrato de levedura; 1% de peptona, e variou-se a concentração de glicose em 1%, 2% e 5%. Frascos contendo leveduras normais e mutantes foram testados com agitação (100 rpm) e sem agitação.

Ao final de 24 horas, o açúcar redutor residual e o teor de álcool produzidos foram analisados.

Para a fermentação realizada com 10% de glicose o inóculo usado foi preparado segundo descrito em 3.4. e usado em quantidade de 1,0 grama para ambas as linhagens normais LN e seus respectivos mutantes RD. Procurou-se estudar a influência da agitação sobre a fermentação. O meio de fermentação principal foi constituído de 10% de glicose; 1% de extrato de levedura; 2% de peptona e 0,1% de fosfato monobásico de potássio. Somente uma rodada de fermentação de 24 horas foi realizada, sendo um tratamento em incubadora a 32°C, com agitação (100 rpm) e o outro em estufa a 32°C sem agita-

ção. Ao final de 24 horas, o teor de açúcar redutor residual e o teor de álcool produzido foram analisados.

3.6.3. Acompanhamento da produção de etanol em sistema agitado

O preparo do inóculo é semelhante ao descrito em 3.4. e usado em quantidade de 1,0 grama para ambas as linhagens normais LN e seus respectivos mutantes RD. O meio para a fermentação principal continha 10% de glicose; 1% de extrato de levedura; 2% de peptona e 0,1% de fosfato monobásico de potássio. Essa fermentação de 24 horas com agitação de 100 rpm, à temperatura de 32°C. Amostras foram retiradas a cada 8 horas e analisadas quanto ao seu teor de álcool. Ao final de 24 horas, determinou-se açúcares redutores residuais e massa celular em peso seco.

3.6.4. Fermentação alcoólicas consecutivas com reciclagem de fermento

Foram realizadas fermentações intermitentes porém sucessivas, em meio semi-sintético, usando-se inóculo de 1,0 grama e 0,5 grama (peso úmido). O inóculo foi preparado segundo descrito no item 3.4., e a massa celular recolhida foi filtrada a vácuo e então pesada na quantidade desejada. Inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-270 e seu respectivo mutante RD foi de 1,0 grama. O inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* IZ-1904 e seu respectivo mutante RD foi de 0,5

grama, por não terem atingido massa celular suficiente.

Essa massa celular foi inoculada em 4 frascos de erlenmeyer contendo 100 ml de meio com 10% de glicose; 1% de extrato de levedura e 1% de peptona. Esses frascos foram deixados em estufa a 32°C, sem agitação, durante 24 horas. O esquema usado encontra-se na Figura 3 e cada linha normal LN e seu respectivo mutante RD foram testados separadamente em quatro rodadas consecutivas de fermentação.

FIGURA 3: Esquema de fermentações consecutivas com reciclagem de fermento

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leveduras das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* podem crescer anaerobicamente, totalmente aeróbica ou em qualquer grau intermediário de oxigenação. O rendimento em matéria seca a partir de uma dada quantidade de açúcar, na ausência de aeração, é somente 4% daquele obtido aerobicamente. Quando glicose e amônia são utilizados como nutrientes principais, tipicamente 47,5 g de matéria seca são formadas a partir de 100 g de glicose, em crescimento aeróbico. Por outro lado, quando há ausência de oxigênio livre, para a mesma quantidade de glicose, são formadas 1,92 g de matéria seca, sendo formados ou excretados como produtos principais da fermentação, o etanol, o dióxido de carbono, componentes do óleo fúsel, glicerol e numerosos ácidos. Dependendo da taxa de oxigênio dissolvido, valores intermediários entre os dois extremos podem ser conseguidos tanto na produção de álcool quanto de matéria seca HARRISON (1971).

Os resultados obtidos no presente estudo sobre a fermentação alcoólica por leveduras das espécies acima mencionadas e respectivos mutantes deficientes respiratórios são relatados a seguir, divididos em itens de acordo com as variáveis estudadas.

4.1. Variação do Inóculo e da Concentração de Glicose no Meio de Fermentação

Conforme descrito em Material e Métodos, foram realizadas séries de ensaios de fermentação em meios nutrientes contendo respectivamente 2 e 5% de glicose como fonte de carbono, os quais foram inoculados com suspensões de leveduras padronizadas espectrofotometricamente ($D.O_{430}$) para 1,0 com quantidade de 1 ml e 10 ml. Os resultados médios obtidos nesses ensaios são mostrados nas Tabelas 1 e 2.

Observa-se na Tabela 1 que as massas celulares resultantes após 24 horas de fermentação, sob agitação, em meios com 2 e 5% de glicose, pelas duas espécies em estudo e suas respectivas linhagens mutantes RD apresentaram resultados de produção de matéria seca muito semelhantes, isto é, um padrão para linhagens normais e outro para as mutantes RD, não diferindo entre as espécies. No meio contendo 2% de glicose, a matéria seca resultante, em ambas as espécies, foi cerca do dobro para as linhagens normais em relação às mutantes RD. No meio com 5% de glicose a matéria seca resultante ainda que tenha sido maior para as linhagens normais, foi

TABELA 1: Valores médios do crescimento celular, produção de etanol e eficiência em fermentação alcoólica com inóculo de 1,0 ml.

LINHAGENS	MEIO 2% GLICOSE						MEIO 5% GLICOSE					
	Massa Seca Inoculada (mg)	Massa Seca Resultante (mg) M.S.R.	Etanol % Peso	Etanol % Volume	mg Etanol mg M.S.R.	Eficiência (%) Etanol	Massa Seca Inoculada (mg)	Massa Seca Resultante (mg) M.S.R.	Etanol % Peso	Etanol % Volume	mg Etanol mg M.S.R.	Eficiência (%) Etanol
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	1,67	261,90	0,60	0,76	1,14	58,68	1,46	323,80	1,69	2,13	2,61	65,79
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	1,44	135,85	0,79	1,00	2,91	77,22	1,17	219,55	2,07	2,61	4,71	80,61
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	0,83	272,90	0,55	0,70	1,01	54,05	0,86	322,20	1,69	2,13	2,62	65,79
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	0,99	105,95	0,82	1,03	3,87	79,53	1,01	216,60	2,07	2,71	4,78	80,61

- Tempo de fermentação de 24 horas, em estufa à 32°C, com agitação de 100 r.p.m. e meio 2% e 5% de glicose.
- Resultados médios de 3 repetições.

cerca de 50% superior que as mutantes RD. Resultados similares de crescimento também já haviam sido descritos por BACI-LA e HORII (1979), ESSER *et alii* (1982) e JOHANSSON e SJOS-TROM (1984).

Quando se efetuou variação na quantidade de inóculo, passando de 1 para 10 ml de suspensão, os resultados foram muito similares aos obtidos com o inóculo de 1 ml da suspensão, praticamente não se notando qualquer modificação (Tabela 2). É possível que no presente caso, o aumento de cerca de 10 vezes tenha sido ainda muito pequeno e que a metodologia utilizada não tenha sensibilidade suficiente para permitir maiores discussões sobre o assunto..

Para STREHAIANO *et alii* (1983) há uma diferenciação na produção de biomassa, taxa de crescimento específico e produção de etanol quando a concentração de inóculo (V/V) varia de 2 a 60%. Segundo o autor, a produção de biomassa e a velocidade de crescimento específico são decrescentes com o aumento da concentração do inóculo, entretanto, em seu estudo, as comparações são feitas com 2, 10, 20 e 60%, condições muito diferenciadas do presente estudo.

Segundo ALEXANDER e DETROY (1983) não há diferença de crescimento, taxa de produção de etanol e etanol total produzido entre linhagens normais e mutantes RD, entre-tanto, sua abordagem é acompanhando a cinética de fermentação, ou seja, leva em consideração a formação de células e produção de álcool durante a dissimilação da glicose apenas.

Os próprios autores mostram que após 24 horas em meio com 2% de glicose, os teores de etanol são significativamente diferentes entre as linhagens normais e mutantes pois nas linhagens normais o teor cai continuamente até tornar-se indetectável, presumivelmente porque quando a glicose se torna limitante, os tipos normais ou selvagens iniciam a utilização de etanol como fonte de carbono para oxidação

Os mutantes RD mitocondriais possuem sistema de transporte eletrônico não funcionais devido falha nos citocromos de modo que elas são inábeis para respirar o etanol, razão pela qual não ocorre decréscimo do teor de álcool após a utilização de toda a glicose. Esta é presumivelmente também a razão pela qual culturas de linhagens normais apresentam maior quantidade de matéria seca quando a amostra é analisada após um período superior ao requerido para consumo total da glicose. No presente estudo temos que considerar que o sistema é agitado e portanto aerado, embora ALEXANDER e DETROY (1983) considerem desprezíveis a aeração, e que tanto ocorre oxidação da glicose quanto do etanol concorrendo para aumentar a matéria seca produzida por linhagens normais.

Ainda quando se analisa a Tabela 1, em relação ao crescimento comparativo entre meio com 2 e 5% de glicose, observa-se que a matéria seca obtida na cultura com 5% não é proporcional ao obtido na cultura com 2%. Possivelmente diversos fatores contribuem para que tal fenômeno ocorra. Em meio com maior concentração de açúcar, o tempo gasto pe-

las leveduras para exaustão do açúcar é maior, iniciando o consumo oxidativo de etanol posteriormente em relação ao meio com 2%, para leveduras normais.

Existe ainda uma considerável diferença metabólica quando se compara meio com 2 e 5% de glicose, uma vez que parte da "respiração" ocorrida no meio com 2% é seguramente controlada pela maior concentração de açúcar no meio com 5% de glicose. Este fenômeno conhecido como fermentação "aeróbica" ocorre em função do "efeito Crabtree" decorrente da repressão da síntese e da atividade das enzimas respiratórias em concentrações de glicose e sacarose superiores a 0,02 a 0,1% (p/v) (HAUKELI e LIE, 1971; RICKARD e HOGGAN, 1978 ; JONES *et alii*, 1981).

Analisando-se os resultados obtidos, mostrados na Tabela 2, observa-se que a média de etanol encontrada no meio com 2% de glicose, após 24 horas, para as linhagens normais é inferior ao encontrado para linhagem RD, o que pode ser aquilatado pela eficiência fermentativa e possivelmente tal diferença ocorra, como já foi citado, tanto em função da oxidação de glicose como do próprio etanol, após exaustão do açúcar. É possível ainda que a produção tenha sido semelhante em ambas as linhagens e que a diferença encontrada se deva unicamente ao consumo do etanol pelas linhagens normais, como explicado por JOHANSSON e SJOSTROM (1984) em experimento similar. Segundo os mesmos autores, a eficiência atingida antes de iniciar o consumo de etanol foi de 75% para linha-

TABELA 2: Valores médios do crescimento celular, produção de etanol e eficiência em fermentação alcoólica com inóculo de 10,0 ml.

LINHAGENS	MEIO 2% GLICOSE						MEIO 5% GLICOSE					
	Massa Seca Inoculada (mg)	Massa Seca Resultante (mg) M.S.R.	Etanol % Peso	Etanol % Volume	mg Etanol mg M.S.R.	Eficiência (%) Etanol	Massa Seca Inoculada (mg)	Massa Seca Resultante (mg) M.S.R.	Etanol % Peso	Etanol % Volume	mg Etanol mg Massa S.	Eficiência (%) Etanol
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	13,10	156,30	0,55	0,70	1,07	54,05	14,10	327,05	1,80	2,27	2,75	70,11
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	12,15	113,00	0,76	0,97	3,36	74,90	15,50	237,40	2,05	2,58	4,32	79,69
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	11,45	215,50	0,60	0,76	1,39	58,68	9,20	276,65	1,75	2,21	3,16	68,26
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	10,62	86,80	0,76	0,97	4,38	74,90	7,10	209,52	2,11	2,65	6,32	81,85

- Tempo de fermentação de 24 horas, em estufa à 32°C, com agitação de 100 r.p.m.
- Resultados médios de 3 repetições.

gens normais e 78% para linhagens RD e a eficiência das suas linhagens RD não foram superiores pois elas produziram o dobro de glicerol em relação às linhagens normais. Nota-se que os resultados obtidos no presente trabalho aproximam aos dos citados autores mas nada podemos afirmar quanto ao glicerol que não foi determinado, bem como as possíveis diferenças de linhagens testadas. Os fatos aqui comentados podem ser mais claramente observados pela relação mg de etanol/mg de matéria seca, apresentada na Tabela 2.

As mesmas considerações podem ser feitas em relação ao meio com 5% de glicose, apenas com a diferença que a eficiência fermentativa foi superior ao meio com 2% de glicose, em função do "efeito Crabtree" e da menor taxa de oxidação, possivelmente ocorrida.

O comportamento obtido com inóculos de 1 e 10 ml novamente mostraram resultados idênticos, como já foram comentados anteriormente.

4.2. Variação da Concentração de Glicose em Fermentação com e sem Agitação

Na presente série de experimentos foram realizadas variações da concentração de glicose no meio, de 1 a 10%, em dois sistemas, com e sem agitação. Foram estudadas as influências da aeração e da concentração de glicose na produção de álcool pelas linhagens normais e respectivas mutantes RD, como serão discutidas a seguir. Os resultados obtidos estão mostrados nas Tabelas 3 a 6.

No meio com 1% de glicose fica patente a influência da agitação, portanto aeração, ao menos no que se refere ao consumo de etanol, uma vez que JOHASSON e SJOSTROM (1984) afirmam ser a produtividade igual para mutantes e linhagens normais, em estudo cinético.

Segundo ALEXANDER e DETROY (1983), a pequena quantidade de aeração não influi significativamente na produção de etanol quando comparado a condições aeróbicas, entretanto, influi na oxidação do etanol por linhagens normais tão logo a glicose se torna limitante, podendo reduzir-se o etanol a níveis não detectáveis com a contínua oxidação.

Tais afirmações parecem estar em plena consonância com os resultados presentemente obtidos e que são mostrados na Tabela 3.

O aumento da concentração de glicose para 2% no meio (Tabela 4), mostra a mesma tendência dos resultados apresentados na Tabela 3.

Embora a tendência apresentada seja semelhante com variação crescente da concentração de glicose, observa-se que além dos efeitos já discutidos em todos os experimentos anteriores, houve sempre uma menor concentração de etanol nos sistemas com agitação, mesmo nas linhagens mutantes, talvez em função da temperatura constante de 32°C utilizada nos experimentos, que possibilitaram evaporação de parte do álcool formado. Já na Tabela 6, onde a concentração do meio foi de 10% de glicose, a fermentação não se completou no

TABELA 3: Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 1,0% glicose.

LINHAGENS	COM AGITAÇÃO			SEM AGITAÇÃO		
	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Álcool Produzido (V/V)	Eficiência %	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Álcool Produzido (V/V)	Eficiência %
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	1,01	0,37	56,92	0,99	0,60	93,75
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	1,02	0,56	84,85	1,00	0,58	89,23
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	1,02	0,29	43,94	1,01	0,57	87,69
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	1,01	0,54	83,08	1,01	0,57	87,69

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C e agitação de 100 r.p.m.

- Resultados médias de 3 repetições.

TABELA 4: Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 2% de glicose.

LINHAGENS	COM AGITAÇÃO			SEM AGITAÇÃO		
	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Álcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Álcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	1,93	0,72	57,61	1,92	1,15	92,50
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	1,93	1,11	88,82	1,92	1,14	91,69
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	1,93	0,68	54,41	1,93	1,14	91,22
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	1,93	1,14	91,22	1,93	1,16	92,82

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C e agitação de 100 r.p.m.

- Resultados médias de 3 repetições

TABELA 5: Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio 5% glicose.

LINHAGENS	COM AGITAÇÃO			SEM AGITAÇÃO		
	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Alcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Alcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	4,98	2,29	71,01	5,00	2,91	89,88
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	4,99	2,69	83,25	4,99	2,90	89,75
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	4,96	2,28	70,99	4,98	2,93	90,86
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	4,99	2,78	86,04	4,97	2,88	89,49

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C e agitação de 100 r.p.m.
- Resultados médias de 3 repetições

TABELA 6: Dados médios de fermentação alcoólica em sistemas com agitação e sem agitação, com meio de 10% glicose.

LINHAGENS	COM AGITAÇÃO			SEM AGITAÇÃO		
	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Alcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)	Açúcar Consumido (g/100 ml)	Alcool Produzido (V/V)	Eficiência (%)
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	8,96	5,05	87,04	8,88	5,38	93,56
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	8,98	5,25	90,29	8,88	5,34	92,87
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	8,40	4,87	89,53	8,80	5,09	89,32
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	8,95	5,16	89,04	8,91	5,16	89,44

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C e agitação de 100 r.p.m.

- Resultados médias de 3 repetições

período em estudo de modo que os teores alcoólicos alcançados deveriam ser maiores que os encontrados, ao tornar-se limitante a concentração de glicose. Assim, as eficiências fermentativas são apenas tendências e possivelmente ainda não sofreram influência da aeração provocando oxidação do etanol pelas leveduras normais.

4.3. Acompanhamento da Produção de Etanol em Sistema Agitado

A fermentação alcoólica em meio com 9,77% a 9,93% de glicose foi acompanhada por 24 horas, em intervalos de 8 horas, quanto à produção de etanol e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 7.

As eficiências fermentativas determinadas ao fim do período revelaram serem praticamente equivalentes para todas as linhagens, o que aliás pode ser notado pelos teores alcoólicos obtidos, muito próximos. É de se notar que após 16 horas de fermentação, os teores alcoólicos encontrados para todas as linhagens era de 95 a 99% do teor alcoólico final, demonstrando que provavelmente a glicose residual já era praticamente limitante. Assim, é provável que a glicose residual encontrada, cuja diferença é da ordem de 3,0% tenha sido em função do método adotado e não propriamente residual ainda não fermentado.

A maior diferença de produção encontrada foi após 8 horas, quando as linhagens de *S. cerevisiae* produzi-

TABELA 7: Variação da produção alcoólica em sistema agitado.

LINHAGENS	AÇÚCAR CONSUMIDO (g/100 ml)	ÁLCOOL PRODUZIDO (v/v)			EFICIÊNCIA (%)
		8 h	16 h	24 h	
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	9,48	2,34	5,53	5,64	91,88
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	9,50	2,04	5,55	5,61	91,20
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	9,62	1,79	5,38	5,63	90,38
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	9,55	1,61	5,60	5,69	92,01

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C, com agitação de 100 r.p.m.

- Meio com 9,77% de glicose para *S. cerevisiae* e 9,93% de glicose para *S. uvarum*

- Resultados médias de 3 repetições

ram maior quantidade de etanol, 36 a 41% em relação ao produzido após 16 horas. As linhagens de *S. uvarum*, nesse mesmo período, produziram de 29 a 33% do etanol em relação à produção após 16 horas. Essa diferença de produção pode ser explicada pois a taxa de crescimento celular pode estar diretamente relacionada à taxa de produção de etanol, segundo a equação:

$$\mu = E \cdot v$$

onde: μ = taxa de crescimento celular (g novas células formadas/g células h)

E = eficiência de utilização do substrato para produção de massa celular

v = velocidade específica de produção de etanol, segundo MAIORELLA *et alii* (1984) e também de acordo com ZAGO (1982) que relata a maior produção de massa celular por *S. cerevisiae* do que *S. uvarum*

4.4. Fermentações Alcoólicas Consecutivas com Reciclagem do Fermento

Fermentações alcoólicas consecutivas com reciclagem do fermento por 4 rodadas foram levadas a efeito, em meio com 10% de glicose e à temperatura constante de 32°C, sendo cada rodada de 24 horas.

Tal série de experimentos foi efetuada para avaliar o comportamento fermentativo, massa celular, produção de etanol e eficiência em rodadas consecutivas que podem diferir de fermentações isoladas em rodada única, levando a

considerar diferenças que porventura possam não ocorrer ao longo de fermentações subsequentes como o que ocorre em fermentação alcoólica industrial.

Os resultados obtidos na presente série estão mostrados nas Tabelas de 8 a 11.

O açúcar consumido nas 4 rodadas consecutivas foi similar e praticamente total para todas as linhagens em estudo (Tabela 8).

As massas celulares inoculadas foram diferenciadas segundo a espécie mais em função da facilidade de obtenção de inóculo e também em função dos resultados obtidos e discutidos no item 4.1 dos Resultados, já apresentado anteriormente.

Tornou-se difícil a discussão dos resultados apresentados na Tabela 9 pois a variação da matéria seca a cada rodada parece independer da rodada anterior e a não determinação da viabilidade celular antes do início de nova rodada tornaram impossíveis as avaliações do crescimento celular. Some-se a este fato as demais variáveis do sistema como pH não controlado, possibilidade de infecções e resíduos do meio de fermentação.

O etanol produzido em cada rodada está mostrado na Tabela 10. Como já foi comentado em outros experimentos, quando a concentração de açúcar e portanto de álcool é mais elevada, praticamente, em termos de concentração final do fermentado, as linhagens normais e mutantes de uma mesma es-

TABELA 8: Glicose consumida em fermentação com reciclagem de fermento.

LINHAGENS	GLICOSE CONSUMIDA (g/100 ml)			
	1ª RODADA	2ª RODADA	3ª RODADA	4ª RODADA
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	9,90	9,92	9,91	9,94
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	9,91	9,89	9,91	9,94
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	9,83	9,87	9,94	9,89
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	9,85	9,89	9,94	9,92

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C, sem agitação, meio com 10% de glicose.

- Resultados médias de 3 repetições

TABELA 9: Massa celular produzida em fermentações com reciclagem de fermento.

LINHAGENS	MASSA SECA INOCULADA (mg/ml)	MASSA SECA RESULTANTE (mg/ml)			
		1. ^a RODADA	2. ^a RODADA	3. ^a RODADA	4. ^a RODADA
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	2,17	2,42	1,96	2,15	2,22
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	2,08	2,18	1,83	1,58	1,96
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	1,00	1,13	1,95	2,32	2,15
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	1,21	1,49	2,15	2,07	2,14

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C, sem agitação, meio com 10% de glicose.
- Massa celular inicial foi 1,0 grama (peso úmido) para *S. cerevisiae* e 0,5 grama para *S. uvarum*
- Resultados médias de 3 repetições

TABELA 10: Etanol produzido (V/V) em fermentações com reciclagem de fermento.

LINHAGENS	ETANOL PRODUZIDO (V/V)			
	1. ^a RODADA	2. ^a RODADA	3. ^a RODADA	4. ^a RODADA
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	5,08	5,38	5,24	5,12
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	5,44	5,10	5,31	5,03
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	5,85	5,78	5,60	5,60
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	5,73	5,72	5,58	5,55

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C, sem agitação, meio 10% de glicose.

- Resultados médias de 3 repetições

TABELA 11: Eficiência de fermentações com reciclagem de fermento.

LINHAGENS	EFICIÊNCIA DE FERMENTAÇÃO (%)			
	1. ^a RODADA	2. ^a RODADA	3. ^a RODADA	4. ^a RODADA
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 LN	79,24	83,75	81,66	79,55
<i>S. cerevisiae</i> IZ-270 RD	84,77	79,64	82,75	78,15
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 LN	91,91	90,44	87,00	87,44
<i>S. uvarum</i> IZ-1904 RD	89,84	89,32	86,69	86,40

- Fermentação de 24 horas, à temperatura de 32°C, sem agitação, meio com 10% de glicose.

pêcie passam a equivaler-se.

Observa-se em relação à eficiência de fermentação que as linhagens de *S. cerevisiae*, normal e mutante, tiveram um comportamento diferenciado das linhagens de *S. uvarum*, na presente série de experimentos, entretanto, a tendência de ambas as espécies ao longo das rodadas foi semelhante, ou seja, uma diminuição na eficiência em relação às rodadas iniciais. Esta série não permite concluir que *S. cerevisiae* tenha um comportamento menos fermentativo que *S. uvarum* pois em experimentos anteriores obtivemos, ainda que isoladamente, valores significativamente mais elevados que os apresentados nessas rodadas. Eficiências de cerca de 90% foram atingidas em condições similares de fermentação como o visto na Tabela 6.

Portanto, a conclusão que parece mais válida é que no decorrer das rodadas a tendência de todos é sofrerem redução de eficiência em função das variáveis de processo já citadas.

● presente estudo leva a concluir que as linhagens mutantes deficientes respiratórias apresentam algumas vantagens em relação às linhagens normais quando o substrato tem baixa concentração de açúcares e aeração pode ou deve ser utilizado para manutenção do sistema homogeneamente suspenso pois seu caráter de deficiência respiratória impede o consumo do álcool produzido.

Eventualmente, a exploração de matéria prima

de baixa concentração de açúcares para fermentação alcoólica, evitando-se a concentração do mosto que implica em gasto energético e portanto custo, deva ser conduzido com leveduras mutantes deficientes respiratórias como uma alternativa mais viável técnica e economicamente como poderá ser a exploração de materiais celulósicos ou resíduos de indústrias que ainda contenham açúcares em baixa concentração.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho com leveduras mutantes deficientes respiratórias em comparação com leveduras normais ou selvagens leva a algumas conclusões sobre suas possibilidades de utilização em caráter industrial, quais sejam:

1) O caráter de deficiência respiratória permite a utilização de sistemas aerados para homogeneização da suspensão de leveduras em fermentação, sem consideráveis consumos de etanol como ocorrem em leveduras normais ou selvagens;

2) O crescimento das leveduras mutantes deficientes respiratórias é menor que as linhagens selvagens pois não é influenciada pelo consumo oxidativo do etanol;

3) Em concentrações elevadas de glicose o efeito repressivo do substrato elimina ou reduz possíveis diferenças entre linhagens selvagens e deficientes respiratórias;

4) A produção de etanol por linhagens normais ou selvagens em meios de baixa concentração de açúcares são afetados pelo "efeito Pasteur" em meios com aeração, o que não acontece com leveduras deficientes respiratórias, entretanto, a utilização de uma ou outra linhagem é basicamente dependente da economicidade do sistema de exploração industrial.

LITERATURA CITADA

- AKBAR, M.D.; PAMELA, A.D.; MOSS, M.J. Response of the adenosine phosphate pool level to changes in the catabolic pattern of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 26:455-74, 1974.
- ALEXANDER, N.J. & DETROY, R.W. Alcohol production by mitochondrial mutants and wild type *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, Kew, 5(3):165-8, 1983.
- AVERS, C.J.; PFEFFER, C.R.; RANCOURT, M.W. Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, Baltimore, 90(2):481-94, 1965.
- BACILA, M. Apostila do curso de Fisiologia de Microrganismos, Instituto de Bioquímica da Universidade do Paraná. Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná, Curitiba, 1960. Tomo II, p.13-14.

- BACILA, M., XAVIER, A.W.; HORII, J. Induction of respiration - deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* and evaluation of their efficiency for ethanol production. In: Biochemistry and Genetics of Yeasts. New York, Academic Press, 1978. p.577-94.
- BACILA, M. & HORII, J. Improving the efficiency of alcohol production with respiration deficient yeasts mutants. Trends in Biochemical Science, Amsterdam, 4:59-61, 1979.
- BLEEG, H.S.; LETHBAK, A.; CHRISTIANSEN, C.; SMITH, K.E.; STENDERUP, A. Mitochondrial DNA and glucose repression in yeast. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, 47(2):524-30, 1972.
- BULDER, C.J.E.A. Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 30:1-9, 1964.
- CANTARELLI, C. Nécessité de l'oxygène pour le développement de la levure. Annales d'Institut Pasteur, Paris, 90:645-9, 1956.
- CHANDRASEKARAN, K.; MURUGESH, N.; JAYARAMAN, J. Glucose effect and mitochondriogenesis in yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 82(2):693-9, 1978.

CHAPMAN, C. & BARTLEY, W. The kinetics of enzymes changes in yeast under conditions that cause the loss of mitochondria. Biochemical Journal, Cambridge, 107:455-65, 1968.

COSTA, S.O.P. & BACILA, M. Induction of respiratory deficient non chromosomal "petites" of *Saccharomyces cerevisiae* by Sodium Dodecyl Sulfate. Journal of Bacteriology, Baltimore, 115:461-3, 1973.

COTTRELL, S.F. Variations in mitochondrial DNA concentration as a function of different growth conditions in yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 98(4):1091-6, 1981.

CRABTREE, H.G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. Biochemical Journal, Cambridge, 23:536-45, 1929.

DE DEKEN, R.H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. Journal of General Microbiology, London, 44:149-156, 1966.

DHARMALINGAM, K. & JAYARAMAN, J. Mechanism of glucose repression of mitochondriogenesis induction of phospholipases. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 45:1115-8, 1977.

EPHRUSSI, B.; HOTTINGUER, H.; CHIMENES, A.M. Action de l'acriflavine sur les levures. La mutation "petite colonie". Annales de l'Institute Pasteur, Paris, 76(4):351-67, 1949.

EPHRUSSI, B. & HOTTINGUER, H. Direct demonstration of the mutagenic action of euflavine on baker's yeast. Nature, London, 166:956, 1950.

ESSER, K.; SCHIMIDT, U.; STAHL, U. Ethanol and biomass production of wild strains and respiratory deficient mutants of *Saccharomyces* under anaerobic and aerobic conditions. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlim, 16:161-4, 1982.

FALES, F.W. The aerobic assimilation of glucose by yeast cells. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 235:1255-7, 1960.

FERDOUSE, M., RICKARD, PAMELA A.D.; MOSS, F.J.; BLANCH, H.W. Quantitative studies of the development of *S. cerevisiae* mitochondria. Biotechnology and Bioengineering, New York, 14:1007-26, 1972.

FERRERO, I.; ROSSI, C.; LANDINI, M.P.; PUGLISI, P.P. Role of the mitochondrial protein synthesis in the catabolite re

pression of the petite negative yeast *K. lactis*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 80(2):340-8, 1978.

FERRERO, I.; VIOLA, A.N.; GOFFEAU, A. Induction by glucose antimycin-insensitive, azide-sensitive respiration in the yeast *Kluyveromyces lactis*. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 47:11-24, 1981.

GOLDRING, E.S.; GROSSMAN, L.I.; KRUPNICK, D.; CRYER, D.R.; MARMUR, J. The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. Journal of Molecular Biology, London, 52:323-35, 1970.

GOLDRING, E.S.; GROSSMAN, L.I., MARMUR, J. Petite mutation in yeast. Journal of Bacteriology, Baltimore, 107(1):377-81, 1971.

GORTS, C.P.M. Effects of different carbon sources on the regulation of carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam, 33:451-63, 1967.

HABOUCHA, J. & MASSCHELEIN, C.A. Étude d'une déficience respiratoire chez *Saccharomyces carlsbergensis*. Biochimica

et Biophysica Acta, New York, 38:1-11, 1960.

HARRISON, J.S. Yeast Production. In: HOCJENHULL, D.J.D., ed. Progress in Industrial Microbiology. London, Churchill Livinstone, 1971. V.10, p.129-77.

HAUKELI, A.D. & LIE, S. Experimental conditions affecting yeast growth. Journal of the Institute of Brewing, London, 77:253-8, 1971.

HORII, J. Características gerais das leveduras: classificação, morfologia, citologia, reprodução e fisiologia. In: SEMINÁRIO SOBRE TECNOLOGIA E ECONOMIA DO ALCÓOL, 1, Piracicaba, 1980. São Paulo, Secr. da Indústria..., 1980. p. 27-35.

HOSONO, K.; KURAISHI, H.; AIDA, K. Effect of pantothenic acid on the respiratory activity and cytological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo, 20:351-62, 1974.

JAYARAMAN, J.; COTMAN, C.; MAHLER, H.R. Biochemical correlates of respiratory deficiency VII. Glucose repression, Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 116: 224-51, 1966.

JOHANSSON, M. & SJOSTROM, J.E. Ethanol and glycerol production under aerobic conditions by wild type, respiratory deficient mutants and a fusion product of *Saccharomyces cerevisiae*. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 20:105-10, 1984.

JONES, R.P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeasts - the effect of environmental and others variables. Process Biochemistry, Rickmansworth, 1981. Apr./May, p.42-9.

JULIANI, M.H.; COSTA, S.O.P.; BACILA, M. Non-chromosomal respiratoru deficient mutants induced by guanidine hydrochloride in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 53:531,9, 1973.

KEYHANI, E. Identification of the structural gene yeast cytochrome C oxidase subunit I on mitochondrial DNA. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 89(4):1212-6, 1979.

LEHNINGER, A.L. Bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, 1977. V.4, p.644-5.

LEMOIGNE, M.; AUBERT, J.P.; MILLET, M.J. La production d'alcool et le rendement de croissance de la levure de boulan

gerie cultivée en aérobiose. Annales de L'Institute Pasteur, Paris, 87(4):427-39, 1954.

LINDEGREN, C.C.; NAGAI, S.; NAGAI, H. Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel. Nature, London, 182:446-8, 1958.

LINDENMAYER, A. & SMITH, L.S. Cytochromes and other pigments of baker's yeast grown aerobically and anaerobically. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 93:445-61, 1964.

MAIORELLA, B.L.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Economic Evaluation of Alternative Ethanol Fermentation Processes. Biotechnology and Bioengineering, New York, 26(9):1003-25, 1984.

MOUSTACCHI, E. & WILLIAMSON, D.H. Physiological variations in satellite components of yeast DNA detected by density gradient centrifugation. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 23(1):56-61, 1966.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation of substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, 22:2375-81, 1980.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. A comparative study of the

- inhibitory effect of ethanol and substrates on the fermentation rate of parent and a respiratory deficient mutant. Biotechnology Letters, Kew, 3:351-56, 1981.
- MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Utilization of a respiratory deficient mutant for alcohol production. Journal of Fermentation Technology, Osaka, 60:25-9, 1982.
- NAGAI, S.; YANAGISHIMA, N.; NAGAI, H. Advances in the study of respiration deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms. Bacteriological Reviews, Baltimore, 25(4): 404-26, 1961.
- NAGLEY, P. & LINNANE, A.W. Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 39(5):989-96, 1970.
- NEGROTTI, T. & WILKIE, D. Induction of respiratory deficiency by repression of the respiratory system in a mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 153:341-9, 1968.
- NICOLAU, J. & BACILA, M. N-Acylsarcosines as inhibitors of respiration and glycolysis and glycolytic enzymes. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 129:357-61, 1969.

NYKANEN, L. Determination of the alcohol content of beverages. Pure and Applied Chemistry, Elmsford, 17(2):274, 1968.

OGUR, M.; SAINT JOHN, R.; NAGAI, S. Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. Science, Lancaster, 125:928-9, 1957.

OURA, E. & SUOMALAINEN, H. Contents of cytochromes in yeast. Journal of the Institute of Brewing, London, 76:536-45, 1970.

OURA, E. Effect of aeration intensity on the biochemical composition of baker's yeast. I. Factors affecting the type of metabolism. Biotechnology and Bioengineering, New York, 1197-212, 1974.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Fungos: As Leveduras. In: Microbiologia. São Paulo, McGraw-Hill, 1981. V. 1, p. 345-63.

POLAKIS, E.S.; BARTLEY, W.; MEEK, G.A. Changes in the structure and enzyme activity of *Saccharomyces cerevisiae* in response to changes in the environmental. Biochemical Journal, Cambridge, 90:369-73, 1964.

POLAKIS, E.S.; BARTLEY, W.; MEEK, G.A. Changes in the acti-

- vities of respiratory enzymes during the aerobic growth of yeasts on different carbon sources. Biochemical Journal, Cambridge, 97:298-302, 1965.
- POLAKIS, E.S. & BARTLEY, W. Changes on the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth of different carbon sources. Biochemical Journal, Cambridge, 97:284-97, 1965.
- RAUT, C. & SIMPSON, W.L. The effect of X-rays and ultraviolet light of different wave-lengths on the production of cytochrome deficient yeasts. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 57:218-28, 1955.
- REILLY, C. & SHERMAN, F. Glucose repression of cytochrome a synthesis in cytochrome deficient mutants of yeast. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 95:640-51, 1965.
- RICKARD, P.A.D.; MOSS, F.J.; GANEZ, M. The effects of glucose and oxygen on the cytochromes and metabolic activity of yeast batch cultures *Saccharomyces* sp. Biotechnology and Bioengineering, New York, 13:1-16, 1971.
- RICKARD, P.A.D. & HOGAN, C.B.J. Effects of glucose on the activity and synthesis of fermentative and respiratory pathway of *Saccharomyces* spp. Biotechnology and Bioengi-

neering, New York, 20:1105-10, 1978.

RICKARD, P.A.D. & HEWETSIB, J.W. Effects of glucose on the activity and synthesis of fermentative and respiratory pathways of *Candida utilis*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 21:2337-9, 1979.

SARACHEK, A. The induction by Mn of heritable respiration deficiency in non-dividing populations of *Saccharomyces*. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 33:227-39, 1959.

SARACHEK, A. & FOWLER, G.L. The induction by allyl glycine of heritable respiratory deficiency in *Saccharomyces* and its reversal by sulphun amino acids. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, 5:583-8, 1959.

SCHATZ, G. The isolation of possible mitochondrial precursor structures from aerobically grown baker's yeast. Biochemical and Biophysical Research Communication, New York, 12(6):448-51, 1963.

SCHATZ, G. & KLIMA, J. Triphosphopyridine nucleotide: cytochrome c reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: a microsomal enzyme. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 81:448-61, 1964.

- SILHANKOVA, L.; SAVE, J.; MOSTEK, J. Respiratory deficient mutants of bottom brewer's yeast. I. Frequences and types of mutant in various strains. Journal of the Institute of Brewing, London, 76:280-8, 1970.
- SIRO, M.R. & LOVGREN, T. Influence of glucose on the alpha glucosidase permease activity of yeast. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 7:59-66, 1979.
- SLATOR, A. Studies in fermentation. I. The chemical dynamics of alcoholic fermentation by yeast. Journal of the Chemical Society, London, 89:128-142, 1906.
- SLONIMSKI, P.P. & EPHRUSSI, B. Action de l'acriflavine sur les levures. V. Le système des cytochromes des mutants "petite colonie". Annales de L'Institute Pasteur, Paris, 77: (1):47-63, 1949.
- SLONIMSKI, P.P. Action de l'acriflavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants "petite colonie". Annales de L'Institute Pasteur, Paris, 76(6): 510-30, 1949.
- SLONIMSKI, P.P.; PERRODING, G.; CROFT, J.H. Ethidium Bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation of cells into respiratory deficient nonchromos-

somal "petites". Biochemical and Biophysical Research Communications, New York, 30(3):232-9, 1968.

SMITH, D.G.; MARCHANT, R.; MAROUDAS, N.G.; WILKIE, D. A comparative study of the mitochondrial structure of petite strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, London, 56:47-54, 1969.

SOLS, A.; GANCEDO, C.; DELAFUENTE, G. Energy-Yielding Metabolism in Yeasts. In: ROSE, A.R. & HARRISON, J.S. The Yeasts. New York, Academic Press, 1971. V.2, p.271-333.

STANIER, R.Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E.A. Genética Microbiana: Estrutura e Função do Gene. In: Mundo dos Microbios. São Paulo, Edgard Blücher, 1969. p.506-17.

STIER, T.J.B. & CASTOR, J.G.B. On the production and use of permanently altered strains of yeast for studies of "in vivo" metabolic organization. Journal General Physiology, Baltimore, 25:229-33, 1941.

STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. Biotechnology Letters, Kew, 5(2):135-140, 1983.

SUOMALAINEN, H. & OURA, E. Yeast Nutrition and Solute Uptake

- ke. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The Yeasts. New York, Academic Press, 1971. V.2, p.3-74.
- TAVLITZKI, H. III Étude de la croissance de mutants "petite colonie". Annales de L'Institute Pasteur, Paris, 76(6): 497-509, 1949.
- TUSTANOFF, E.R. & BARTLEY, W. The effect of glucose on the development of respiration by anaerobically grown yeast. Canadian Journal of Biochemistry, Ottawa, 42:651-65. 1964.
- WALSH, R.M. e MARTIN, P.A. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. Journal of the Institute of Brewing, London, 83:169-172, May-June/1977.
- WARING, M.J. Structural requeriments for the binding of Ethidium to nucleic acids. Biochimica et Biophysica Acta, New York, 114:234-44, 1966.
- WATKINS, P.D.; BRANDT, P.M.; MCCLARY, D.O. Selection and characterization of acriflavine induced mutants of *Candida albicans*. Antonie Van Leeuwenhoek, Amsterdam, 40:153-60, 1974.
- WHELTON, R. & PHAFF, H.J. A non-respiratory variant of *Sac-*

charomyces cerevisiae. Science, Lancaster, 105:44-5, 1947.

WHITE, J. & MUNNS, J. Influence of temperature on yeast growth and fermentation. Journal of the Institute of Brewing, London, 57:280, 1951.

YERUSHALMI, L. & VOLESKY, B. Experimental bioenergetics of *S. cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 23(10):2373-90, 1981.

XAVIER, A.W. Metabolismo da glicose em linhagens suficientes e deficientes respiratórias de *Saccharomyces cerevisiae*. São Paulo, 1976 (Doutoramento-Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP).

ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 125p. (Doutoramento-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP).

ZIFFER, J. Carbohydrate repression effects in the high corn ethanol fermentation system. Biotechnology Letters, Kew, 5(12):799-804, 1983.