

PRODUÇÃO DE GLICEROL POR LINHAGENS DE
Saccharomyces
DURANTE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

LUIZ EDUARDO GUTIERREZ¹

RESUMO: A pesquisa foi realizada para comparar os efeitos de diversos fatores (temperatura, pH, concentração de sacarose, 2,4-dinitrofenol e fontes de nitrogênio) sobre a produção de glicerol por *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 e *Saccharomyces cerevisiae* (M-300A e de panificação) durante a fermentação alcoólica. A quantidade de glicerol foi fortemente influenciada pela linhagem da levedura. Com a levedura IZ-1904 houve menor produção de glicerol do que M-300-A e de panificação em todas as condições estudadas. Mais glicerol foi significativamente formado por fermentação a 34°C do que a 25°C e 12°C. Em pH 4.5 houve maior produção de glicerol do que a pH 3.0. A adição de 18 ppm de 2,4-dinitrofenol provocou decréscimo no glicerol formado e esse decréscimo foi maior com as leveduras M-300-A e de panificação do que com IZ-1904. O aumento da concentração de sacarose levou a maior produção de glicerol.
Termos para Indexação: glicerol, fermentação alcoólica, *Saccharomyces*.

GLYCEROL PRODUCTION OF STRAINS OF
Saccharomyces
DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: This study was carried out to compare the effects of several factors (temperature, pH, sucrose concentration, 2,4-dinitrophenol and nitrogen sources) on glycerol production by

¹ Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo/USP. 13400-Piracicaba-SP e CEBTEC/FEALQ.

Saccharomyces uvarum IZ-1904 and *Saccharomyces cerevisiae* (M-300-A and baker's yeast) during alcoholic fermentation. The strain of yeast strongly influenced the amount of glycerol. With IZ-1904 there was lower production of glycerol than M-300-A and baker's yeast in all conditions studied. Significantly more glycerol was formed by fermentation at 34°C than at 25°C and 12°C. At pH 4.5 there was higher glycerol production than at pH 3.0. Addition of 18 ppm 2,4-dinitrophenol decreased the amount of glycerol formed, and the decrease was greater with M-300-A and baker's yeast than IZ-1904. The increase of sucrose concentrations led to a higher production of glycerol.

Index Terms: Glycerol, *Saccharomyces*, alcoholic fermentation.

INTRODUÇÃO

As leveduras durante a fermentação alcoólica produzem além de etanol e gás carbônico, compostos secundários como glicerol, álcoois superiores, ácidos pirúvico e succínico, sendo que o glicerol pode ser considerado como o mais importante componente do ponto de vista quantitativo. Segundo BRUMM & HEBEDA (1988) o glicerol formado corresponde de 8 a 15g por 100g de etanol enquanto que OURA (1977) relatou de 0,03 a 0,05g de glicerol por g de glucose.

O processo de formação de glicerol por levedura está diretamente correlacionado com o balanço de redox da célula. OURA, (1977) relatou que a formação do ácido succínico acarreta maior produção de NADH e portanto aumentando o glicerol formado, NORDSTROM (1966) verificou que a biossíntese do material celular é um processo que produz NADH e assim também contribui para a formação de glicerol.

A importância do glicerol na fermentação alcoólica está relacionada com a qualidade da bebida alcoólica como relatado por

RANKINE & BRIDSON (1971) para vinho e por PARFAIT & JOURET (1980) para rum. Para a produção de etanol nas destilarias a formação de glicerol é indesejável, pois reduz a eficiência da fermentação como demonstrado por OURA (1977) e BRUMM & HEBEDA (1988).

Diversos fatores interferem com a formação de glicerol na fermentação alcoólica, como a linhagem de levedura (RADLER & SCHUTZ, 1982), componentes do meio como sulfito (RANKINE & BRIDSON, 1971), atividade da água (KENYON et alii, 1986), pH do meio (NEISH & BLACKWOOD, 1950), pressão osmótica (PANCHAL & STEWART, 1980), concentração de ácido pantotênico (NORDSTROM, 1962).

As leveduras mais utilizadas para a produção de etanol pela via fermentativa no Brasil são *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação), *S.cerevisiae* M-300-A e *S. uvarum* IZ-1904. É o objetivo deste trabalho determinar as diferenças entre essas leveduras quanto a produção de glicerol em diversas condições de temperatura, pH, concentração de sacarose, fontes de nitrogênio e uso do inibidor 2,4-dinitrofenol.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo: foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A fornecida pelo Departamento de Genética da ESALQ/USP e *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 fornecida pelo Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ/USP e *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação Fleischmann). As leveduras foram multiplicadas anaerobiamente na presença de ácido oleico e ergosterol conforme descrito anteriormente (GUTIERREZ, 1989).

Meio de fermentação: o meio utilizado nos ensaios de fermentação apresentou a seguinte composição por litro: sacarose 80 a 160g. K_2HPO_4

1,3g, MgSO₄ 0,9g, CaCl₂ 0,16g, ácido cítrico 6 g, extrato de levedura 2,5 e 5g. O pH foi acertado a 3.0, 4.0 e 4.5 com solução de KOH 5N.

Ensaio de fermentação: 80 ml dos meios contidos em frascos cônicos de 125 ml foram inoculados com suspensões das leveduras de modo a proporcionar o mesmo número de células inicial (3 a 4×10^7 células/ml) e a quantidade expressa em matéria seca foi a 160 mg/100 ml para a levedura de panificação, 80 mg para IZ-1904 e 120 mg para M-300-A. As fermentações foram acompanhadas por pesagens para se determinar o CO₂ produzido e o final da fermentação. Após o final da fermentação foram feitas determinações da matéria seca produzida e glicerol. Foram realizados tratamentos: Temperatura (12, 25 e 34°C), pH (3.0, 4.0 e 4.5), concentração de sacarose (8, 11, 14 e 16%), inibidor 2,4-dinitrofenol (18 ppm) e fontes de nitrogênio (420 ppm de N amoniacal, 420 ppm N uréia, 0,25 e 0,50% de extrato de levedura).

Matéria seca: 8 ml do meio fermentado foram centrifugados a 3000 rpm durante cinco minutos. O precipitado foi lavado com 8 ml de água gelada, centrifugado e transferido para estufa a 100-105°C durante 8 horas. Por diferença com a matéria seca do inóculo obteve-se o crescimento da levedura.

Glicerol: o sobrenadante do meio centrifugado foi utilizado para a determinação do glicerol pelo método colorimétrico de oxidação com metaperiodato seguido de reação de formaldeído formado com acetil-acetona e amônia segundo descrito em ZAGO et alii (1989).

Análise estatística: foi adotado o delineamento de parcelas subdivididas com 3 repetições segundo GOMES (1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os teores de glicerol dos vinhos obtidos em três temperaturas com as leveduras M-300-A, IZ-1904 e de panificação. A levedura IZ-1904 apresentou a menor formação de glicerol que foi significativamente diferente das demais leveduras nas três temperaturas estudadas. Com o aumento da temperatura ocorreu maior formação de glicerol nas leveduras IZ-1904 e de panificação com exceção de M-300-A que apresentou redução de 12°C para 25°C. A maior produção de glicerol em temperaturas mais elevadas também foi relatada por UCHIMOTO & CRUESS (1952) e RANKINE & BRIDSON (1971). Com o aumento da temperatura houve maior excreção de aminoácidos pelas leveduras (LEWIS & PHAFF, 1964) e também menor formação de material celular (GUTIERREZ, 1989). Assim, era de se esperar uma menor formação de glicerol pois segundo NORDSTROM (1966) a formação de material por ser processo gerador de NADH acarreta maior formação de glicerol. Por outro lado, a atividade enzimática aumenta com a temperatura como verificado para o piruvato carboxilase por CAZZULO & STOPPANI (1967). Com a maior atividade dessa enzima poderia ocorrer maior formação de ácido succínico que, segundo OURA (1977), está relacionado com a formação de glicerol.

Na Tabela 2 são apresentados os teores de glicerol em quatro concentrações de sacarose. Com o aumento da sacarose ocorreu aumento significativo na produção de glicerol em todas as concentrações para as leveduras M-300-A e de panificação e no caso da IZ-1904 não houve aumento significativo de 14 para 16% de sacarose. A menor formação de glicerol foi observada para IZ-1904 e a maior para levedura de panificação. Aumentando-se a concentração de açúcar do meio de fermentação ocorreu aumento no teor de glicerol confirmando observações de

Tabela 1 - Teores de glicerol (g/100ml) produzidos por três *Saccharomyces* com 14% sacarose, pH 4.0; 0,25% de extrato de levedura em três temperaturas.

LEVEDURAS	TEMPERATURAS		
	12 ± 1°C	25 ± 1°C	34 ± 1°C
M-300-A	0,40	0,39	0,52
Panificação	0,36	0,41	0,58
IZ-1904	0,26	0,30	0,41

d.m.s. 5% (leveduras) = 0,076

d.m.s. (temperatura) = 0,156

c.v. = 1,65%

c.v. = 3,79%

Tabela 2 - Teores de glicerol (g/100ml) produzidos por três *Saccharomyces* em pH 4.0 a 34 ± 1°C, com ± 0,25% de extrato de levedura em quatro concentrações de sacarose.

LEVEDURAS	% SACAROSE			
	8	11	14	16
M-300-A	0,31	0,42	0,52	0,56
Panificação	0,31	0,35	0,41	0,62
IZ-1904	0,25	0,35	0,41	0,42

d.m.s. 5% (leveduras) = 0,018

d.m.s. (sacarose) = 0,018

c.v. = 4,54%

c.v. = 3,33%

BRUMM & HEBEDA (1988) que argumentaram que essa maior produção seria provocada pelo processo de regeneração do NAD enquanto que PANCHAL & STEWART (1980) e KENYON et alii (1986) explicaram pelo aumento da pressão osmótica do meio com a maior concentração de açúcares.

O efeito do aumento da concentração de sacarose sobre a produção do glicerol também poderia ser explicado pelo aumento da atividade de enzimas glicolíticas e redução na atividade da álcool desidrogenase com o aumento da concentração do açúcar conforme observado por HOMMES (1966). Reduzindo a atividade da álcool desidrogenase, a regeneração do NAD deve ocorrer pela glicerol-3-fosfato desidrogenase.

Com o aumento da concentração de glucose do meio ocorreu maior formação de ácido succínico (HEERDE & RADLER, 1978) cuja produção acarreta maior formação de glicerol (OURA, 1977).

Na Tabela 3 podem ser observados os teores de glicerol obtidos de fermentações em dois valores de pH. Nas três leveduras estudadas ocorreu aumento no teor de glicerol com a variação de pH 3.0 para pH 4,5, tendo a levedura IZ-1904 apresentado a menor formação de glicerol. A maior formação de glicerol em valores de pH mais elevado também foram observadas por NEISH & BLACKWOOD (1950) e RANKINE & BRIDSON (1971).

Com o aumento do pH do meio de fermentação ocorreu maior formação de ácido acético (KUNKEE & AMERINE, 1970) devido provavelmente a atividade da acetaldéido desidrogenase (SOLS et alii, 1971). Ocorrendo maior formação de ácido acético também deve ocorrer maior formação de glicerol como previsto pela equação de GENEVOIS (1950). Também NORDSTROM (1962) verificou menor formação de glicerol com a diminuição do ácido acético.

Na Tabela 4 é apresentado o efeito do inibidor 2,4-dinitrofenol (DNP) sobre a produção de glicerol nas três leveduras estudadas,

Tabela 3 - Teores de glicerol (g/100ml) produzidos por três *Saccharomyces* com 14% sacarose, 0,5% de extrato de levedura, $34 \pm 1^\circ\text{C}$ em dois valores de pH.

LEVEDURAS	pH	
	3.0	4.5
M-300-A	0,41	0,46
Panificação	0,47	0,50
IZ-1904	0,32	0,35

d.m.s. 5% (leveduras) = 0,052

d.m.s. 5% (pH) = 0,156

c.v. = 5,14%

c.v. = 4,39%

Tabela 4 - Teores de glicerol (g/100ml) produzidos por três *Saccharomyces* com 14% sacarose, $34 \pm 1^\circ\text{C}$, 0,5% de extrato de levedura, pH 4.0 com adição de 18 ppm de 2,4-dinitrofenol (DNP).

LEVEDURAS	DNP	
	0	18 ppm
M-300-A	0,45	0,39
Panificação	0,46	0,39
IZ-1904	0,33	0,31

d.m.s. 5% (leveduras) = 0,032

d.m.s. 5% (DNP) = 0,0096

c.v. = 3,45%

c.v. = 2,31%

podendo ser observado que ocorreu redução nessa produção com a adição de 18 ppm do inibidor, confirmando observações de AMIN et alii (1984) para *Schizosaccharomyces bayanus* e *Schizosaccharomyces pombe*.

DURO & SERRANO (1981) relataram menor formação de ácido succínico na presença de DNP. Como o ácido succínico está relacionado com a formação de glicerol segundo a equação de GENEVOIS (1950), a redução de ácido succínico vai acarretar menor formação de glicerol.

Como a produção de glicerol também está relacionada com o crescimento da levedura (BATTLEY, 1960; NORDSTROM, 1966), e que p DNP reduz o crescimento celular (GUTIERREZ, 1989), pode-se dizer que a menor formação de glicerol na presença de DNP poderia ser explicada pela menor produção de material celular. O inibidor do DNP estimulou a fermentação endógena de trealose e glicogênio (ROTHSTEIN & BERKE, 1952), o que provocaria a menor formação de matéria seca e portanto de glicerol.

Os teores de glicerol obtidos de fermentações com quatro fontes de nitrogênio podem ser observados na Tabela 5. A levedura IZ-1904 apresentou a menor formação quando se usou extrato de levedura (0,25 e 0,50%) e maior quando foi utilizada 420 ppm de nitrogênio na forma amoniacal e de uréia. Aumentando-se a quantidade de extrato de levedura ocorreu redução no glicerol para as três leveduras estudadas. Este fato ocorreu devido ao maior fornecimento de aminoácidos com o extrato de levedura. HARRISON & GRAHAM (1970) relataram que com a adição de aminoácidos ocorreu menor formação de glicerol.

Com a adição de aminoácidos a levedura não desviaria açúcar para essa formação resultando em menor produção de glicerol. Quando se utiliza nitrogênio amoniacal ou uréia ocorre desvio do ácido pirúvico para a formação de aminoácidos resultando em alteração no balanço

Tabela 5 - Teores de glicerol (g/100ml) produzidos por três *Saccharomyces* com 14% sacarose, pH 4.0 a $34 \pm 1^\circ\text{C}$, com quatro fontes de nitrogênio. (E.L. = extrato de levedura).

LEVEDURAS	FONTES DE NITROGÊNIO		
	420 ppm $^{\text{NH}_4^+}$	420 ppm N uréia	0,25% E.L. 0,50% E.L.
M-300-A	0,47	0,49	0,52 0,45
Panificação	0,67	0,52	0,58 0,46
IZ-1904	0,58	0,65	0,41 0,33

d.m.s. 5% (leveduras) = 0,013 d.m.s. (fontes) = 0,21

C.V. = 2,72%

C.V. = 3,36%

de redox e assim ocasionando maior produção de glicerol.

De maneira geral a levedura IZ-1904 apresentou a menor formação de glicerol enquanto que a levedura de panificação apresentou os maiores teores nas condições estudadas, provavelmente devido a maior atividade da álcool desidrogenase e menor atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase como evidenciado por RADLER & SCHUTZ (1982).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, G.; P. STANDAERT & H. VERACHTERT. Effects of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. Applied Microbiology, Berlin, 19: 91-9, 1984.
- BATTLE, E.H. Growth-reaction equations for *Saccharomyces cerevisiae*. Physiologia Plantarum, Kobenhavn, 13: 192-203, 1960.
- BRUMM, P.J. & HEBEDA, R.E. Glycerol production in industrial alcohol fermentations. Biotechnology Letters, Surrey, 10 (9): 677-82, 1988.
- CAZZULO, J. J. & STOPPANI, A. O. M. Purification and properties of pyruvate carboxylase from baker's yeast. Archive of Biochemistry and Biophysics, New York, 121: 596-608, 1967.
- DURO, A.F. & SERRANO, R. Inhibition of succinate production during yeast fermentation by deenergization of the plasma membrane. Current Microbiology, New York, 6: 111-3, 1981.
- GENEVOIS, L. Essais de bilans de la fermentation alcoolique due aux. cellules de levedures. Biochimica Biophysica Acta, Amsterdam, 4: 179-92, 1950.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental. 4.ed. São Paulo, Nobel, 1970. 430p.

- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Sacchharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 160p. (Livre-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- HARRISON, J.S. & GRAHAM, J.C. Yeasts in distillery practice. In: ROSE, A.H. & HARRISOM, J.S. eds. The Yeasts. London, Academic Press, 1970, v.3, p.283-348.
- HEERDE, E. & RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology, Berlin, 117: 269-76, 1978.
- HOMMES, F.A. Effect of glucose on the level of glycolytic enzymes in yeast. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 114: 231-3, 1966.
- KENYON, C.P.; PRIOR, B.A.; VUUREN, H.J.J. van. Water relations of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. Enzyme and Microbial and Technology, Stonehan, 8: 461-4, 1986.
- KUNKEE, R.E. & AMERINE, M.A. Yeasts in wine-making. In: ROSE, A.H. & HARRISOM, J.S., eds. The Yeasts. London, Academic Press, 1970. v.3, p.5-71.
- LEWIS, M.J. & PHAFF, H.J. Realese of nitrogenous substances by brewer's yeast. III. Shock excretion of amino acids. Journal of Bacteriology, Baltimore, 87 (6): 1389-96, 1964.

- NEISH, A.C. & BLACKWOOD, A.C. Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogen ion concentrations. Canadian Journal of Technology Ontario, 29: 123-9, 1950.
- NORDSTROM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's. III. Participation of coenzyme-A. Journal of Institute of Brewing, London, 68: 398-407, 1962.
- NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen, 20 (4): 1016-25, 1966.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. Process Biochemistry, London, 12: 19-21, 35, 1977.
- PANCHAL, C.J. & STEWART, G.G. The effect osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. Journal of the Institute of Brewing, London, 86: 207-10, 1980.
- PARFAIT, A. & JOURET, C. Le glycerol dans la fermentation alcoolique des mélasses et des jus de cannes à sucre. Industries Alimentaires et Agricoles. Paris, 97(7/8): 721-4, 1980.
- RADLER, F. & SCHUTZ, H. Glycerol production by various strains of *Saccharomyces*. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, 33 (1): 36-40, 1982.
- RANKINE, B.C. & BRIDSON, D.A. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, 22: 6-12, 1971.

- ROTHSTEIN, A. & BERKE, H. Endogenous alcoholic fermentation in yeast induced by 2,4-dinitrophenol. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 36: 195-9, 1952.
- SOLS, A.; GANCEDO, C; DELAFUENTE, G. Energy yielding metalism in yeasts. In: ROSE, A. M. & HARRISOM, J.S. eds. The Yeasts. London, Academic Press, 1971. v.2, p.271-307.
- UCHIMOTO, D. & CRUESS, W.V. Effect of temperature on certain products of vinous fermentation. Food Research, Champaign, 17: 361-6, 1952.
- ZAGO, E. A.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; GUTIERREZ, L. E.; OLIVEIRA, A. J. Métodos analíticos para o controle da produção de álcool. Piracicaba, ESALQ, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989, 144p.