

PRODUÇÃO DE ÁLCOOIS SUPERIORES POR LINHAGENS DE *Saccharomyces* DURANTE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

L.E. GUTIERREZ

Departamento de Química da ESALQ/USP, C.P. 9, CEP:13.418-900, Piracicaba, SP, e CEBTEC/FEALQ.

RESUMO: A produção de álcoois superiores pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A, *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 e levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi estudada em diversas condições de temperatura, concentração de sacarose, pH, fontes de nitrogênio e com inibidor 2-4 dinitrofenol (DNP). Em todas as condições estudadas, a levedura *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 apresentou a menor formação de álcoois superiores enquanto a levedura de panificação apresentou os teores mais elevados. Com o aumento de temperatura e da concentração de sacarose ocorreu maior formação de álcool isoamílico pelas leveduras estudadas. Em pH 4,5 ocorreu menor produção de álcoois superiores do que em pH 3,0. Na presença do inibidor DNP ocorreu significativa redução ($p < 0,05$) nos teores de álcool isoamílico. As leveduras utilizadas não apresentaram o mesmo comportamento em relação ao sulfato de amônio e uréia quanto a formação de álcoois superiores.

Descritores: álcoois superiores, *Saccharomyces*, fermentação alcoólica.

PRODUCTION OF HIGHER ALCOHOLS BY *Saccharomyces* STRAINS DURING ALCOHOLIC FERMENTATION

ABSTRACT: The production of higher alcohols by *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A, *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 and baker's yeast (*S. cerevisiae*) was studied under several temperature conditions, sucrose level, pH, nitrogen sources and with 2-4 dinitrophenol (DNP). The yeast IZ-1904 showed lower production of higher alcohols than other yeasts in all conditions studied. With the increase of temperature and higher level of sucrose an increase of isoamyl alcohol production was observed. A lower formation of higher alcohols was observed at pH 4.5 than at pH 3.0. With the addition of DNP occurred a significant reduction in isoamyl alcohol content. The yeasts did not show the same production of higher alcohols in relation to urea and ammonium sulfate.

Key Words: higher alcohols, *Saccharomyces*, alcoholic fermentation.

INTRODUÇÃO

A produção de etanol pela via fermentativa é acompanhada pela formação de compostos como glicerol, ácido succínico e álcoois superiores. A presença de álcoois superiores no meio fermentativo é indesejável nas destilarias porque dificulta a obtenção do etanol puro.

No caso das bebidas alcoólicas, os álcoois superiores desempenham papel importante no aroma (RANKINE, 1967; SUOMALAINEN, 1971).

A formação de álcoois superiores nas leveduras ocorre através da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica conforme esquematizado por WEBB & INGRAHAM (1963).

No caso da bactéria *Zimomonas*, BEVERS & VERACHTERT (1976) propuseram que os mecanismos dessa síntese são comparáveis,

com pequenas diferenças, aos utilizados pelas leveduras.

Diversos fatores influenciam a formação de álcoois superiores pelas leveduras como a espécie e a linhagem (RANKINE, 1967; FAHRSMANE et al., 1985), temperatura (HOUGH & STEVENS, 1961), composição do meio (AYRAPAA, 1967 e 1971); SUOMALAINEN & KAHANPAA, 1963; GILDENHUYTS & SLAUGHTER, 1983.)

A produção de álcoois superiores acompanhou o crescimento da levedura e a formação de etanol (VOLLBRECHT & RADLER, 1974) embora NORDSTRON & CARLSSON (1965) não tenham encontrado correlação entre a formação de álcoois e o crescimento da levedura.

O objetivo do presente trabalho foi o de estudar a produção de álcoois superiores, em diversas condições, pelas leveduras de grande utilização no processo de obtenção de etanol pela via fermentativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Microorganismo: foram utilizadas a levedura *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A fornecida pelo Departamento de Genética da ESALQ/USP, *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 fornecida pelo Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da ESALQ/USP e a levedura de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) obtida no comércio. As leveduras foram multiplicadas anaerobiamente na presença de ácido oleico e ergosterol segundo GUTIERREZ (1989).

Meio de fermentação: o meio utilizado nos ensaios de fermentação apresentou a seguinte composição por litro: sacarose 80 a 160 g, K_2HPO_4 1,3 g, $MgSO_4$ 0,9 g, $CaCl_2$ 0,16 g, ácido cítrico 6 g, extrato de levedura 2,5 e 5 g. 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 de 160 mg/100 ml de meio para Fleischmann, 80 mg para IZ-1904 e 120 mg para M-300-A. As temperaturas utilizadas foram de 12°C, 25°C e 34°C. As fermentações foram acompanhadas por pesagens para se determinar o CO_2 produzido e o final do processo fermentativo. Após o final da fermentação, o meio foi centrifugado e o sobrenadante utilizado para determinação de álcoois superiores. Foram realizados diversos tratamentos: efeitos da temperatura, concentrações de sacarose, pH, do inibidor 2-4 dinitrofenol (DNP) e fontes de nitrogênio.

Álcoois superiores: foram determinados por cromatografia em fase gasosa conforme metodologia descrita em GUTIERREZ (1989).

Análise estatística: foi adotado o delineamento de parcelas subdivididas com três repetições segundo GOMES (1985).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na TABELA 1 são apresentados os teores de álcoois superiores no vinho obtido com 3 leveduras nas temperaturas de 12°C, 25°C e 34°C.

O efeito da temperatura não foi o mesmo para os álcoois analisados (n-propílico, iso-butílico e isoamílico). Não houve efeito para n-propílico para as 3 leveduras e ligeiro aumento para álcool isobutílico. A variação mais sensível e significativa ($p < 0,05$) ocorreu para álcool isoamílico, onde para as 3 leveduras estudadas, ocorreu maior produção com o aumento da temperatura.

Os resultados apresentados na TABELA 1 não concordam com as observações de DAUDT & HOUGH (1975) quando verificaram redução no teor de álcool n-propílico com o aumento da temperatura e estão de acordo para o álcool isoamílico. RANKINE (1967) também verificou decréscimo no álcool n-propílico e aumento nos álcoois isobutílico e isoamílico em temperaturas mais elevadas de fermentação. Essas diferenças provavelmente poderiam ser explicadas pela levedura utilizada e variação da temperatura, pois MERRITT (1966) relatou que a temperatura ótima para a produção de álcoois superiores foi de 30°C enquanto os dados da TABELA 1 mostram maior produção a 34°C. A maior produção nessa temperatura poderia ser explicada pelo menor crescimento das leveduras em temperaturas mais elevadas conforme observado por GUTIERREZ (1989), assim os cetoácidos não sendo utilizados para a síntese de aminoácidos, seriam convertidos em álcoois superiores, embora NORDSTROM & CARLSSON (1965) não tenham encontrado correlação entre a formação de álcoois e o crescimento da levedura.

Na TABELA 2 são apresentados os teores de álcoois superiores de vinhos produzidos por 3 leveduras em quatro concentrações de sacarose (8, 11, 14 e 16%). Não foi detectado efeito da concentração de sacarose sobre a produção do álcool n-propílico nas leveduras estudadas. Em relação ao álcool isobutílico observou-se comportamento diferente para as leveduras; a levedura IZ-1904 não apresentou variação, houve pequeno aumento para M-300-A e aumento significativo ($p < 0,05$) para levedura de panificação. Com aumento da concentração de sacarose do meio ocorreu aumento na formação do álcool isoamílico nas leveduras estudadas, sendo que o aumento foi mais sensível na levedura Fleischmann sugerindo uma maior demanda por nitrogênio, fato este sugerido por ZAGO (1982).

Os dados apresentados na TABELA 2 confirmam observações de AYRAPAA (1971). Nos ensaios realizados, a concentração de sacarose variou enquanto foi mantida fixa a concentração de

TABELA 1 - Álcoois superiores produzidos por três *Saccharomyces* em três temperaturas com 14% de sacarose, pH 4,0 e 0,25% de extrato de levedura. (Expresso em mg/litro).

Álcool n-propílico			
Temperatura	M-300-A	Panificação	IZ-1904
12°C	8,0	8,3	4,0
25°C	8,3	9,3	4,3
34°C	8,0	8,0	5,6

d.m.s. = 5% (temperatura) = 0,50

d.m.s. = 5% (leveduras) = 0,74

C.V. = 6,89%

C.V. = 8,98%

Álcool isobutílico			
Temperatura	M-300-A	Panificação	IZ-1904
12°C	56,6	62,6	34,0
25°C	49,3	63,6	33,0
34°C	55,0	77,3	37,3

d.m.s. = 5% (temperatura) = 4,33

d.m.s. = 5% (leveduras) = 4,65

C.V. = 8,11%

C.V. = 7,75%

Álcool isoamílico			
Temperatura	M-300-A	Panificação	IZ-1904
12°C	203,3	264,0	86,0
25°C	218,3	292,3	132,0
34°C	247,0	315,3	156,0

d.m.s. = 5% (temperatura) = 11,27

d.m.s. = 5% (leveduras) = 5,90

C.V. = 5,16%

C.V. = 2,41%

extrato de levedura (fonte de nitrogênio), assim provavelmente ocorreu deficiência de nitrogênio induzida pelas maiores concentrações de sacarose, provocando dessa maneira aumento na produção de álcoois superiores pois como observado por AYRAPAA (1968 e 1971) aumentando a

disponibilidade de nitrogênio ocorreu redução na formação de álcoois superiores.

Nas 3 leveduras estudadas, o aumento do pH do meio de fermentação foi acompanhado por redução na produção dos álcoois, principalmente no álcool isoamílico (TABELA 3). Segundo QUAIN

TABELA 2 - Alcoois superiores produzidos por três *Saccharomyces* em quatro concentrações de sacarose a 34°C, pH 4,0 e 0,25% de extrato de levedura (expressos em mg/litro).

Álcool n-propílico			
% sacarose	M-300-A	Panificação	IZ-1904
8	8,0	8,3	5,6
11	7,3	9,3	6,3
11	8,0	8,3	5,6
16	8,3	8,3	5,0

d.m.s. = 5% (sacarose) = 1,60
C.V. = 17,59%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 0,48
C.V. = 7,12%

Álcool isobutílico			
% sacarose	M-300-A	Panificação	IZ-1904
8	44,3	64,0	42,0
11	46,3	77,0	37,3
14	55,0	77,3	37,3
16	50,3	93,0	42,0

d.m.s. = 5% (sacarose) = 4,02
C.V. = 5,87%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 4,24
C.V. = 8,27%

Álcool isoamílico			
% sacarose	M-300-A	Panificação	IZ-1904
8	151,6	194,0	118,0
11	220,3	303,3	142,0
14	247,0	315,3	156,0
16	229,0	350,3	168,0

d.m.s. = 5% (sacarose) = 15,97
C.V. = 5,99%

d.m.s. = 5% (temperatura) = 8,80
C.V. = 4,40%

& DUFFIELD (1985) a formação de álcoois superiores seria uma necessidade para elevar pH intracelular através da descarboxilação de

cetoácidos, assim em meios com pH mais elevado a produção de álcoois superiores seria menor. Outra possível explicação seria o maior

TABELA 3 - Alcoois superiores produzidos por três *Saccharomyces* em dois valores de pH com 14% de sacarose, 34°C e 0,5% de extrato de levedura (expressos em mg/litro).

Álcool n-propílico			
pH	M-300-A	Panificação	IZ-1904
3,0	14,0	19,0	10,0
4,5	14,0	16,0	8,3

d.m.s. = 5% (pH) = 0,20
C.V. = 1,40%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 2,89
C.V. = 8,85%

Álcool isobutílico			
pH	M-300-A	Panificação	IZ-1904
3,0	57,0	76,3	67,0
4,5	52,6	71,3	62,0

d.m.s. = 5% (pH) = 1,30
C.V. = 1,89%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 6,91
C.V. = 4,45%

Álcool isoamílico			
pH	M-300-A	Panificação	IZ-1904
3,0	219,3	293,3	170,0
4,5	197,0	265,3	138,3

d.m.s. = 5% (pH) = 8,33
C.V. = 3,65%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 27,33
C.V. = 5,29%

crescimento da levedura em pH mais elevado desviando os cetoácidos para a formação de aminoácidos.

A produção dos álcoois isobutílico e isoamílico foi reduzida e a do n-propílico sofreu aumento pela adição de 2-4 dinitrofenol (DNP) como pode ser visto na TABELA 4, para quase todas as leveduras, sendo que a redução é mais acentuada para o álcool isoamílico. Para a levedura M-300-A houve redução no isobutílico enquanto que para IZ-1904 ocorreu aumento. Essa diferença de comportamento entre leveduras em relação ao

DNP já tinha sido relatada por NORDSTROM & CARLSSON (1965). Segundo AMIN et al. (1984) o inibidor DNP reduz a produção de ATP o que resulta em menor massa celular e maior formação de etanol. Com o crescimento inibido, seria menor a formação dos aminoácidos e dos cetoácidos precursores dos álcoois superiores podendo ocorrer acúmulo de NH_4^+ , que em maior quantidade estimularia a formação de álcool n-propílico como pode ser visto na TABELA 5. Outro inibidor que também provocou redução no álcool isoamílico foi o sulfito, demonstrado por GUTIERREZ (1988).

TABELA 4 - Alcoois superiores produzidos por três *Saccharomyces* com e sem 18 ppm de 2,4-dinitrofenol (DNP) com 14% de sacarose, a 34°C e 0,5% de extrato de levedura. (Expressos em mg/litro).

Álcool n-propílico			
Tratamento	M-300-A	Panificação	IZ-1904
0	10,0	13,6	6,3
18 ppm DNP	25,3	33,3	14,0

d.m.s. = 5% (Tratamentos) = 1,88

C.V. = 10,31%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 7,71

C.V. = 18,69%

Álcool isobutílico			
Tratamento	M-300-A	Panificação	IZ-1904
0	55,6	60,0	58,3
18 ppm DNP	40,0	54,6	65,6

d.m.s. = 5% (Tratamentos) = 3,04

C.V. = 5,11%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 12,58

C.V. = 9,36%

Álcool isoamílico			
Tratamento	M-300-A	Panificação	IZ-1904
0	203,0	233,0	148,0
18 ppm DNP	98,0	119,3	121,3

d.m.s. = 5% (Tratamentos) = 7,54

C.V. = 4,59%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 8,53

C.V. = 2,30%

Na TABELA 5 são apresentados os teores de alcoois superiores com a utilização de quatro fontes de nitrogênio. Com 420 ppm de nitrogênio seja na forma de uréia como na de sulfato de amônio, ocorreu maior produção de n-propílico do que com extrato de levedura. AYRAPAA (1971) também observou aumento desse álcool com o aumento da quantidade de nitrogênio no meio. A treonina desidratase, enzima responsável pela formação do ácido alfa-ceto-butírico, é estimulada por NH_4^+ (HOLZER, 1968), assim em condições de excesso de nitrogênio poderíamos encontrar

maior atividade dessa enzima o que resultaria na maior produção do n-propílico. Comparando-se uréia e sulfato de amônio pode-se observar diferenças entre as leveduras quanto a produção de alcoois superiores. Na M-300-A ocorreu maior formação de isoamílico com uréia do que com sulfato de amônio. Com o aumento da concentração de extrato de levedura pode-se observar aumento dos teores de álcool isobutílico para M-300-A e IZ-1904 enquanto para Fleishmann houve redução. Pode-se observar ainda redução nos teores de álcool isoamílico para as três leveduras estudadas.

TABELA 5 - Alcoois superiores produzidos por três *Saccharomyces* com quatro fontes de nitrogênio com 14% de sacarose, 34°C, pH 4,0. (Expressos em mg/litro).

Álcool n-propílico			
fontes	M-300-A	Panificação	IZ-1904
420 ppm N _{NH4}	38,0	47,0	23,3
420 ppm N _{uréia}	36,3	48,3	29,3
0,25% E.L. *	8,0	8,0	5,6
0,50% E.L.	10,0	13,3	7,6

d.m.s. = 5% (fontes) = 2,53

C.V. = 8,96%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 1,28

C.V. = 6,05%

Álcool isobutílico			
fontes	M-300-A	Panificação	IZ-1904
420 ppm N _{NH4}	37,0	41,3	14,3
420 ppm N _{uréia}	47,3	33,3	13,3
0,25% E.L. *	50,0	77,3	37,3
0,50% E.L.	53,6	65,6	58,6

d.m.s. = 5% (fontes) = 5,61

C.V. = 10,32%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 2,11

C.V. = 5,20%

Álcool isoamílico			
fontes	M-300-A	Panificação	IZ-1904
420 ppm N _{NH4}	101,1	103,3	61,0
420 ppm N _{uréia}	127,3	93,3	65,0
0,25% E.L. *	247,0	315,3	156,0
0,50% E.L.	188,3	230,3	154,6

d.m.s. = 5% (fontes) = 14,86

C.V. = 7,85%

d.m.s. = 5% (leveduras) = 7,30

C.V. = 5,13%

* E.L. = extrato de levedura

Em todas as condições estudadas a levedura de panificação apresentou a maior produção de alcoois superiores do que as leveduras M-300-a e IZ-1904. Essa diferença entre leveduras também

foi relatada por RANKINE (1967) e FAHRSMANE et al. (1985). A menor formação de alcoois superiores pela levedura IZ-1904 seria de grande interesse para a produção de etanol nas destilarias.

CONCLUSÕES

- 1) A levedura *Saccharomyces uvarum* IZ-1904 apresentou a menor produção de álcoois superiores em todas as condições estudadas enquanto a levedura de panificação apresentou teores mais elevados.
- 2) Com o aumento da temperatura e da concentração de sacarose ocorreu maior produção do álcool isoamílico nas 3 leveduras.
- 3) No pH 4,5 ocorreu menor produção de álcoois superiores do que em pH 3.0.
- 4) A adição de DNP provocou redução dos álcoois isobutílico e isoamílico e aumento do n-propílico.
- 5) Com adição de 420 ppm de N seja na forma de uréia como de sulfato de amônio ocorreu maior produção de álcool n-propílico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, G.; STANDAERT, P.; VERACHTERT, H. Effects of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v.19, p.91-99, 1984.
- AYRAPAA, T. Formation of higher alcohols from 14C-labelled valine and leucine. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.73, p.17-30, 1967.
- AYRAPAA, T. Formation of higher alcohols by various yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.74, p.169-178, 1968.
- AYRAPAA, T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast: dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.77, p.266-276, 1971.
- BEVERS, J.; VERACHTERT, H. Synthesis of higher alcohols in the genus *Zymomonas*. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.82, p.35-40, 1976.
- DAUDT, C.E.; HOUGH, C.S. Efeitos da variedade de microorganismos, temperatura, SO₂ e de álcoois superiores. *Revista Brasileira de Tecnologia*, São Paulo, v.6, n.4, p.301-305, 1975.
- FAHRSMANE, C.; JOURET, C.; PARFAIT, A.; GALZY, D. Production of higher alcohols and short-chain fatty acids by different yeasts used in rum fermentations. *Journal of Food Science*, Chicago, v.50, n.5, p.1427-1430, sept./oct. 1985.
- GILDENHUIJS, P.T. & SLAUGHTER, J.S. The metabolism of putrescine, spermidine and spermine by yeast in relation to the availability of magnesium. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.89, p.333-340, 1983.
- GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*. 11ª ed. Piracicaba, Nobel, 1985. 466p.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, v.45, n.2, p.359-368, 1988.
- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*. Piracicaba, 1989. 169p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HOLZER, H. Biochemistry of adaptation in yeast. In: MILLS, A.K. *Aspects of yeast metabolism*. Oxford, Blackwell, 1968, p.155-178.
- HOUGH, J.S.; STEVENS, R. Beer flavour. IV. factors affecting the production of fusel oil. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.67, p.488-494, 1961.
- MERRITT, N.R. The influence of temperature on some properties of yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.72, p.374-383, 1966.
- NORDSTROM, K.; CARLSSON, B.O. Yeast growth and formation of fusel alcohols. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.71, p.171-74, 1965.
- QUAIN, D.E.; DUFFIELD, M.L. A metabolic function for higher alcohol production by yeast. In: CONGR. EUR. BREW. CONV., 20., 1985. *Proceedings...* p.307-314, Apud: *Chemical Abstracts*, Columbus, v.105, p.41.142c.
- RANKINE, B.C. Formation of higher alcohols by wine yeasts relationship to taste thresholds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v.18, p.583-589, 1967.
- SUOMALAINEN, H.; KAHANPAA, H. Formation of fusel alcohols from amino acids with branched chains. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.69, p.473-478, 1963.
- SUOMALAINEN, H. Yeast and its effect on the flavour of alcoholic beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, London, v.77, p.164-177, 1971.

VOLLBRECHT, D.; RADLER, F. Formation of higher alcohols by amino acid auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Conversion of amino acids to higher alcohols. *Archives of Microbiology*, Berlin, v.94, n.4, p.351-358, 1974.

WEBB, A.D.; INGRAHAM, J.L. Fusel oil. *Advances in Applied Microbiology*, Washington, v.5, p.317-353, 1963.

ZAGO, E.A. Efeito da concentração de N, P, Mg, Mn e Zn na multiplicação de leveduras industriais. Piracicaba, 1982. 124 p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Received in May 26, 1993
Accepted in July 16, 1993

Enviado para publicação em 26.05.93
Aceito para publicação em 16.07.93