

**Fermentação de Carbohidratos por Células de
Saccharomyces carlsbergensis Adaptadas à
"Emulsan A1" (1)**

G. C. de MELLO AYRES

R. de CAMARGO

I. Zimotécnico

E. S. A. "Luiz de Queiroz"

(1) Recebido para publicação em 26/10/1961.

1 — INTRODUÇÃO

A Emulsan Al é um produto comercial, preparado à base de pentaclorofenol, sendo seu emprêgo preconizado nas fermentações alcoólicas, tanto para a produção de álcool como para a de aguardente, como antisséptico, bactericida e agente de melhoria das fermentações, propiciando à levedura condições mais adequadas ao seu metabolismo.

O Instituto Zimotécnico estabeleceu um plano de trabalho, com a finalidade de estudar o efeito da Emulsan Al sobre a fermentação de caldo de cana pelo *Saccharomyces carlsbergensis* e o comportamento dessa levedura face à mesma Emulsan Al aplicada em diferentes doses.

As pesquisas foram divididas em três secções: tecnológica, microbiológica e bioquímica. Na secção de tecnologia, estão sendo verificadas as características físicas e químicas das fermentações; na secção de microbiologia estudadas as características da microflora dessas mesmas fermentações, realizadas em condições assépticas e também industriais, e em presença de diferentes e progressivas doses de Emulsan Al. A secção de bioquímica se propôs a estudar a influência da Emulsan Al sobre as células de *Saccharomyces carlsbergensis* adaptadas a diferentes concentrações desse preparado comercial.

Considerando que a Emulsan Al exerce poder bactericida e fungicida, e portanto, interfere de modo violento sobre a fisiologia de bactérias e fungos, conforme o apresentado em estudos anteriores por diversos autores e, que o pentaclorofenol apresenta propriedades estimulantes sobre as leveduras, surgiu-nos a idéia de estudar comparativamente alguns aspectos do metabolismo do *S. carlsbergensis* adaptado a diferentes concentrações de Emulsan Al, em relação à fermentação de alguns carboidratos.

O presente trabalho consta justamente dos resultados dessas primeiras pesquisas.

2 — REVISÃO DA LITERATURA

Em 1945, GAI (4) publicou trabalho sôbre suas investigações realizadas em condições de laboratório utilizando-se do pentaclorofenol inclusive como antisséptico.

Em 1949, novamente BARRETO (2) apresentou trabalho sôbre o pentaclorofenol e no qual ressalta o fato de pequenas quantidades do produto evitarem ou inibirem contaminação bacteriana. Em conseqüência desta atividade bactericida, que é discutida no trabalho, houve melhoria na produção alcoólica, com até 12% de aumento. Também em môtos de melaço êstes fatos se confirmaram.

Em 1950, a KLINGER S. A. deu divulgação em seu respectivo boletim, de fatos ligado à adição de Emulsan Al ao môtos em fermentação alcoólica, esclarecendo que:

- a) a Emulsan Al evita fermentações pútridas, acética e láctica;
- b) a Emulsan Al aumenta o rendimento;
- c) age como antisséptico e, finalmente,
- d) tem ação estimulante sôbre o *Saccharomyces*.

Em 1952, a KLINGER S. A. novamente publicou nota sôbre as qualidades, características e vantagens da aplicação da Emulsan Al, em fermentações alcoólicas, acrescentando, além das supras mencionadas, mais as seguintes: economia de tempo e de dornas; não é corrosiva; é de fácil aplicação; tem pH quase neutro, etc. Neste boletim a KLINGER S. A. aconselha aplicações em doses entre 0,001% a 0,005% em relação ao mosto (v/v).

Em 1953, ALMEIDA & LIMA (1) publicaram trabalho em que traçam normas para a racional aplicação do penta-

clorofenol nos diferentes sistemas de fermentação usados no Brasil.

Em 1956 DREWS (3) verificou que derivado sódico do pentaclorofenol apresentava propriedades que evitavam infecções em fermentações alcoólicas de melaço de cana de açúcar. Podia-se prescindir ou não do uso de H_2SO_4 , à exceção para o controle de bactérias do ácido láctico, quando o emprego do ácido sulfúrico era imprescindível.

3 — MATERIAL E MÉTODOS

Nos experimentos foram utilizadas células intactas de *Saccharomyces carlsbergensis* (IZ-1834), adaptadas em sucessivas fermentações a concentrações crescentes de Emulsan Al.

A Emulsan Al foi preparada por diluição do produto comercial em água destilada, e adicionada aos balões fermentadores imediatamente antes das inoculações.

Balões Erlenmeyer contendo 1.350 ml de caldo de cana esterilizado, com 14.º Brix e suplementado com $(NH_4)_2 SO_4$ na dose de 0,2 g por cento foram utilizados para a obtenção das cédulas necessárias aos trabalhos em Warburg. Estas fermentações preliminares foram realizadas em estufas, com temperatura regulada para 28-30°C.

O volume do inóculo foi estabelecido para 150 ml por frasco, completando desta maneira um volume total de 1.500 ml de mosto inoculado.

Quando a primeira fermentação, realizada em balão isento de Emulsan Al, caiu a zero Brix, um volume de vinho de 150 ml serviu de inóculo para a fermentação seguinte, desta vez em balão adicionado de Emulsan Al na dose de 0,001% (v/v). Quando esta segunda fermentação caiu a zero Brix, nova transferência foi feita, agora para balão contendo 0,002% de Emulsan Al, e assim sucessivamente até atingir a concentração maior de 0,005% (v/v) de Emulsan Al.

Com esta seqüência de fermentações, conferiu-se ao *Saccharomyces carlsbergensis*, condição de adaptabilidade paulatina a doses crescentes de Emulsan A1.

As frações de vinho que restaram, após as inoculações, por sua vez cederam células para as experiências em Warburg.

As células então obtidas — e adaptadas aos diferentes meios de Emulsan A1 — foram em seguida ensaiadas em nanômetros de Warburg para fermentar os seguintes substratos: glicose, lactose, caldo de cana, sacarose, rafinose, maltose e galactose.

As células foram coadas em malha fina, centrifugadas e lavadas quatro vezes em KCl 0,154 M e suspensas em tampão de fosfato (KH_2PO_4 0,1 M e Na_2HPO_4 0,1 M) para pH 6,50.

Em cada frasco de Warburg foram utilizados 30 micrómoles de substrato.

O caldo de cana foi analisado para o teor em glicose e levulose (redutores), após inversão da sacarose, pelo método de Somogyi-Nelson (5,6) e em seguida diluído com água destilada para que 0,30 ml contivessem 30 micromoles de glicose redutora. Este caldo foi distribuído em tubos de ensaio, esterilizado e estocado, utilizando-se depois o seu conteúdo para fornecer o volume necessário ao experimento.

Sistema: O sistema utilizado em Warburg foi o seguinte: 2,50 ml de tampão, contendo 50 mg de células (pêso úmido) + 0,30 ml de sol. aquosa contendo 30 micromoles de substrato. $V_f = 2,80$ ml — Temperatura: 30°C. Tempo de equilíbrio: 10 minutos. Passagem de nitrogênio 10 minutos. Leituras manométricas de 15 em 15 minutos. Os substratos foram ensaiados em duplicata.

4 — RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados obtidos nos experimentos em Warburg estão sintetizados nos quadros e figuras adiante especificados.

Produção de CO₂ após 180 minutos em Warburg (em microlitros)

Células provenientes de meio: Isento de Emulsão Al	Tratamento		Caldo de cana	Sacarose	Malto	Rafinose	Lactose	Endogênio
	Glicose	Galactose						
Com 0,001 % ..	965	36	934	2025	25	841	1	20
	1050	53	1106	1946	9	1268	8	9
	1063*		1137*	2067*		1488*		
Com 0,002% ...	1026	54	1171	2217	15	1789	11	22
Com 0,003% ...	1058	43	1145	2096	5	1776	3	10
Com 0,005% ...	**1173	83	1201	2099	33	1393	21	34
	**1176*		1202*			2043*		

* Valores relativos a 210 minutos de experimento.

** Valores corrigidos para 30 micrômoles de substrato, uma vez que foram utilizados 20 micrômoles (vide fig. V).

QUADRO 2

Percentagens de CO₂ produzido em relação ao máximo permitindo pelos 30 micrômoles de substrato do sistema em Warburg (180')

	Glicose	Caldo de cana	Rafinose
Idem			
Isento	71,7%	71,1%	21%
Com 0,001% ...	78,1%	82,2%	13,7% — 37,2%*
Com 0,002% ...	76,3%	87,1%	44,9%
Com 0,003% ...	78,1%	85,1%	34,8%
Com 0,005% ...	87,4%	89,3%	44,4% — 51%*

* Percentagens obtidas com 210 minutos de Warburg.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

À análise dos resultados, verifica-se que nos ensaios realizados, não houve praticamente fermentação endógena.

Fermentação de hexoses: As hexoses utilizadas foram: alfa-D-glicose e alfa-D-galactose.

As células provenientes de todos os meios de adaptação à Emulsan A1 não fermentaram galactose, enquanto fermentaram glicose com grande facilidade. Ao final de 180 minutos de Warburg ou de 210 minutos, as curvas relativas à produção de CO₂ a partir de glicose, para todos os tipos de células estavam paralelas ao eixo das abcissas, indicando que o máximo de fermentação já fôra atingido. As células provenientes de meio adicionado de doses de Emulsan A1, porém, atingiram êsse máximo em valores mais altos que aos das células oriundas de meio isento de Emulsan A1. Enquanto as células crescidas em meio isento de Emulsan A1 fermentaram 71,7% da glicose as crescidas e adaptadas à Emulsan A1 sob as doses de 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,005%, fermentaram respectivamente, 78,1%, 76,3%, 78,1% e 87,4%. Estas percentagens derivam do cálculo de que 30 micromoles de glicose permitem um máximo teórico de obtenção de 1334

microlitros de CO₂ em condições ideais, isto é, toda a glicose sendo transformada exclusivamente em gás carbônico e álcool etílico. As células adaptadas à Emulsan A1 apresentaram, portanto, maior rendimento, sendo que o máximo de diferença entre a percentagem de fermentação das células crescidas em meio contendo 0,005% de Emulsan A1 e as não adaptadas foi da ordem de 15,7%.

Fermentação de dissacarídeos: Os dissacarídeos utilizados foram: sacarose: (alfa-D-glucopiranosose beta-D-frutofuranosídeo); maltose (4 — alfa-D-glucopiranosose — alfa-D-glucopiranosídeo), lactose (4 — alfa-D-glucopiranosose — beta-D-galactopiranosídeo) e caldo de cana. O caldo de cana foi ajustado e dosado em redutores totais, de modo a que 0,30 ml contivessem 30 micromoles de hexose redutora.

À semelhança do que aconteceu com a glicose, as células adaptadas à Emulsan A1 apresentaram maior capacidade de fermentar o caldo de cana, sendo que as provenientes de meio contendo 0,005%, fermentaram 16,2% mais que as oriundas de meio isento de Emulsan A1 (células não adaptadas). (Quadro II).

Lactose e maltose não foram fermentadas de maneira visível por todos os tipos de células utilizadas em Warburg. (Quadro I, figuras 1, 2, 3, 4, 5).

Sacarose foi fermentada em todos os casos, não havendo aparentemente, nenhuma diferença entre a atividade demonstrada pelas células provenientes de diferentes tipos de meio de cultura (com e sem Emulsan A1). Figs. 1, 2, 3, 4 e 5 — Quadro I.

Fermentação de trissacarídeos: Rafinose (0 — alfa-D-galactopiranosil (1-6) — 0 — glucopiranosil (1-2) — beta-D-frutofuranosídeo) foi o trissacarídeo utilizado.

A fermentação da rafinose sofreu grande e visível alteração nos ensaios em Warburg, quando utilizadas células adaptadas à Emulsan A1. Houve intensa aceleração nas fermentações por células adaptadas à Emulsan A1, conforme demonstram as curvas das figs. 1, 2, 3, 4, 5. Muito provavelmente este fato se relaciona com a permeabilidade da membrana celular. As células adaptadas à Emulsan A1 devem apresentar membranas com características diferentes às da-

quelas não adaptadas e, neste caso permitiriam melhores condições de permeabilidade, facilitando conseqüentemente a difusão da rafinose para o interior das células que mais rapidamente a metabolizariam. Note-se que êste efeito se acentuou no daso da rafinose, que como trissacarídeo, apresenta molécula maior que os outros carbohidratos utilizados no trabalho. Outra hipótese seria de que a Emulsan Al poderia estimular e ativar enzimas implicadas no processo de hidrólise da rafinose, liberando mais rapidamente os monossacarídeos seus constituintes, e que seriam em seguida metabolizados via o esquema glicolítico EMP. Trabalhos estão sendo conduzidos no sentido de aclarar êstes fatos.

6 — CONCLUSÕES

As células adaptadas progressivamente em Emulsan Al nas doses de 0,001%, 0,002%, 0,003% e 0,005% fermentaram galactose, lactose e maltose*.

As fermentações de glicose e caldo de cana sofreram aumentos de até 15,7% e de até 16,2% quando realizadas em Warburg por células adaptadas a meio contendo 0,005% de Emulsan Al. Para doses menores, menores aumentos em rendimento foram observados. A fermentação da rafinose sofreu grande aceleração: células adaptadas a todos teores de Emulsan Al empregados nos trabalhos fermentaram êsse trissacarídeo 2 e 3 vêzes mais rapidamente que as células não adaptadas.

7 — SUMÁRIO

Células de *Saccharomyces carlsbergensis* (IZ-1834) foram crescidas e adaptadas, progressivamente ao meio de caldo de cana esterilizado e contendo 0,001%, 0,002%, 0,003%, 0,004% e 0,00% de emulsan Al (v/v) além do tratamento testemunho isento de Emulsan Al.

Estas células, levadas a Warburg fermentaram: glicose, rafinose. Não fermentaram: galactose, maltose e lactose. Não exibiram praticamente fermentação endógena. Glicose e cal-

* As células não fermentaram maltose, em aparente discrepância com o que estabelece a sistemática para *S. carlsbergensis*. Este fato foi esclarecido em trabalho posterior por um dos autores.

do de cana tiveram seus rendimentos elevados, no caso das células utilizadas serem aquelas adaptadas aos diferentes teores de Emulsan Al. A fermentação da rafinose sofreu notável aceleração quando as células utilizadas foram adaptadas à Emulsan Al, sendo que a aceleração foi da ordem de 2 a 3 vezes àquela observada no experimento com células crescidas em meio isento de Emulsan Al. A diferença da permeabilidade entre um e outro tipo de célula parece explicar o fenômeno.

SUMMARY

Cells of *Saccharomyces carlsbergensis*, (IZ-273) were grow in esterilized sugar cane juice medium whith 0, 0,001%, 0,002%, 0,003% e 0,005% of Emulsan Al.

In Warburg apparatus the yeast cells fermented: glucose, sugar cane juice, sucrose and rafinose, and did not ferment: galactose, maltose and lactose. These showed a very slow endogenous fermentation. For glucose and sugar cane juice the cells from medium with Emulsan Al demonstrated a considerable yeld. The rate of fermentation of rafinose was strongly increased with cells from the medium with Emulsan Al (2 — 3 times faster).

9. LITERATURA CITADA

1. ALMEIDA, J. R. e U. de A. Lima — 1953 — O emprêgo do Emulsan Al na fermentação alcoólica. Bol. do Instituto Zimotécnico, 6: 1 — 24.
2. BARRETO, A. — 1949 — Policlorofenóis em fermentação de carboidratos. Bol. da Cia. Química Mosanto. U. S. in Chem Abstr. 43 (17): 6782.
3. DREWS, W. — 1956 — Pentachlorophenol as an aid in alcoholic fermentation of cane sugar molasses. Branntweinwirtschaft. 78: 477-482.
4. GAI, F. — 1945 — Os antissépticos na fermentação alcoólica. Bol. Soc. Brasil de Agronomia. 8 (4): 377-382.

5. NELSON, N. — 1944 — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
6. SOMOGYI, N. — 1945 — A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**: 61-68.

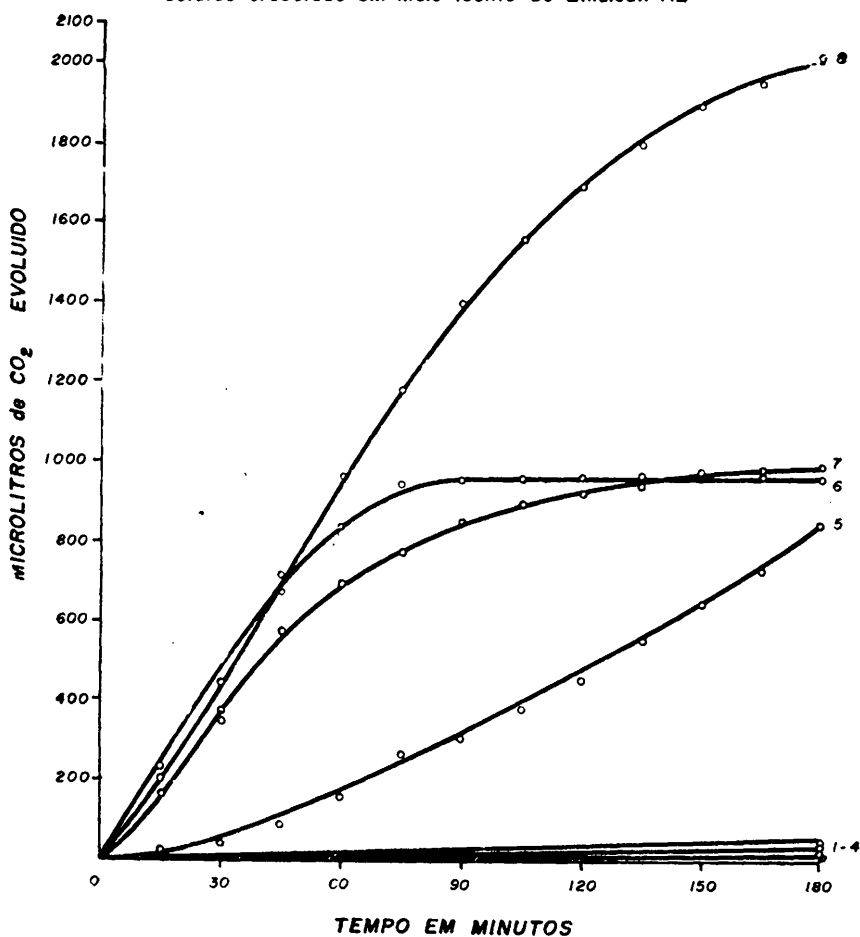
*Saccharomyces carlsbergensis***Fermentação de carboidratos***Células crescidas em meio isento de Emulsan AL*

Fig. 1 — 1 — Endógeno; 2 — Lactose; 3 — Maltose; 4 — Galactose; 5 — Rafinose; 6 — Glicose; 7 — Caldo de cana; 8 — Sacarose

Saccharomyces carlsbergensis

Fermentação de carbohidratos

Células crescidas em meio contendo 0.001 % de Emulean AL

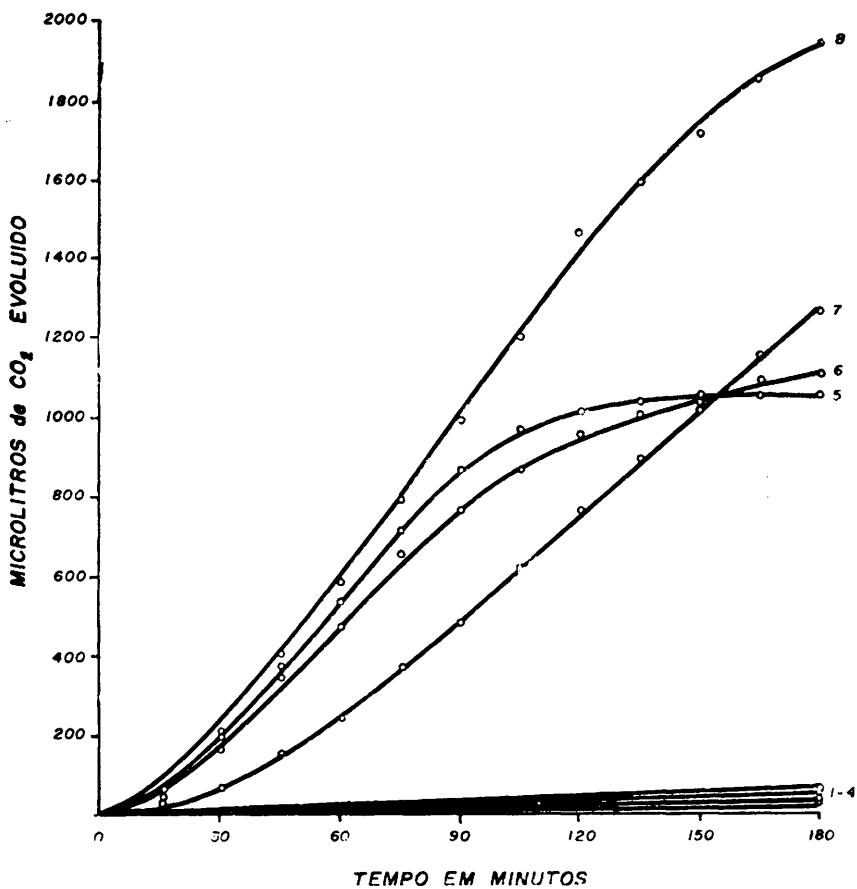


Fig. 2: 1 — Endógeno; 2 — Lactose; 3 — Maltose; 4 — Galactose; 5 — Glicose; 6 — Caldo de cana; 7 — Rafinose; 8 — Sacarose.

Saccharomyces carlsbergensis

Fermentação de carboidratos

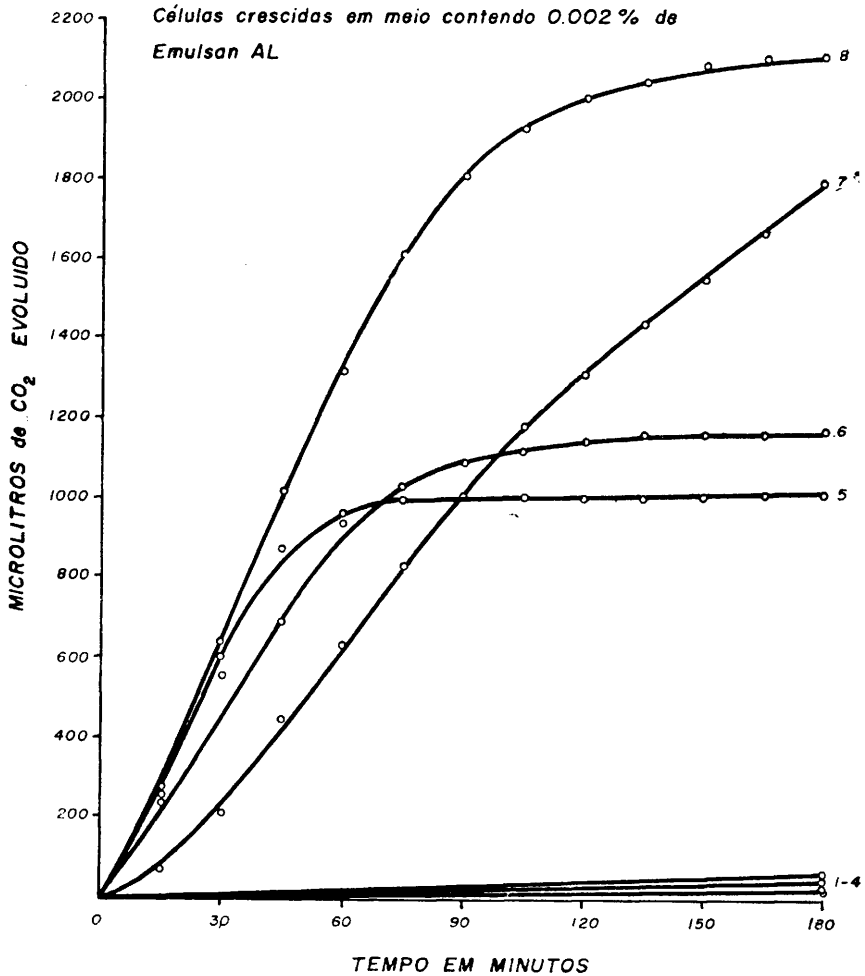


Fig. 3: 1 — Endógeno; 2 — Lactose; 3 — Maltose; 4 — Galactose;
5 — Glicose; 6 — Caldo de cana; 7 — Rafinose; 8 — Sacarose.

Saccharomyces carlsbergensis

Fermentação de carboidratos

Células crescidas em meio contendo 0.005 % de Emulsan AL

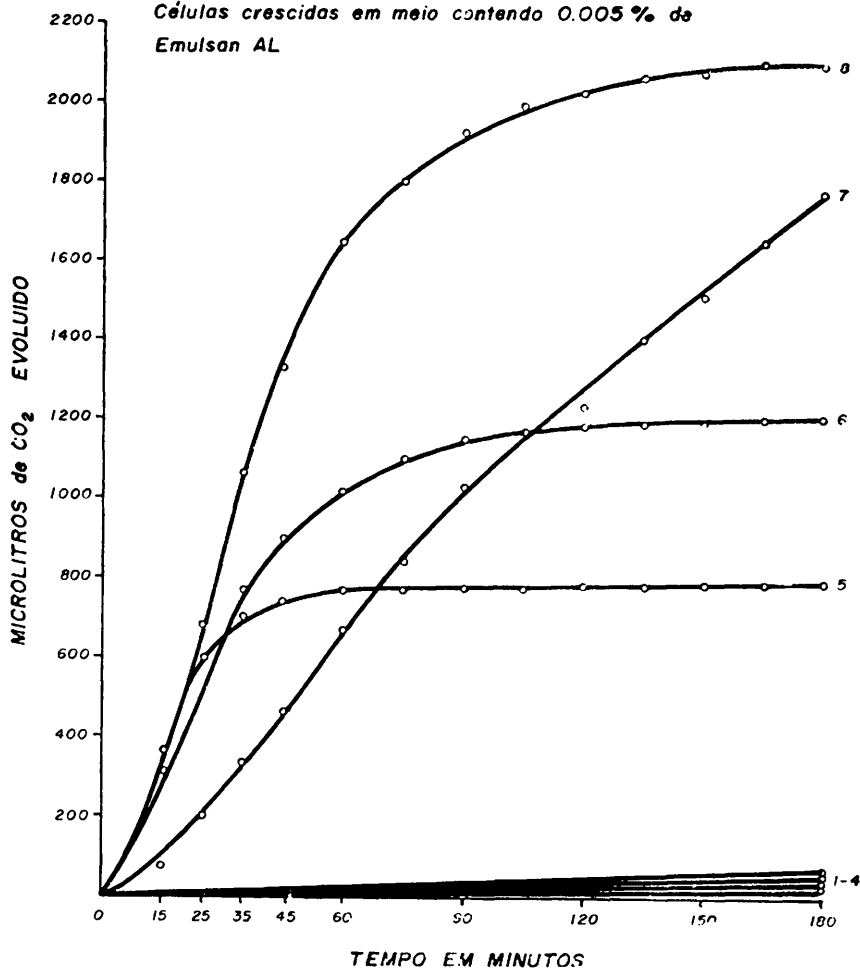


Fig. 5: 1 -- Endógeno; 2 -- Lactose; 3 -- Galactose; 4 --- Maltose;
5 -- Glicose; 6 --- Caldo de cana; 7 --- Rafinose; 8 -- Sacarose.

Saccharomyces carlsbergensis

Fermentação de carboidratos

Células crescidas em meio contendo 0.005 % de Emulsan AL

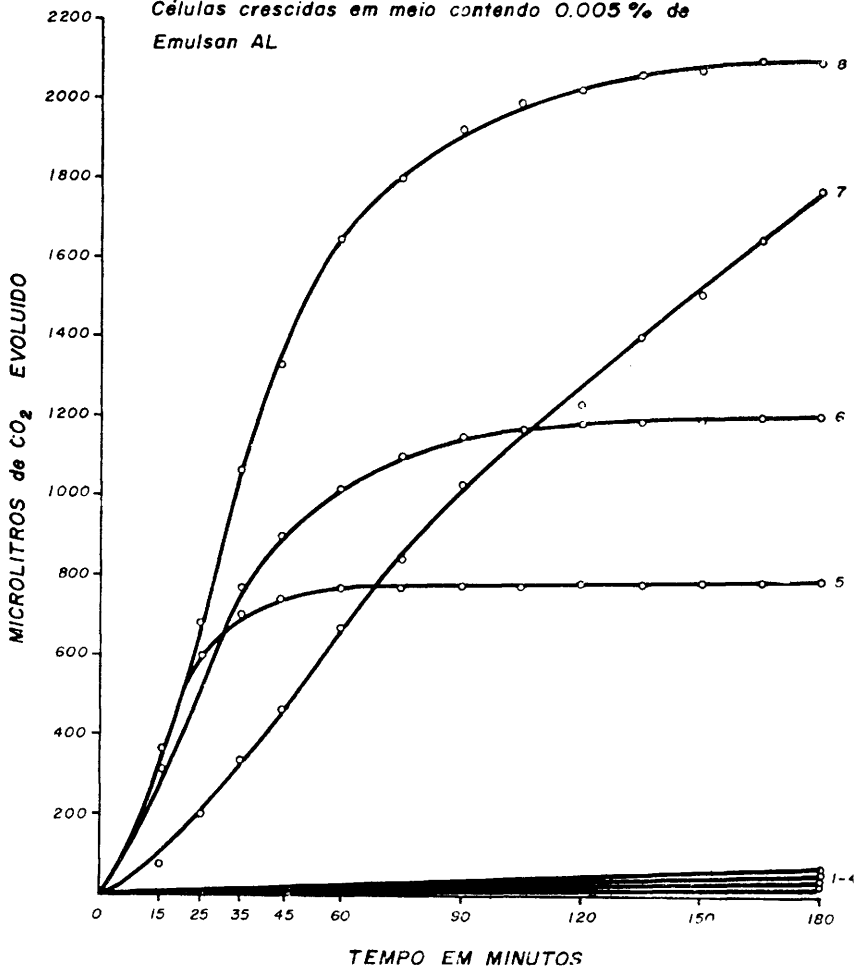


Fig. 5: 1 — Endógeno; 2 — Lactose; 3 — Galactose; 4 — Maltose;
5 — Glicose; 6 — Caldo de cana; 7 — Rafinose; 8 — Sacarose.