

CAPACIDADE FERMENTATIVA DE *Saccharomyces cerevisiae*
ENRIQUECIDA COM ÁCIDOS GRAXOS

L.E. Gutierrez*
A.V.K.O. Annicchino*
L. Lucatti*

RESUMO: Levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) foi obtida anaerobicamente (sem e com adição dos ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico) e aerobicamente e utilizada em ensaios de fermentação com 14% e 16% de sacarose a 32°C. Não houve diferenças significativas, quanto a viabilidade celular, entre os tratamentos das leveduras com ácido oleico, ácido linoleico e aerobicamente (as quais foram ricas em palmitoleico e oleico). As leveduras enriquecidas com ácido palmítico e anaeróbicas apresentaram maior redução na viabilidade do que com ácidos graxos insaturados. Foi observado um aumento na produção de ácido pirúvico e uma redução nos álcoois superiores com a redução da viabilidade celular.

Termos para indexação: ácidos graxos, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação alcoólica.

FERMENTATIVE CAPACITY OF (*Saccharomyces cerevisiae*)
ENRICHED WITH FATTY ACIDS

ABSTRACT: Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)

* Departamento de Química da E.S.A. "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo - 13.400 - Piracicaba, SP, e CEBTEC/FEALQ.

was obtained anaerobically (with and without the addition of following fatty acids: palmitic, oleic and linoleic) aerobically and utilised in fermentation trials with 14 and 16% of sucrose in the medium at 32°C. There were no significant differences among oleic acid, linoleic acid and aerobic treatments (which were rich in palmitoleic and oleic acids) in relation to cellular viability. Yeasts enriched with palmitic acid and under anaerobic conditions showed a higher reduction on viability than those treated with unsaturated fatty acids. An increased production of pyruvic acid and a reduction in higher alcohols with a reduction on cellular viability were observed.

Index terms: Fatty acids, *Saccharomyces cerevisiae*, alcoholic fermentation.

INTRODUÇÃO

Na produção de etanol pela via fermentativa tem se procurado leveduras que apresentem alta tolerância ao etanol para se obter vinhos com maior grau alcoólico.

Tem sido demonstrado uma relação entre a composição em ácidos graxos das leveduras e a tolerância ao etanol. GIUDICI *et alii* (1983) relataram uma correlação linear positiva entre a produtividade de 22 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e o teor de ácido oléico das leveduras enquanto que NAGAR-LEGMANN & MARGALITH (1987) verificaram que as leveduras com alta capacidade fermentativa apresentaram menor teor de ácidos graxos poliinsaturados do que as de baixa capacidade como a *Saccharomyces mellis*.

Nas leveduras, os ácidos graxos insaturados são formados na presença de oxigênio molecular (BLOOM FIELD & BLOCH, 1960; BROWN & ROSE, 1969), sendo que as leveduras são capazes de aproveitar mínimas quantidades de

oxigênio dissolvido no meio para a síntese de ácidos graxos insaturados (AHVENAINEN, 1982). Os principais ácidos produzidos por linhagens de *Saccharomyces* são palmitoleico e oleico (GIUDICI *et alii*, 1983; NAGAR-LEGMANN & MARGALITH, 1987).

Em meio anaeróbico, as leveduras são capazes de utilizar ácidos graxos presentes no meio (RESENDE & ALTERTHUM, 1986).

A adição de ácido linoleico, que não é produzido pelas leveduras *Saccharomyces*, tem provocado a formação de leveduras com maior resistência (THOMAS *et alii*, 1978) e menor retenção de etanol intra celular (THOMAS & ROSE, 1979). Segundo MISHRA & PRASAD (1989) o enriquecimento de leveduras com ácidos graxos poliinsaturados permitem maior tolerância ao etanol do que os monoinsaturados.

Além de aumentar a tolerância da levedura ao etanol, a adição de ácido graxo insaturado também proporcionou maior rendimento da fermentação alcoólica conforme verificado por ALTERTHUM & CRUZ (1987).

O objetivo do presente trabalho foi de verificar o efeito da adição de ácidos graxos sobre a composição da levedura e sua capacidade fermentativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

Foi utilizada a levedura de panificação Fleischmann (*Saccharomyces cerevisiae*) como inóculo.

Obtenção da levedura

A levedura foi multiplicada anaerobicamente sem e com adição de ácidos graxos e aerobically sem adição de ácidos graxos. O meio utilizado apresentou a seguinte composição (g/litro): sacarose 30g, ácido cítrico 6g, hidróxido de potássio 2,5g, sulfato de amônio 0,7g, uréia 0,4g, sulfato de magnésio 1,0g, cloreto

de cálcio 0,5g e fosfato dibásico de potássio 1,0g. Foram adicionadas soluções estoques de micronutrientes e vitaminas resultando na seguinte composição (mg/litro): pantotenato de cálcio 3mg, ácido nicotínico 3mg, tiamina 3mg, piridoxina 3mg, tiamina 3mg, piridoxina 3mg, inositol 15mg, biotina 0,3mg, H_3BO_3 4,7mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 4,6mg, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ 2,7mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1,9mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1,3 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,4mg, KI 0,4mg e $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2,3mg. O pH foi acertado a 5,0 com solução de KOH 5N. Para multiplicação aeróbica foi utilizada uma bomba de aquário que fornecia 54 litros de ar por hora. Para multiplicação anaeróbica foram adicionados 0,2g dos ácidos palmítico, oleico e linoleico, 0,025g de ergosterol e 0,5g de Tween 40 por litro conforme o tratamento. A multiplicação foi realizada com 4 litros de meio, com inóculo de 1mg de matéria seca e a $25 \pm 2^\circ C$ (temperatura ambiente). Os tratamentos aeróbico e anaeróbico controle não receberam ácidos graxos e ergosterol. Os ácidos graxos oleico e linoleico e o ergosterol foram dissolvidos em etanol absoluto à quente antes de serem adicionados ao meio e o ácido palmítico foi solubilizado com Tween 40. Após o término da multiplicação (22 horas para aeróbico e 36 horas para anaeróbico), a levedura foi decantada em geladeira, lavada com água esterilizada e utilizada para análise dos ácidos graxos e ensaios de fermentação. Foi também obtida levedura multiplicada anaerobicamente com meio de melaço com 3,2% de açúcares redutores totais suplementado com 0,7g de sulfato de amônio, 0,4g de uréia de 1g de fosfato dibásico de potássio por litro em pH 5,0.

Ensaio de fermentação

Foram distribuídos 1,2g de matéria seca de levedura por frasco de fermentação (duplicata) e adicionados 50ml de meio que apresentava a mesma composição do meio de multiplicação porém com 14 e 16% se sacarose, pH 4,0, sem adição de ácidos graxos e ergosterol. Os frascos foram tampados com papel alumínio e incubados a $32 \pm 1^\circ C$. Foram realizados 4 ciclos com 14% e 4 com 16% de sacarose. A fermentação foi acompanhada por pesagens dos frascos e o final quando as pesagens

permaneceram constantes. No final da fermentação foram coletadas amostras para determinação de viabilidade celular. O tempo de fermentação variou de 4 horas (alta viabilidade) até 8 horas (baixa viabilidade). No final da fermentação os frascos foram centrifugados o sobrenadante (vinho) foi utilizado para análise de etanol, ácido pirúvico, glicerol e álcoois superiores e a levedura reutilizada para nova fermentação durante 8 ciclos.

Análises

Etanol: o vinho centrifugado foi destilado em microdestilador Kjeldahl adaptado para etanol e a densidade do destilado medido em densímetro digital Anton-Paar DMA 45 conforme AMORIM *et alii* (1979).

Álcoois superiores: foi realizada segundo metodologia descrita por GUTIERREZ (1988).

Ácido pirúvico: foi determinado por reação colorimétrica com 2-4 dinitrofenilhidrazina segundo FRIEDMANN & HAUGEN (1943).

Glicerol: foi determinado pelo método colorimétrico de oxidação com metaperiodato seguido de reação do formaldeído formado com acetil-acetona e amônia, segundo descrição em ZAGO *et alii* (1989).

Viabilidade celular: foi adotada a metodologia descrita em DE MARTIN (1987).

Lipídios totais e ácidos graxos: 1,2g de matéria seca de levedura úmida foi tratada com 20ml de metanol durante 15 minutos e depois foi adicionado 40ml de cloroformio. A mistura foi deixada à temperatura ambiente durante 12 horas.

Após filtração, a solução foi purificada com NaCl 0,9% segundo FOLCH *et alii* (1957) e evaporada a vácuo e o resíduo foi pesado para lipídeos totais. Os ácidos graxos foram esterificados segundo HARTMAN & LAGO (1973) e analisados por cromatografia em fase gasosa com cromatógrafo com detentor de ionização de chama (CG-17)

nas seguintes condições: coluna metálica de aço inoxidável com 2 metros de comprimento e 0,5cm de diâmetro interno empacotada com 18% de dietileno glicol succinato sobre cromosorb P, temperatura da coluna de 190°C, do vaporizador 220°C e do detetor de 250°C, fluxo de gás de arraste de 50ml/min. de N₂ e o volume injetado de 1 a 2 microlitros.

Análise estatística: foi utilizado delineamento inteiramente casualizado segundo PIMENTEL GOMES (1970).

RESULTADOS

Na Tabela 1 é apresentada a composição em ácidos graxos da levedura multiplicada em diversas condições e utilizada nos ensaios de fermentação. Em meio aeróbico os principais ácidos graxos formados pela levedura são palmitoleico e oleico totalizando cerca de 76% de total, não tendo sido detectado o ácido linoleico e podendo-se observar a menor formação dos ácidos graxos de cadeia curta. Em meio anaeróbico sem adição de ácidos graxos, o principal ácido formado é o palmítico acompanhado de quantidades elevadas dos ácidos saturados da cadeia curta. Ocorre formação de palmitoleico e oleico mesmo sem aeração devido ao oxigênio dissolvido no meio. A levedura multiplicada no melão anaerobicamente apresentou teores mais elevados de palmítico, palmitoleico e ácidos graxos da cadeia curta, sendo que presença do linoleico é devido a absorção desse ácido do melão. Em meio anaeróbico, a levedura absorve e incorpora os ácidos graxos adicionados ao meio como pode ser observado na Tabela 1 para os ácidos palmítico, oleico e linoleico.

Na presença de Tween 40 ocorreu aumento no teor de palmítico tanto para oleico como linoleico devido ao fato do Tween 40 apresentar ácido palmítico na sua composição.

Tabela 1. Composição em ácidos graxos das leveduras utilizadas nos ensaios de fermentação (expressa em % sobre o total de ácidos graxos)

Tratamentos	Ácidos graxos					
	< 16:0	16:0	18:0	16:1	18:1	18:2*
Aeróbico	0,83	18,24	4,05	42,71	34,16	ND
Anaeróbico	24,66	46,96	10,64	14,19	3,55	ND
Palmítico	5,17	74,05	6,89	12,31	1,57	ND
Oleico	4,98	17,81	2,77	15,83	56,82	1,78
Oleico + Tween 40	6,91	25,75	3,04	16,52	46,63	1,14
Linoleico	4,99	24,46	7,36	1,51	7,27	54,39
Linoleico + Tween 40	3,25	29,87	7,54	1,08	9,76	48,47
Melaço	19,11	42,04	7,46	15,62	6,82	8,95

* ND: não detectado

Na Tabela 2 são apresentados os valores de ácidos graxos saturados e insaturados totais e a viabilidade celular dos ensaios de fermentação com 14 e 16% de sacarose. Houve queda drástica da viabilidade na levedura obtida anaerobicamente e com adição de ácido palmítico e como resultado a fermentação foi interrompida após 2 a 3 ciclos com 14% de sacarose, sendo que nessas leveduras foram observados os valores mais baixos de ácidos graxos insaturados (entre 13 e 18%). Utilizando meio com 14% de sacarose não foram observadas diferenças entre as leveduras obtidas aerobicamente e anaerobicamente com adição de oleico, linoleico e com melão. Com o uso de meio com 16% de sacarose houve redução não significativa na viabilidade celular que foi mais pronunciada nas leveduras com menor teor de insaturados com exceção da levedura obtida com melão.

Na Tabela 3 são apresentados os teores de etanol e glicerol dos vinhos obtidos com 14 e 16% de sacarose. Observa-se diferenças entre os tratamentos tanto com 14 como 16% de sacarose. Os teores mais elevados de etanol foram encontrados com as leveduras anaeróbica, melão e oleico para 14% de sacarose e aeróbico e melão para 16% de sacarose, embora não tenha sido significativa em relação ao glicerol pode-se observar teores mais elevados para levedura com linoleico + tween 40, oleico + tween 40 e palmítico tanto para 14 como 16% de sacarose. Em todos os tipos de leveduras pode-se notar aumento na formação de glicerol quando se aumenta a porcentagem de sacarose de 14 para 16%.

Na Tabela 4 são apresentados os teores de ácido pirúvico e de álcoois superiores totais (n-propílico, isobutílico e isoamílico). As leveduras obtidas aerobicamente e a partir do melão e linoleico apresentaram os teores mais baixos para ácido pirúvico para 14% de sacarose, ocorrendo aumento nessa produção quando se usou 16% de sacarose para as leveduras utilizadas. Em relação aos álcoois superiores totais observa-se que as leveduras obtidas aerobicamente apresentaram a produção mais elevadas enquanto anaeróbicas os menores teores.

Tabela 2. Total de ácidos graxos saturados e insaturados (%) e viabilidade celular (%) após fermentação

Tratamentos	Viabilidade celular		Ácidos graxos	
	14% Sacarose	16% Sacarose	Saturados	Insaturados
	Aeróbico	96,5	74,0	23,12
Anaeróbico	34,89	-	82,26	17,74
Palmítico	40,78	-	86,11	13,88
Oleico	91,5	87,0	25,56	74,43
Oleico + Tween 40	95,2	76,0	35,70	64,29
Linoleico	92,7	84,7	36,81	63,17
Linoleico + Tween 40	93,5	82,2	40,66	59,31
Melaço	95,7	85,0	68,61	31,39

d.m.s. 5%

19,46

c.v.

2,66%

10,60%

- fermentações interrompidas devido a baixa viabilidade

Tabela 3. Etanol (% volume) e glicerol (g/100ml) dos vinhos obtidos das fermentações com 14 e 16% de sacarose

Tratamentos	Etanol		Glicerol	
	14% Sacarose	16% Sacarose	14% Sacarose	16% Sacarose
Aeróbico	7,63	9,23	0,58	0,60
Anaeróbico	7,82	-	0,44	-
Palmítico	7,39	-	0,63	-
Oleico	7,87	9,13	0,48	0,69
Oleico + Tween 40	7,75	9,15	0,61	0,70
Linoleico	7,77	9,15	0,53	0,72
Linoleico + Tween 40	7,69	9,12	0,64	0,75
Melaço	7,83	9,32	0,54	0,62
d.m.s. 5%	1,15	0,22	0,11	0,060
c.v.	6,62%	1,08%	9,09%	3,94%

- fermentações interrompidas devido a baixa viabilidade

Tabela 4. Teores de ácido pirúvico e álcoois superiores totais dos vinhos (expressos em mg/litro)

Tratamentos	Pirúvico		Álcoois superiores totais	
	14%	16%	14%	16%
Aeróbico	143	250	237	193
Anaeróbico	199	-	125	-
Palmítico	212	-	128	-
Oleico	157	214	145	151
Oleico + Tween 40	210	249	151	126
Linoleico	124	190	182	170
Linoleico + Tween 40	193	225	170	132
Melaço	142	153	148	118
d.m.s. 5%	96,68	62,45	54,07	29,81
c.v.	26,60%	13,01%	13,95%	8,91%

- fermentações interrompidas devido a baixa viabilidade

Quando se aumentou o teor de sacarose do meio, ocorreu redução nos teores de álcoois superiores.

Nos gráficos das Figuras 1 e 2, pode-se observar a queda da viabilidade com os ciclos fermentativos e que é mais acentuada quando passa para meio com 16% de sacarose. O comportamento em relação ao ácido pirúvico não foi o mesmo para álcoois superiores totais pois enquanto ocorreu aumento do pirúvico com os ciclos fermentativos, para álcoois ocorreu redução nas três leveduras apresentadas (aeróbica, oleico e linoleico).

DISCUSSÃO

A levedura obtida aerobicamente apresentou menor proporção de ácidos graxos de cadeia curta (Tabela 1) do que a levedura anaeróbica sem adição e com melaço, confirmando observações de SUOMALAINEN & KERANEN (1963) e WILSON & McLEOD (1976). Com a adição dos ácidos graxos palmítico, oleico com e sem Tween 40, linoleico com e sem Tween 40 ocorreu menor formação de ácidos graxos de cadeia curta (< 16 carbonos), devido provavelmente a inibição da acetil-coenzima A carboxilase pelos ácidos graxos absorvidos. Segundo BIRNBAUM (1970) a acetil-coenzima A carboxilase é severamente reprimida por ácidos graxos insaturados (oleico, vaccênico e elaidico) e regulada tanto por ácidos graxos saturados como insaturados.

A levedura é capaz de incorporar ácidos graxos adicionados ao meio, em condições anaeróbicas, como pode ser observado na Tabela 1, confirmando observações de RESENDE & ALTERTHUM (1986) para os ácidos palmitoleico e oleico, WATSON (1982) para oleico, OHTA & HAYASHIDA (1983) para oleico, MISHRA & PRASAD (1989) para oleico, linoleico, palmítico e linolênico. A levedura obtida com meio de melaço apresentou ácido linoleico devido a presença desse ácido no melaço conforme relatado por MEE *et alii* (1979) para melaços de cana-de-açúcar cultivada no Hawaii.

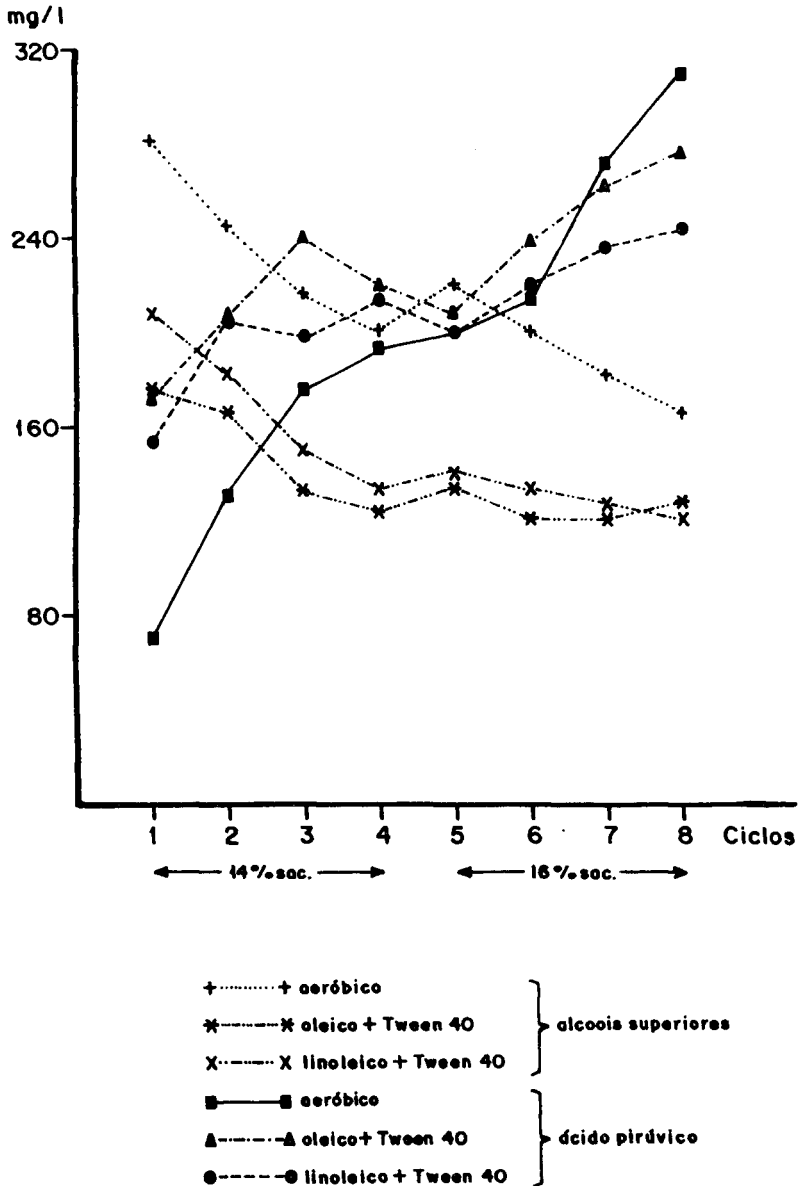


Fig. 1. Ácido pirúvico e álcoois superiores totais durante oito ciclos fermentativos

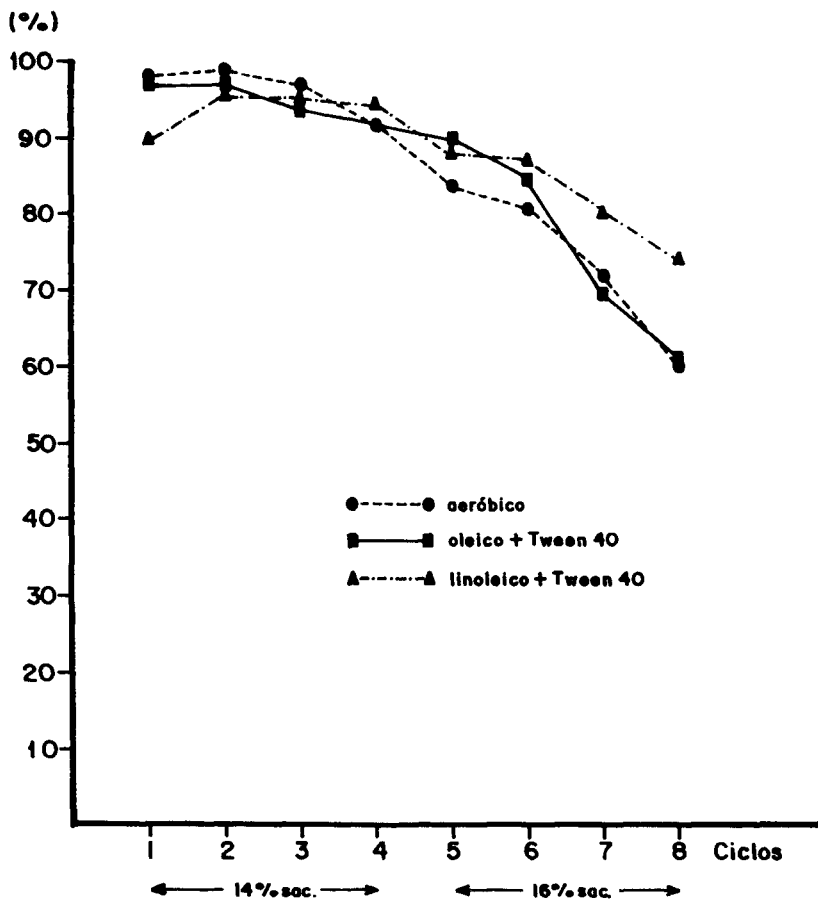


Fig. 2. Viabilidade celular das leveduras durante oito ciclos fermentativos

A adição de ácido linoleico provocou sensível redução no teor de ácido palmitoleico em comparação com a levedura aeróbica confirmando observações de BULDER & REININK (1974). Este fato poderia ser explicado pelo efeito inibitório de ácido graxo insaturado sobre a desaturase conforme observado por BLOOMFIELD & BLOCH (1960).

A relação entre a presença de insaturados e tolerância ao etanol tem sido destacada por diversos autores (MISHRA & PRASAD, 1989; OHTA & HAYASHIDA, 1983; WATSON, 1982; WILSON & McLEOD, 1976; THOMAS *et alii*, 1978; GIUDICI *et alii*, 1983). Entretanto, esses autores utilizaram quantidades de inóculo muito inferiores aos que são usados para produção de etanol que é ao redor de 10 a 15%, concentração essa utilizada no presente trabalho. Dados comparativos realizados por GUTIERREZ (1989) evidenciaram que a levedura de panificação Fleischmann apresenta menor resistência ao etanol do que a *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A. Na Tabela 2, pode-se observar que a levedura de panificação suporta meios com 14 e 16% de sacarose desde que apresente alta proporção de insaturados seja palmitoleico, oleico ou linoleico, embora a levedura obtida com melão apresente alta viabilidade com menor teor de insaturados, resultado que ainda não podemos explicar. A adição do palmítico puro ou na forma de Tween 40 provocou maior queda da viabilidade quando usado com oleico, apresentando maior proporção de saturados. Em alta proporção de saturados como anaeróbico e com palmítico os ensaios de fermentação ocorreram com apenas 3 ciclos de 14% de sacarose, com grande queda da viabilidade.

Nas condições do presente trabalho não foi possível comprovar efeito benéfico do ácido linoleico sobre o palmitoleico e oleico conforme verificado por THOMAS *et alii* (1978) e MISHRA & PRASAD (1989) embora a Figura 2 mostre uma tendência para maior viabilidade celular com a adição de linoleico. Provavelmente, além da proporção de insaturados, possa ocorrer efeito do teor de lipídeos totais pois como relatado por GRAY

(1948) quanto menor o teor de lipídeos da levedura maior a tolerância a etanol.

Com a diminuição da viabilidade ocorreu maior formação de ácido pirúvico e redução nos teores de álcoois superiores totais (Figuras 1 e 2). O ácido pirúvico é produzido e excretado para o meio podendo ser posteriormente reabsorvido conforme demonstrado por RANKINE (1967), LAFON-LAFOURCADE & PEYNAUD (1966). Na Figura 1 pode-se especular que o ácido pirúvico excretado não é reabsorvido devido a alteração na permeabilidade das membranas, pois há queda da viabilidade (Figura 2) e assim ocorrendo maior acúmulo no meio. Foram encontradas diferenças entre as leveduras aeróbicas e anaeróbicas em relação a produção de ácido pirúvico (Tabela 4) com as leveduras aeróbicas apresentando menor produção de ácido pirúvico, conforme verificado por COOTE & KIRSOP (1976).

Na Figura 1 pode-se observar uma redução no teor de álcoois superiores totais que acompanha a queda na viabilidade. Durante o período inicial do processo de fermentação alcoólica, o etanol intracelular é maior do que o extracelular (NAGODAWITHANA & STEINKRAUS, 1976; BEAVEN *et alii*, 1982; D'AMORE *et alii*, 1988) podendo ocorrer maior acúmulo quando a levedura é enriquecida com oleico do que linoleico (THOMAS & ROSE, 1979). O etanol acumulado pode atuar inibindo enzimas (INGRAM & BUTTKE, 1984), assim com o maior acúmulo de etanol intracelular o processo de biossíntese de leucina ficaria prejudicado e portanto diminuindo a produção do cetoácido correspondente para a formação de isoamílico, sendo a queda mais acentuada com levedura aeróbica (rica em palmitoleico e oleico) do que com levedura rica em oleico ou linoleico que acumulariam menos etanol.

As diferenças observadas no grau alcoólico dos vinhos pode ser explicada pela formação de glicerol (Tabela 3), quando se observa maior grau alcoólico ocorre menor formação de glicerol para uma mesma concentração de sacarose confirmando observações de GUTIERREZ (1989). O maior grau alcoólico observado para levedura obtida

anaerobicamente poderia ser explicada por um menor crescimento devido a deficiência em ácidos graxos insaturados e portanto carboidratos seriam desviados para produção de etanol. Essa relação menor crescimento/menor etanol foi evidenciada em GUTIERREZ (1989). Pelos mesmos motivos a maior produção de glicerol pelas leveduras enriquecidas com linoleico poderia ser explicada.

A levedura de panificação utilizada nos ensaios apresentou alta viabilidade no meio com 14% da sacarose seja enriquecida com oleico ou linoleico ou palmitoleico + oleico (aeróbica). Com 16% de sacarose, houve redução da viabilidade em todos os tratamentos, indicando uma menor tolerância ao etanol produzido nessa concentração de sacarose (ao redor de 9,2% volume) mesmo enriquecida com ácidos graxos insaturados.

Em relação a produção de etanol e glicerol, as leveduras obtidas aerobicamente e anaerobicamente com melão apresentaram melhor desempenho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHVENAINEN, J. Lipid composition of aerobically and anaerobically propagated brewer's bottom yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 88: 367-70, 1982.
- ALTERTHUM, F. & CRUZ, M.R.M. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, 18(1):52-7, 1987.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; GUTIERREZ, L.E. Método rápido para o controle da fermentação e destilação. *Saccharum STAB*, São Paulo, 4:31-4, 1979.
- BEAVEN, M.J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A.H. Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. *Journal of General Microbiology*, London, 128:1447-55, 1982.

- BIRNBAUM, J. Repression of acetyl-coenzyme A carboxylase by unsaturated fatty acids: relationship to coenzyme repression. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 104(1):171-6, 1970.
- BLOOMFIELD, D.K. & BLOCH, K. The formation of Δ^9 Unsaturated fatty acids. *Journal Biological Chemistry*, Baltimore, 235(2):337-45, 1960.
- BROWN, C.M. & ROSE, A.H. Fatty-acid composition of *Candida utilis* as affected by growth temperature and dissolved-oxygen tension. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 99(2):371-8, 1969.
- BULDER, C.J.E.A. & REININK, M. Unsaturated fatty acid composition of wild type and respiratory deficient yeasts after aerobic and anaerobic growth. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, 40:445-55, 1974.
- COOTE, N. & KIRSOP, B.H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, London, 82:149-53, 1976.
- D'AMORE, T.; PANCHAL, C.J.; STEWART, C.J. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54(1):110-4.
- DE MARTIN, V.F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1987. 190p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, Y.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, 147:415-42, 1943.
- GIUDICI, P.M.; GUERZONI; CONTE, L. Relationship of cellular fatty acid composition of the ethanol productivity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Vini D'Italia*, Roma, 25(145):147-53, 1983.

- GRAY, W.D. Further studies on the alcohol tolerance of yeast: its relationship to cell storage products. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 55:53-9, 1948.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito dos ácidos fórmicos e propiônico sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba, 45(2): 369-79, 1988.
- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo de fermentação alcoólica por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* S. *uvaram*. Piracicaba, 1989. 60p. (Livre-docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, London, 22:475-6, 1973.
- HENRY, S.A. Death resulting from fatty acid starvation in yeast. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 116 (3):1293-303, 1973.
- INGRAM, L.O. & BUTTKE, T.M. Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*, London, 25:253-300, 1984.
- LAFON-LAFOURCADE, S. & PEYNAUD, E. Sur les taux des acides cetoniques formes aum cours de la fermentation alcoolique. *Annales de L'Institut Pasteur* Paris, 110:766-78, 1966.
- MEE, J.M.L.; BROOKS, C.C.; STANLEY, R.W. Amino acid and fatty acid composition of cane molasses. *Journal of Science and Food Agriculture*, London, 30:429-32, 1979.
- MISHRA, P. & PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fattyacyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Microbiology and Biotechnology*, Berlim, 30:294-98, 1989.
- NAGAR-LEGMANN, R.; MARGALITH, P. A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentative capacities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlim, 26:49-54, 1987.

- NAGODAWITHANA, T.W. & STEINKRAUS, H. Influence of the rate ethanol production an accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 31(2):158-62, 1976.
- OHTA, K. & HAYASHIDA, S. Role of tween 80 and monoolein in a lipid sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance of sake yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 46(4): 821-5, 1983.
- GOMES, F.P. *Curso de Estatística Experimental*. 4.ed. São Paulo, Nobel, 1970. 430p.
- RANKINE, B.C. Influence of yeast strain and pH on pyruvic acid content of wines. *Journal of Science Food Agriculture*, London, 18:41-4, 1967.
- RESENDE, M.A. & ALTHERTHUM, F. Effect of temperature on the lipid composition of anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, México, 28:345-9, 1986.
- SUOMALAINEN, H. & KERANEN, A.J.A. The effect of anaerobic conditions on the synthesis of fatty acids by yeast. *Suomen Kemistilehti*, Helsinki, 36:88-90, 1963.
- THOMAS, D.S.; HOSSACK, J.A.; ROSE, A.H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerande in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, Berlim, 117:239-45, 1978.
- THOMAS, D.S. & ROSE, A.H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* affect by plasma-membrane lipid composition. *Archives of Microbiology*, Berlim, 122: 49-55, 1979.
- WATSON, K. Unsaturated fatty acid but not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. *Biotechnology Letters*, Kew, 4(6):397-402, 1982.

WILSON, K.; McLEOD, B.J. The influence of conditions of growth on the endogenous metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*; effect on protein, carbohydrate, sterol and fatty acid content and on viability. *Antonie Van Leeuwenhoek*, Amsterdam, 42:397-410, 1976.

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, Centro de Biotecnologia Agrícola. ESALQ/USP, 1989. 144p.

Entregue para publicação em: 27/08/90

Aprovado para publicação em: 22/11/90