**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e
Lactobacillus fermentum sobre a fermentação alcoólica: efeito do
substrato e formas de controle**

Ana Paula Guarnieri Bassi

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

Ana Paula Guarnieri Bassi
Engenheira Agrônoma

Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Bassi, Ana Paula Guarnieri

Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle / Ana Paula Guarnieri Bassi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
117 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Contaminação 2. Crescimento 3. Fermentação 4. Controle 5. Etanol I. Título

CDD 660.28449
B321a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. **Sandra Regina Ceccato Antonini**, pela sua constante dedicação, compromisso e confiança dispensados a esta aluna que tem por você grande admiração. Agradeço pelos valiosos ensinamentos.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, *campus* de Araras, à Profa. Dra. **Silvana Perissatto Meneghin** e Profa. Dra. **Márcia Maria Rosa Magri**, pelo carinho e alegria dedicados aos alunos.

Ato contínuo, agradeço a todos do LAMAM, em especial minhas amigas Anna Livia, Bianca, Amanda, Letícia, Ligiane e Lucinha, pela ajuda durante esses anos de trabalho.

À minha família pelo carinho, paciência e amor e à minha amiga Vanda Renata Reis, por sua alegria, companheirismo e amor incondicionais, amor agora em dobro com a espera da Elis.

Ao meu querido marido, amigo e companheiro José Mauro, pela paciência, aceitação e amor dedicados aos dias mais difíceis. Não conseguiria se você não estivesse ao meu lado.

Ao Centro de Ciências Agrárias – CCA/UFSCar, pela oportunidade de execução da parte experimental deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós-Graduação do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Prof. Dr. **André Ricardo Alcarde**, e também às funcionárias da Biblioteca Central.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos (2012/16258-4) e apoio à pesquisa (2011/17928-0).

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
Referência	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Fermentação etanólica: características do processo e substratos	15
2.2 Contaminantes da fermentação etanólica: leveduras <i>Dekkera bruxellensis</i>	19
2.2.1 Características e produção de metabólitos	19
2.2.2 Eficiência energética e competitividade de <i>Dekkera bruxellensis</i>	23
2.2.3 Contaminação de <i>Dekkera</i> na produção de etanol combustível	24
2.2.4 Controle do crescimento de <i>Dekkera</i> em processos fermentativos	27
2.3 Contaminantes da fermentação etanólica: bactérias <i>Lactobacillus</i>	30
Referências	34
3 EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS CONTAMINAÇÕES POR <i>D. bruxellensis</i> e <i>L. fermentum</i> EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO	43
Resumo	43
Abstract	43
3.1 Introdução	44
3.2 Revisão Bibliográfica	45
3.3 Material e Métodos	49
3.3.1 Micro-organismos	49
3.3.2 Testes de crescimento em caldo e melaço	49
3.3.2.1 Preparo do inóculo	49
3.3.2.2 Montagem dos experimentos e análises	50
3.3.3 Testes de fermentação em caldo e melaço	51
3.3.3.1 Preparo do inóculo para a fermentação	51
3.3.3.2 Montagem dos experimentos	51
3.3.3.3 Análises	52
3.3.3.4 Cálculo de eficiência fermentativa	52
3.3.3.5 Açúcares Redutores Totais (ART)	53
3.4 Resultados e Discussão	54
3.5 Conclusões	71

Referências	71
4 EFEITO DO TRATAMENTO CELULAR BASEADO EM BAIXO pH E ETANOL SOBRE <i>Dekkera bruxellensis</i> E <i>Lactobacillus fermentum</i> EM CO-CULTURAS	76
Resumo	76
Abstract	76
4.1 Introdução	77
4.2 Revisão Bibliográfica	78
4.3 Material e Métodos	81
4.3.1 Micro-organismos	81
4.3.2 Preparo do inóculo	81
4.3.3 Montagem do experimento	82
4.4 Resultados e Discussão	82
4.5 Conclusões	90
Referências	90
5 METABISSULFITO DE POTÁSSIO COMO UM BIOCIDA EM POTENCIAL CONTRA <i>Dekkera bruxellensis</i> EM FERMENTAÇÕES ETANÓLICAS	94
Resumo	94
Abstract	94
5.1 Introdução	95
5.2 Revisão Bibliográfica	96
5.3 Material e Métodos	97
5.3.1 Micro-organismos	97
5.3.2 Tolerância ao MBP em condições de crescimento com diferentes meios de cultura	98
5.3.3 Efeito da adição de MBP no tratamento ácido durante a fermentação	98
5.3.4 Efeito da adição do MPB ao meio de fermentação	99
5.3.5 Análise estatística	100
5.4 Resultados e Discussão	100
5.5 Conclusões	112
Referências	113
6 CONCLUSÕES GERAIS	116

RESUMO

Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle

As contaminações por leveduras selvagens e por bactérias no processo de produção de etanol combustível no Brasil causam prejuízos ao rendimento fermentativo e aumento de custos pelo uso de biocidas. No entanto, poucos estudos tem focado no efeito das contaminações conjuntas de leveduras selvagens e bactérias e as possíveis interações entre os micro-organismos, especialmente em função dos diferentes substratos de fermentação e das formas de controle. Este trabalho teve por objetivos verificar o efeito do substrato (caldo de cana e melaço) sobre o desenvolvimento das contaminações pela levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* e pela bactéria *Lactobacillus fermentum*, em co-culturas com *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem industrial PE-2) e possíveis formas de controle do crescimento dos contaminantes (pelo uso de metabissulfito de potássio e adição de etanol ao tratamento ácido) sem afetar a levedura do processo. Os testes foram realizados em condições de crescimento (substrato com 4 °Brix, culturas agitadas) e fermentação com reciclo celular (substrato com 16 °Brix, culturas estáticas). Houve interação entre as leveduras e a bactéria quando crescidas em caldo de cana 4 °Brix. A levedura industrial não foi afetada pela presença dos micro-organismos contaminantes, no entanto, para *D. bruxellensis* a presença de *L. fermentum* interferiu positivamente no crescimento, com aumento no número de UFC, e consequentemente inibição do crescimento da bactéria. Em melaço, houve um estímulo ao crescimento de *L. fermentum* quando em co-cultura com *S. cerevisiae*. Houve influência das contaminações sobre os parâmetros avaliados no experimento (pH, açúcar redutor total, etanol, glicerol e crescimento das células) e a contaminação conjunta de *L. fermentum* e *D. bruxellensis* potencializou o efeito das contaminações pelos micro-organismos isoladamente, tanto em caldo quanto em melaço. A adição de 13% de etanol à solução de ácido sulfúrico pH 2,0 no tratamento celular resultou em uma diminuição significativa no número de UFC de *D. bruxellensis* (entre 90-99%). A levedura PE-2 foi pouco afetada pelo tratamento proposto. A bactéria *L. fermentum* teve seu crescimento afetado em todas as combinações testadas. Como os experimentos foram feitos em co-culturas, verificou-se que pode haver influência de um micro-organismo sobre a viabilidade do outro, dependendo da reação ao tratamento ácido-etanol. O metabissulfito de potássio (MBP), no intervalo entre 200-400 mg/L, foi eficaz para controlar o crescimento de *D. bruxellensis* dependendo do meio de cultura e linhagem. Quando adicionado (250 mg/L) à solução ácida (pH 2,0) no tratamento celular, um efeito significativo foi observado nas culturas mistas, pois ocorreu a inativação do SO₂ pela *S. cerevisiae* e uma provável proteção das células de *D. bruxellensis*, não sendo essa levedura prejudicada pelo MBP. A resposta fisiológica de *S. cerevisiae* na presença de MBP pode explicar a diminuição significativa na produção de etanol. Quando o MBP foi adicionado ao meio de fermentação, resultou no controle da *D. bruxellensis* mas não em sua morte, com efeito menos intensivo sobre a eficiência fermentativa. Em co-cultura com a adição de MBP, a eficiência fermentativa foi significativamente menor do que na ausência de MBP.

Palavras-chave: Contaminação; Crescimento; Fermentação; Controle; Etanol

ABSTRACT

Evaluation of the simultaneous contamination by *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus fermentum* on the alcoholic fermentation: effects of the substrate and forms of control

The contaminations by wild yeasts and bacteria are harmful to the fermentative process for fuel ethanol production in Brazil due to the decrease in ethanol yield and increase in the industrial costs by the use of biocides. However, a few studies have been focused in the effects of simultaneous contaminations of wild yeasts and bacteria and the possible interactions among the microorganisms, especially concerning different fermentation substrates and forms of growth control. This work aimed to verify the effect of the substrate (sugar cane juice and molasses) on the development of contaminations by *Dekkera bruxellensis* yeast and *Lactobacillus fermentum* bacteria, in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae* (industrial strain PE-2) and possible forms of growth control of the contaminants (using potassium metabisulphite and addition of ethanol to the acid treatment) without affecting the starter yeast. Tests were carried out in growing conditions (substrate with 4 °Brix, shaken cultures) and cell-recycled fermentation (substrate with 16 °Brix, static cultures). There was interaction among the yeasts and the bacteria when growing in sugarcane juice 4 °Brix. The industrial yeast strain was not affected by the presence of the contaminant microorganisms, however, for *D. bruxellensis*, the presence of *L. fermentum* influenced positively the growth, increasing the number of CFU and consequently inhibiting the bacterial growth. In molasses, there was an increase in the growth of *L. fermentum* when in co-culture with *S. cerevisiae*. The contaminations influenced the fermentative parameters (pH, total reducing sugars, ethanol, glycerol and cell growth) and the simultaneous contamination by *L. fermentum* and *D. bruxellensis* potentiated the effect of the contaminations isolately, both in sugarcane juice as in molasses. The combined effect of pH 2.0 + 13% ethanol in the cell treatment resulted in a significant decrease (90-99%) in the CFU number of *D. bruxellensis*. The industrial yeast PE-2 was a little affected by the treatment. The growth of the bacteria *L. fermentum* was affected in all the combinations tested. As the experiments were performed with co-cultures, an influence of a microorganism over the viability of another was observed, depending of the reaction to the treatment. The potassium metabisulphite (PMB), in the range of 200–400 mg/L, was effective to control the growth of *D. bruxellensis* depending on the culture medium and strain. When added (250 mg/L) to the acidic solution (pH 2.0), a significant effect was observed in mixed cultures, because the inactivation of SO₂ by *S. cerevisiae* most likely protected *D. bruxellensis* from being damaged by PMB. The physiological response of *S. cerevisiae* to the presence of PMB may explain the significant decrease in alcohol production. When added to the fermentation medium, PMB resulted in the control but not the death of *D. bruxellensis*, with less intensive effect on the fermentative efficiency. In co-culture with the addition of PMB, the fermentative efficiency was significantly lower than in the absence of PMB.

Keywords: Contamination; Growth; Fermentation; Control; Ethanol

1 INTRODUÇÃO

O processo de fermentação realizado no Brasil possui peculiaridades, como o fato dos substratos (melaço e/ou caldo de cana) não serem esterilizados. Em vista disso, a fermentação etanólica é considerada um processo complexo com sucessões intensas de linhagens de leveduras. Isto favorece o desenvolvimento de leveduras nativas de *Saccharomyces cerevisiae* e não-*Saccharomyces*, que podem causar a diminuição da produtividade e outros problemas operacionais. As bactérias são também contaminantes importantes que contribuem para a queda no rendimento fermentativo, principalmente pela produção de metabólitos (ácidos).

O mosto utilizado na fermentação pode ser composto por caldo de cana e/ou melaço, sendo ambos bons substratos para a produção de etanol, pois apresentam altos teores de nutrientes que são essenciais durante o processo de fermentação. O melaço é mais rico em nutrientes por ser mais concentrado, pois ao sair do processo de produção de açúcar apresenta em torno de 68 °Brix, mas possui também deficiência de nitrogênio na forma que é metabolizado pela levedura do processo, o que pode prejudicar o processo fermentativo ou mesmo selecionar contaminantes que assimilem melhor a fonte disponível do que a levedura do processo.

Uma das principais preocupações na indústria sucro-alcooleira é combater os micro-organismos contaminantes do processo de produção de etanol, representados por bactérias e leveduras que se instalam no processo, estando presentes na cana, no mosto, na água e em tubulações e equipamentos. Essas leveduras que invadem o processo recebem o nome de leveduras selvagens (nativas) e os principais gêneros encontrados na cana-de-açúcar saudável são *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*. Mais recentemente, a presença dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* têm sido relacionada também à problemas nos processos fermentativos para produção de etanol.

Leveduras do gênero *Dekkera* apresentam alta capacidade de crescimento, mas reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*, nas condições em que a fermentação é realizada no Brasil. Estas características fazem com que destilarias contaminadas com estas leveduras apresentem tanto queda no rendimento de etanol quanto aumento no tempo de fermentação. Uma fermentação mais lenta atrasa todo o processo operacional na usina.

As leveduras do gênero *Dekkera* possuem características como crescimento lento, aroma característico devido à alta produção de ácido acético a partir da glicose, e a fermentação é estimulada pelo oxigênio molecular, o que recebe o nome de Efeito *Custer*. São bastante oportunistas, se mantendo estáveis em baixas concentrações de açúcar e oxigênio, tendo sido inicialmente detectadas como contaminantes da produção de vinho.

Pesquisas realizadas na área de fermentação mostraram que os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* são as bactérias contaminantes que predominam na fermentação alcoólica, sendo as Gram-positivas as de maior ocorrência. A espécie *L. fermentum* é um dos principais contaminantes do processo de produção de etanol, sendo uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, heterofermentativa, apresentando crescimento ótimo entre 30°C e 40°C. A redução no rendimento fermentativo devido à presença de bactérias lácticas ocorre devido ao fato de que há um desvio da glicose, de forma que a molécula que seria convertida em etanol pela levedura é transformada em ácido lático por bactérias, ocorrendo dessa forma uma queda no rendimento final da fermentação.

Os métodos tradicionais empregados pela indústria sucro-alcooleira para o tratamento do mosto com o objetivo de reduzir sua carga microbiana contaminante preconizam o uso de antibióticos e outros biocidas e de ácido sulfúrico concentrado na fase de tratamento do fermento, que ocorre entre os ciclos fermentativos. Essas técnicas, embora sejam eficientes contra bactérias, não tem ação contra as leveduras selvagens, muitas vezes selecionando células microbianas ainda mais resistentes a baixo pH e concentrações de antibióticos.

Embora se conheça os efeitos dos contaminantes na fermentação alcoólica, os trabalhos tem se restringido ao efeito das contaminações isoladamente, por um ou outro micro-organismo, pouco se conhecendo sobre as interações entre as bactérias, leveduras selvagens e a linhagem industrial presentes durante a fermentação.

Diante do exposto, o objetivo geral do trabalho foi verificar o efeito do tipo de substrato e tratamento do fermento sobre o desenvolvimento das contaminações por leveduras da espécie *D. bruxellensis* e pela bactéria *L. fermentum*, em co-culturas, sobre o rendimento da fermentação alcoólica desenvolvida pela levedura PE-2.

No Capítulo 1, foi avaliado o efeito do substrato (caldo e melaço) no desenvolvimento das contaminações por *D. bruxellensis* e ou *L. fermentum*, tanto em

condições de crescimento quanto em condições de fermentação, em sistema de batelada com reciclo celular.

Visando propor modificações no tratamento ácido do fermento a fim de controlar o crescimento de contaminantes, no Capítulo 2 foi avaliado o efeito da adição de etanol à solução ácida sobre o crescimento de linhagens de *D. bruxellensis* e de *L. fermentum*, em co-culturas com a linhagem industrial PE-2.

Ainda no sentido de realizar o controle seletivo do crescimento de *D. bruxellensis* sem afetar a levedura *S. cerevisiae* industrial, avaliou-se no Capítulo 3 o efeito do metabissulfito de potássio, um biocida utilizado extensivamente na indústria vinícola para controle de leveduras não-*Saccharomyces*, sobre as leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* em sistema de fermentação com reciclo celular. Esse trabalho resultou na publicação do artigo “Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations” no periódico *Letters in Applied Microbiology*, em 2015 (BASSI et al., 2015), sendo o primeiro trabalho a avaliar a ação do metabissulfito de potássio no controle do crescimento de *D. bruxellensis* no processo fermentativo para produção de etanol combustível. Simulando condições industriais, foi verificado em qual situação os efeitos sobre a levedura do processo e sobre o rendimento alcoólico foram mínimos, enquanto para *D. bruxellensis* foram máximos. Discutiu-se também a viabilidade do emprego dessa substância na fermentação etanólica em vista das possíveis interações biológicas e químicas do metabissulfito com o substrato e com as leveduras.

Os resultados apresentados e discutidos nos capítulos permitem avaliar o efeito dos fatores ‘substrato de fermentação’ e ‘tratamento do fermento’ no estabelecimento das contaminações por *D. bruxellensis* e em que extensão a contaminação concomitantemente com *L. fermentum* pode afetar o rendimento fermentativo.

Referência

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 248-258, 2015.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fermentação etanólica: características do processo e substratos

No Brasil, a fermentação industrial pode ser conduzida em sistema em batelada e contínuo, sendo que o mais utilizado é o de batelada alimentada (FERREIRA, 2008). Esse sistema tem a grande vantagem de adaptação do micro-organismo ao substrato, obtendo uma maior produção de etanol. As unidades industriais trabalham com leveduras adaptadas ao substrato, portanto a alimentação das dornas é constante. Feito isso, espera-se o consumo quase que total do substrato e o vinho é encaminhado para centrifugação a fim de recuperar a levedura para a próxima batelada. O outro processo fermentativo é o sistema contínuo, onde 4 a 5 dornas são interligadas em série, sendo que o substrato e as células de levedura são adicionados simultaneamente e de maneira contínua ao primeiro fermentador do sistema. A quantidade de açúcar no mosto é proporcional à quantidade de células de levedura, e o meio de fermentação flui de um fermentador para o outro até que atinja o último, sendo depois levado para centrifugas, onde o fermento é separado (MARQUES, 2008).

Comparativamente, o sistema contínuo pode chegar a 100% de utilização dos equipamentos, aumentando a produtividade e chegando também a valores muito bons de produção com redução significativa da área física, apresentando também custos menores de instalação quando comparado com o sistema de batelada alimentada. É um sistema mais simples e econômico, mas como desvantagem tem-se a assepsia das dornas. No sistema em batelada alimentada, a cada ciclo, o fermentador pode ser limpo, e todo o fermento é tratado com ácido, baixando assim a taxa de contaminação para o próximo ciclo. No sistema contínuo, somente 15% das células são tratadas e retornam ao fermentador, que durante a safra nunca é esvaziado. No entanto, com os novos sistemas de limpeza de fermentadores, tanques e trocadores de calor, é possível manter esta contaminação sob controle, para que não haja diferença significativa nos valores de produção de etanol (ANDRIETTA; ANDRIETTA; STUPIELLO, 2011).

Tradicionalmente no Brasil, a produção de etanol foi acoplada às indústrias de açúcar (BASSO; ROSA, 2010). O colmo da cana é pressionado, resultando em caldo

e bagaço. Após o processo de clarificação do caldo ocorre a concentração por evaporação até a cristalização de sacarose, sendo os cristais separados por centrifugação gerando uma fase saturada e viscosa de sacarose, chamada de melaço, que contem em torno de 45 a 60% de sacarose e 5 a 20% de frutose e glicose (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Com esse subproduto da produção de açúcar, inicialmente a destilaria acoplada foi uma forma de processar os melaços resultantes da indústria de açúcar, mas devido à crescente importância do etanol na década de 80, muitas usinas começaram a implantar plantas autônomas.

A partir daí, o processo industrial brasileiro para a produção de etanol combustível começou a usar o caldo de cana e o melaço como substratos, misturados em diferentes proporções, compondo assim o mosto que irá receber a levedura para fermentação.

A composição do caldo de cana pode variar (Tabela 1), afetando vários parâmetros operacionais industriais, como o rendimento da fermentação. Vários fatores determinam a composição final do caldo de cana, como a variedade de cana, tipo de solo, estratégias de fertilização, condições climáticas, nível de maturação da cana, tipo de colheita, período de tempo entre a queima, corte e processamento, proporção de palha, uso ou não de fertirrigação com vinhaça e forma de extração do caldo, se por moenda ou difusor (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Souza et al. (2015) propuseram que o monitoramento da concentração de Mg^{2+} no mosto é a questão mais importante para o controle industrial do processo de fermentação de etanol combustível a partir de caldo de cana, pois resultados mostraram que o ideal seria manter a concentração em um nível acima de 600 mg/L, evitando-se quedas na produção de etanol. A absorção de magnésio e posterior utilização metabólica parece ser um pré-requisito para alcançar a máxima atividade fermentativa da célula de levedura (WALKER; MAYNARD, 1997). Três enzimas-chave que, subsequentemente, trabalham para a biossíntese de etanol são dependentes da Mg^{2+} : enolase que converte 2-fosfoglicerato em 2-fosfoenolpiruvato; piruvato-quinase, que converte 2-fosfoenolpiruvato em piruvato; e piruvato descarboxilase, que converte piruvato em acetaldeído. Portanto, concluiu-se que o magnésio é o principal responsável pelo aumento na produção de etanol, e também parece ser capaz de amenizar os efeitos inibidores dos minerais tóxicos presentes no caldo de cana (SOUZA et al., 2015).

Tabela 1 - Composição mineral de substratos a base de cana-de-açúcar e os níveis recomendados para fermentação de levedura

Nutriente	Concentração (mg/L)	Nível ideal (mg/L)
Nitrogênio (NH_4^+ e R-NH_2)	70-350	100-300
Fósforo	20-200	50-250
Potássio	300-12000	700-1300
Magnésio	80-3900	100-200
Sulfito	80-3900	Menor possível
Cálcio	150-2000	Menor possível
Zinco	0,45-9	1-5
Cobre	0,20-8	1-5
Manganês	2-8	1-5
Alumínio	2-500	< 10

Fonte: Amorim e Leão (2005)

O monitoramento constante de várias destilarias do Estado da Paraíba tem mostrado que a qualidade do substrato da fermentação possui um papel importante na produção industrial e pode interferir com a capacidade de fermentação das células de levedura, e não somente a contaminação por bactérias e leveduras selvagens, como sempre é relatado (SOUZA et al., 2015).

Além do papel do substrato no rendimento da fermentação, há outras duas peculiaridades do processo de produção de álcool combustível no Brasil que o diferencia de outras fermentações industriais: a primeira é que o processo não ocorre de forma asséptica; a segunda é a recirculação do fermento, que ocorre ao final de cada ciclo fermentativo durante toda a safra de produção (BASSO et al., 2008).

No processo industrial, a fermentação se inicia com um mosto de 18 a 22% de açúcar redutor total (ART), e teores alcoólicos de 8 a 10% (v/v) podem ser atingidos dentro de 6 a 10 horas de fermentação. Ao término da fermentação, a levedura é separada por centrifugação e a massa celular segue para o tratamento ácido, onde recebe o ácido sulfúrico até pH 2,0 a 2,5 por cerca de 1 a 2 horas, com a finalidade de redução da contaminação bacteriana, e na sequência um novo ciclo fermentativo se inicia (Figura 1). Desse modo, a levedura pode ser submetida a 2 ciclos diários de fermentação durante a safra anual (com duração em torno de 200 a 250 dias),

mantendo alta densidade celular nas dornas, a fim de diminuir o tempo de fermentação e elevar a produtividade do processo (LALUCE; PALMIERI; CRUZ, 1991; BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011).

Figura 1 – Esquema do processo de produção de etanol em sistema de batelada com reciclo da levedura. Os valores em destaque correspondem à concentração média de células de leveduras em cada etapa (massa/volume).

Fonte: Adaptado de Ferreira (2008)

Como os processos fermentativos utilizados no Brasil não ocorrem de forma estéril e o mosto consiste em uma fonte rica em nutrientes para uma grande quantidade de outros micro-organismos, grandes problemas com contaminação podem ocorrer. Os prejuízos causados pela contaminação bacteriana na fermentação alcoólica têm início na lavoura com a matéria-prima. A infecção bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo, tais como: consumo de açúcar, formação de goma, floculação do fermento, inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio e, por consequência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação (ALCARDE; HORII; NOBRE, 2007).

A etapa de tratamento ácido que é realizada na indústria tem a principal finalidade de controle da contaminação bacteriana. Essa contaminação pode causar

floculação do fermento e consequentemente as leveduras não entram em contato com o mosto, tornando a fermentação mais lenta e causando queda no rendimento. As leveduras também sofrem o estresse causado pelo tratamento ácido, mas em menor proporção. Na verdade, o sinergismo de fatores como teor alcoólico, temperatura, metabólitos produzidos por contaminantes, estresse osmótico e ciclos sucessivos é que afeta sobremaneira a levedura do processo (BASSO et al., 1993).

2.2 Contaminantes da fermentação etanólica: leveduras *Dekkera bruxellensis*

2.2.1 Características e produção de metabólitos

Entre as leveduras contaminantes do processo de fermentação etanólica, destacam-se os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* (SILVA, 1994; GUERRA, 1998; ARAÚJO et al., 2005; PEREIRA et al., 2012).

O gênero *Dekkera* apresenta, ao microscópio, células esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais, caracterizadas por uma estrutura semelhante à chama de uma vela nas extremidades. Podem também ser cilíndricas ou alongadas (Figura 2). A reprodução vegetativa se dá por brotamento e exibe pseudomicélio. Como características gerais, além das citadas, podem ainda ser listadas lento crescimento, curta duração de vida em placas, aroma característico, forte produção de ácido acético a partir de glicose, estímulo da fermentação pelo oxigênio molecular e exigência de fonte externa de vitaminas (KREGER-van RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990).

Figura 2 – Morfologia das células da levedura *Dekkera bruxellensis*, apresentando célula alongadas (A), esferoidais (E) e ogivais (O), em meio YPD. Aumento de 400X ao microscópio

Fonte: Arquivo pessoal (Sandra Regina Ceccato-Antonini)

O gênero *Brettanomyces* não forma asco, ou seja, se trata da forma imperfeita do gênero *Dekkera*. Apresentam-se como células esferoidais, subglobosas a elipsoidais, ogivais, cilíndricas e alongadas. Sua reprodução se dá por brotamento. Por se tratar da forma imperfeita do gênero *Dekkera*, não possui fase sexuada e, portanto, não forma ascósporos. Pode formar pseudomicélio e micélio ramificado dando uma visão unicelular por não apresentar septos e nem invaginações. As células, a exemplo do gênero *Dekkera*, também apresentam, em geral, crescimento lento e possuem tempo de vida curto. As demais características são as mesmas definidas para o gênero *Dekkera* (SILVA, 2003).

A detecção do gênero *Dekkera* ocorreu inicialmente em vinho de uva que traz consigo, além de *Saccharomyces cerevisiae*, diversos outros gêneros e espécies de leveduras. Entre as leveduras de interesse enológico, embora não sejam da flora normalmente encontrada na uva, destacam-se os gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces*. Sua importância para vinhos está no fato de deteriorar vinhos já engarrafados. *D. bruxellensis* é considerada hoje a principal causa de deterioração em vinho, vinhos tintos em especial amadurecidos em barricas de carvalho, onde pode ser responsável por sérios prejuízos econômicos (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003). Possuem características metabólicas diferentes daquelas apresentadas por *S. cerevisiae*, contribuindo para seu comportamento não competitivo durante o processo de fermentação, mas bastante oportunista, se mantendo viável em baixas concentrações de açúcares e oxigênio e com eficiente produção de ácidos e fenóis voláteis que danificam o aroma e sabor do vinho. Por

serem oportunistas e apresentarem caráter não competitivo, as leveduras do gênero *Dekkera* permitem que as demais leveduras atuem no processo fermentativo, muitas vezes não sendo detectadas durante a fermentação. Após esta fase, entram lenta e progressivamente em atividade, causando sérios danos ao vinho (SILVA et al., 2005; FERNANDES, 2013).

A produção de compostos fenólicos *off-flavors*, especificamente fenóis voláteis, define a importância das leveduras *Dekkera/Brettanomyces* durante a vinificação e tem sido bem documentada (HERESZTYN, 1986; CHATONNET; DUBOURDIEU; BOIDRON, 1992, 1995; CHATONNET; VIALO; DUBOURDIEU, 1997; EDLIN et al., 1995). Fenóis voláteis representam uma grande família de compostos aromáticos, sendo que o etilfenol está relacionado com a contaminação por *Brettanomyces* (CHATONNET; DUBOURDIEU; BOIDRON, 1992).

As leveduras *Dekkera/Brettanomyces* são capazes de produzir quantidades significativas de ácido acético, e por muito tempo foi proposto que o ácido acético produzido por esse contaminante pudesse conferir uma vantagem competitiva sobre as células de *S. cerevisiae* (MINIAC, 1989). Entretanto, em condições industriais a quantidade de oxigênio disponível é limitada, o que não proporcionaria uma elevação da concentração de ácido acético (Efeito *Custer*) que fosse capaz de inibir ou mesmo, interferir no crescimento das leveduras *S. cerevisiae* (PHOWCHINDA; DÉLIA-DUPUY; STREHAIANO, 1995; ABBOTT; HYNES; INGLEDEW, 2005; BLOMQVIST et al., 2010).

A inibição do crescimento e a interferência na capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* pelas células de *D. bruxellensis* só ocorre quando a concentração de ácido acético chega a níveis superiores a 2 g/L (YAHARA et al., 2007). Blomqvist (2011), utilizando cultivos em sistema contínuo e com 5% de oxigênio dissolvido, observou que as células de *D. bruxellensis* produziram quantidades de ácido acético inferiores a 1 g/L, concentração esta que não foi suficiente para afetar o crescimento e desenvolvimento das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* nos processos de fermentação industrial.

Vinhos contaminados por *Dekkera/Brettanomyces* têm várias descrições sensoriais como "picante", "smoky", "couro", "cedro", "medicinal", "animal", "cachorro molhado", "curral", ou um dos mais conhecidos "suor de cavalo" (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2006; FUGELSANG; EDWARDS, 2007). O efeito não se resume aos odores, pois os fenóis voláteis em concentrações elevadas também

afetam o paladar com um aumento na adstringência e amargura, descritos como sabor metálico (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2006).

Fermentações conduzidas com a adição de metabólitos de *Brettanomyces*, como ácido acético e 4-etilfenol, mostraram que somente o ácido inibiu o crescimento das linhagens de *S. cerevisiae*. O ácido acético no mosto de uva provocou inibição metabólica imediata das duas cepas estudadas, mostrando sensibilidade à menor concentração do ácido acético utilizada (2,5 µL/mL), provando que a inibição por ácido acético foi um fator limitante para a fermentação. Durante os 6 dias de duração da fase tumultuosa da produção de vinho, a produção mais elevada de etanol e o maior consumo de açúcar ocorreu quando a fermentação não estava contaminada com *B. custersianus*. Em alguns casos, esta levedura afetou a taxa de produção e a concentração final de álcoois superiores (SILVA et al., 2011).

Narendranath, Thomas e Ingledew (2001) mostraram que o efeito do ácido acético dependeu da composição do meio e que a duração da fase lag da curva de crescimento de *Brettanomyces* aumentou exponencialmente com o aumento da concentração de ácido acético ou láctico. Silva et al. (2011) observaram que a duração da fase de evolução do CO₂ também tendeu a aumentar com concentrações maiores de ácido acético.

Pereira et al. (2012) não detectaram produção de ácido acético pela *D. bruxellensis* em oito ciclos fermentativos de 12 horas em caldo de cana para produção de etanol combustível, ao contrário, em cultura pura de *S. cerevisiae* houve maior produção de ácidos do que em cultura pura da contaminante. Os autores também verificaram que ambas as leveduras foram igualmente sensíveis à adição de ácido acético e ácido láctico ao meio de fermentação.

Pereira et al. (2014) em trabalho utilizando melaço como substrato, concluíram que *D. bruxellensis* em comparação com *S. cerevisiae* apresentou maior viabilidade celular (98 e 96%, respectivamente) durante os ciclos de fermentação. A população de células se manteve constante para ambas as leveduras, sendo que ao final de cada ciclo de fermentação, o pH final do mosto fermentado foi inferior para *D. bruxellensis* (4,8) em comparação com *S. cerevisiae* (5,06), ao passo que o rendimento de ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético) foi muito mais elevado para *D. bruxellensis*, o que pode explicar o menor pH do meio de melaço pela produção destes ácidos. Não houve diferença na concentração final de ácido láctico

entre as duas leveduras, enquanto o culturas de *D. bruxellensis* produziram quase três vezes mais acetato de que *S. cerevisiae*.

2.2.2 Eficiência energética e competitividade de *Dekkera bruxellensis*

Apesar de as leveduras do gênero *Dekkera* estarem separada evolutivamente de *S. cerevisiae* cerca de 200 milhões de anos (WOOLFIT et al., 2007), elas compartilham algumas características, sendo uma delas a capacidade de produzir etanol mesmo em presença de oxigênio, o que caracteriza assim o chamado efeito *Crabtree* positivo (PROCHÁZKA et al., 2010). Em *S. cerevisiae* e em outras leveduras, este comportamento fisiológico tem sido explicado pela saturação da capacidade respiratória em reoxidar o NADH resultante da glicólise (PEREIRA et al., 2012).

Blomqvist et al. (2010) afirmaram que a eficiência energética de *D. bruxellensis* é superior à de *S. cerevisiae*, tendo produção de biomassa também maior e menor produção de glicerol. As leveduras produzem glicerol sob limitação de oxigênio, a fim de re-oxidar NADH produzido durante os processos de oxidação (van DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). Alguns autores afirmaram que as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* não têm capacidade de produção de glicerol a fim de restaurar o equilíbrio em NADH, e esta incapacidade levaria ao efeito *Custer*, ou seja, a inibição temporária da fermentação em condições anaeróbias (WIJSMAN et al., 1984). No entanto, estes e outros autores (AGUILAR-USCANGA; DELIA; STREHAIANO, 2003; SOUZA-LIBERAL et al., 2007) demonstraram que *D. bruxellensis* pode produzir glicerol, mas não em grandes quantidades.

A menor taxa de crescimento de *D. bruxellensis* a torna não-competitiva em fermentações, no entanto, em condições limitantes de cultivo contínuo com recirculação de leveduras, onde a taxa de crescimento é determinada por parâmetros técnicos, essa levedura se mostra mais eficiente na utilização do substrato e mais tolerante aos inibidores presentes no meio. Esses fatores podem ser mais importantes para a competitividade do que altas taxas de crescimento potencial. A robustez de *D. bruxellensis* também favorece esta levedura para

aplicações industriais, onde as condições ambientais podem mudar rapidamente ou mesmo em grandes fermentadores industriais. Além disso, sua alta competitividade com outros micro-organismos e capacidade de fermentar hidrolisados celulósicos sugerem que linhagens de *D. bruxellensis* são candidatas interessantes para aplicações na fermentação de material lignocelulósico (BLOMQVIST et al., 2010).

Aguilar-Uscanga et al. (2011) estudaram o comportamento fermentativo de *Brettanomyces bruxellensis* em diferentes concentrações de glicose aplicando um modelo algoritmo, e concluíram que na fase inicial da fermentação, ainda na presença de oxigênio, não há muita produção de etanol e nem crescimento da levedura. Essa primeira fase é o que se chama de fase de adaptação. Já na segunda fase estudada houve aumento da biomassa, produção de etanol e consumo de substrato. A produtividade máxima de etanol e biomassa foi obtida com concentração de glicose inicial de 138 g/L; em concentração de 165 g/L de glicose houve um bloqueio da produção de biomassa e etanol.

As linhagens de *D. bruxellensis* se mostraram mais eficientes na conversão de energia em biomassa do que as leveduras *S. cerevisiae* durante a fermentação. A presença de células *D. bruxellensis* em contagens elevadas pode diminuir a eficiência de produção de etanol (PEREIRA et al., 2012).

Pita et al. (2013) demonstraram através da expressão de genes, que a linhagem *D. bruxellensis* aumenta o fluxo do ciclo do ácido tricarbixílico e a síntese de ATP em baixa concentração de nutrientes, sendo essa uma estratégia para aumentar a eficiência energética do metabolismo. Estes resultados confirmam a hipótese que em condições de estresse, seu crescimento é induzido pelo metabolismo respiratório e também que a baixa oferta de carbono afeta a produção de etanol.

2.2.3 Contaminação de *Dekkera* na produção de etanol combustível

Na produção do etanol combustível, a definição para contaminação microbiana é sempre relacionada à queda de rendimento e produtividade. Além disso, a contaminação com leveduras selvagens implica em uma mudança acentuada da população de leveduras do mosto, causando prejuízo econômico devido à competição por alimento, ou seja, o açúcar do mosto que seria utilizado para a produção de etanol é desviado para ser consumido por outros micro-organismos que

muitas vezes não irão produzir etanol e que ainda produzirão compostos tóxicos à levedura de interesse industrial. Isso pode ser revertido ou minimizado caso a contaminação seja detectada precocemente (SOUZA-LIBERAL et al., 2005).

Leveduras *Dekkera/Brettanomyces* têm sido relatadas como responsáveis por vários episódios de contaminação em processos fermentativos em destilarias de países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá (ABBOTT; HYNES; INGLEDEW, 2005), além de destilarias da Europa (MINIAC, 1989; CIANI; MACCARELLI; FATICHENTI, 2003) e ainda em diversas destilarias estudadas por Basílio et al. (2005) na América do Sul, porém em poucos casos foi utilizado caldo de cana como substrato para fermentação (GUERRA, 1998).

Embora os relatos sobre os efeitos da contaminação por *Dekkera* sejam predominantes em vinhos, a espécie *D. bruxellensis* tem sido detectada como a principal levedura contaminante na produção de etanol combustível, apresentando uma surpreendente capacidade de crescimento e adaptação naqueles substratos. Silva (1994) documentou a ocorrência de uma severa contaminação por uma levedura selvagem no processo contínuo de produção de etanol industrial, demonstrando a não estabilidade do fermento inicial, o qual foi praticamente substituído por *D. bruxellensis*. O poder competitivo dessa espécie em condições fermentativas foi de tal ordem que permitiu sua evolução populacional de aproximadamente 62% para 96% do número total de leveduras em 8 dias de operação.

Guerra (1998) detectou que uma unidade industrial que sofria constantes quedas no rendimento fermentativo e teve seu fermento substituído sete vezes durante uma única safra, estava contaminada com *D. bruxellensis* e então testou várias maneiras de controle dessa levedura. Concluiu que é possível realizar o controle industrial do crescimento dessa espécie mediante procedimentos onde haja minimização do oxigênio e uso de etanol, tudo dentro dos limites de tolerância da levedura de processo.

Bassi (2011) verificou que em sistema de batelada sem reciclo celular em meio sintético, a agitação influenciou significativamente a produção de etanol e de ácidos por diferentes linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica, especialmente para a linhagem CCA077, onde se observou um aumento de 0,84 g/100 mL (estático) para 2,43 g/100 mL (100 rpm) no teor alcoólico com a agitação dos frascos, sendo glicose a fonte de carbono utilizada.

Souza-Liberal et al. (2007) verificaram que a dinâmica de desenvolvimento da população de *Dekkera/Brettanomyces* pode aumentar mais rapidamente que a de *S. cerevisiae* em sistemas contínuos industriais, pelo fato desta levedura possuir a capacidade de se adaptar mais rapidamente e com maior eficiência ao substrato. Dependendo também do processo operacional, pode haver uma vantagem no crescimento e adaptação dessa levedura contaminante, como por exemplo, com a adição de oxigênio, que é estimulador da fermentação para leveduras com efeito *Custer* positivo, caso das leveduras *Dekkera*. A presença de nitrato também se mostrou uma vantagem, pois o mosto preparado a partir de cana-de-açúcar é rico em nitrato, sendo este nutriente utilizado pelas leveduras do gênero *Dekkera* e não assimilado por *S. cerevisiae* (PITA et al., 2011).

Em sistema de batelada com reciclo celular, Meneghin et al. (2013) mostraram que uma linhagem de *D. bruxellensis* (CCA059) foi capaz de crescer em meio de caldo de cana, independentemente do tamanho do seu inóculo inicial (10 a 10^3 células/mL), impactando negativamente a fermentação etanólica, causando a diminuição da viabilidade de *S. cerevisiae*, diminuindo o pH do meio, acarretando o decréscimo da produção de etanol e eficiência fermentativa.

Apesar de exibir capacidade de crescimento no caldo de cana, análises fisiológicas de espécies do gênero *Dekkera* mostraram que essas leveduras possuem, nestes substratos, baixa capacidade fermentativa quando comparadas a *S. cerevisiae*. Isto implica, em maior tempo de fermentação e menor rendimento industrial resultando em acúmulo de açúcar nas dornas industriais ao final da fermentação e fermentações mais lentas (ARAÚJO et al., 2005).

A baixa capacidade fermentativa de leveduras do gênero *Dekkera* pode estar relacionada a limitações na taxa de assimilação de sacarose. Sabe-se que a enzima invertase das células de *S. cerevisiae* hidrolisa a maior parte da sacarose no meio extracelular, originando glicose e frutose. Por outro lado, estudos recentes mostraram que culturas de células de uma linhagem industrial de *D. bruxellensis* exibiram apenas 10% da atividade dessa enzima como sendo extracelular. Isto implica na necessidade de transporte da sacarose para o interior das células, com provável gasto energético (LEITE et al., 2012). Normalmente é o que ocorre quando leveduras *Dekkera/Brettanomyces*, estão presentes no mosto, visto que possuem taxa de crescimento mais lento que a de *S. cerevisiae* quando ensaiada em meio

rico e suplementado (CIANI; MACCARELLI; FATICHENTI, 2003; ABBOTT; HYNES; INGLEDEW, 2005).

Em melaço, ocorreu um estímulo na produção de ácido acético pelas células de *D. bruxellensis* mesmo sob condições anaeróbias, possivelmente pela presença de algum acceptor final de elétrons ainda desconhecido, o que não ocorreu em meio de caldo de cana. Houve também um aumento do rendimento da fermentação em melaço, quando comparado com caldo de cana (PEREIRA et al., 2012, 2014). No entanto, tem-se observado por longa data que *D. bruxellensis* não seria viável em um processo industrial que utilize melaço como substrato, pois a assimilação da sacarose continua a ser o principal problema com relação ao longo tempo necessário para a fermentação e o elevado nível de açúcar residual (PEREIRA et al., 2014). Desta forma, verifica-se a importância de se continuar a estudar o efeito do substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, sobre a atividade das leveduras *Dekkera*, e em que situação há um comprometimento maior da fermentação por causa da contaminação com estas leveduras.

2.2.4 Controle do crescimento de *Dekkera* em processos fermentativos

Suárez et al. (2007), em revisão sobre o gênero *Dekkera*, concluíram que estão disponíveis várias técnicas que podem ajudar a identificar a presença de *Brettanomyces/Dekkera* e suas espécies e impedir o seu crescimento. É necessária a combinação de diferentes técnicas para reduzir a produção de aromas indesejáveis (principalmente etilfenóis) produzidos por estas leveduras, embora alguns possam impedir que se tenha um vinho com a qualidade desejada. As técnicas citadas são clarificação por proteína (colagem), filtração, alteração e controle das variáveis físico-químicas, redução dos precursores na formação de etilfenóis, uso de aditivos como SO₂, DMDC (dimetil dicarbonato), quitosana e ácidos, alta pressão, controle biológico e engenharia genética.

Vários estudos tem sido realizados com a finalidade de controlar o crescimento da levedura *Dekkera* tanto em vinhos como em processos fermentativos para produção de etanol combustível. As técnicas adotadas nas vinícolas são mais bem estabelecidas pelo fato de essa levedura ter surgido primeiro como um contaminante

em vinho tinto, principalmente os vinhos envelhecidos em barris de madeira. Agentes clarificantes a base de proteína foram utilizados e podem resultar em uma redução de 40 a 2000 vezes no número de células durante a etapa de colagem (processo realizado para precipitar a proteína do vinho), dependendo da contaminação inicial (MURAT; DUMEAU, 2003).

A filtração também pode ser eficaz no controle de leveduras em geral, mas às vezes é rejeitada pelos produtores uma vez que também reduz o aroma do vinho e a cor, o mesmo ocorrendo com o uso de clarificantes. Além disso, as formas latentes e alongadas de *Brettanomyces* podem ser capazes de passar através de um filtro de 0,45 µm. Devido a essas características, essas técnicas não tem despertado interesse (CALDERÓN et al., 2004).

Suárez et al. (2007) estudaram a deterioração organoléptica dos vinhos causada pela formação de etilfenóis voláteis (produtos metabólicos de *Brettanomyces* e *Dekkera*), e verificaram que a produção dessas substâncias causa um sério problema econômico, especialmente no que diz respeito aos vinhos de alta qualidade que exigem longos períodos de maturação em barris de carvalho. Controlar as variáveis que favorecem o crescimento de *Brettanomyces*, tais como a manutenção do pH e oxigênio em níveis tão baixos quanto possível, assegurando que a temperatura na instalação e armazenamento de vinhos também seja baixa (13 °C em vez de 18 °C), e evitando macerações de grande intensidade, ajudam no controle do contaminante. No entanto, tais precauções vão em direção oposta às tendências de vinificação na produção de vinho tinto (SUÁREZ et al., 2007).

Resultados preliminares indicaram que o proteoma de *D. bruxellensis* é rico em transportadores e genes envolvidos no metabolismo lipídico e ligados à absorção de nitrogênio. Isso pode bem elucidar sua capacidade de sobreviver em um ambiente com teor elevado de etanol e limitação de nutrientes. Estudos sobre a caracterização genética desta espécie poderão mostrar seu verdadeiro papel durante a vinificação (OELOFSE; PRETORIUS; du TOIT, 2008).

No tocante à produção de etanol combustível, Bassi et al. (2013) verificaram que o uso de um tratamento celular combinando baixo pH (2,0) com adição de etanol (11 ou 13%) à solução ácida resultou em uma diminuição cerca de três vezes superior na viabilidade celular de *D. bruxellensis* em relação à *S. cerevisiae*. Quando aplicado em um sistema de fermentação com reciclo celular contaminado com *D. bruxellensis*, esse tratamento baixo pH (2,0) + etanol (13% v/v) aplicado às células

entre os ciclos fermentativos, foi capaz de diminuir e manter a população de *D. bruxellensis* sob controle enquanto a levedura do processo dominava a fermentação ao longo de seis ciclos fermentativos, embora tenha sido observada uma fermentação mais lenta.

Certos aditivos utilizados na vinificação podem inibir o crescimento de *Brettanomyces/Dekkera*. O mais comum é o dióxido de enxofre (SO₂), embora seja difícil manter a sua concentração estável ao longo de grandes períodos em barricas de envelhecimento, onde o ambiente é levemente oxidante (CHATONNET; BOIDRON; DUBOURDIEU, 1993). No entanto, pode ser evitada a deterioração dos vinhos impedindo o crescimento de *Brettanomyces*, através do uso eficaz de SO₂ e por redução do oxigênio disponível durante o processo de vinificação, especialmente durante a transferência de vinho de um barril para outro durante o envelhecimento (du TOIT; PRETORIUS; LONVAUD-FUNEL, 2005). O uso de 0,5-0,8 mg/L de SO₂ molecular é recomendado (SUÁREZ et al., 2007). Deve-se lembrar que o teor de SO₂ molecular é dependente do pH, por exemplo, 30 mg/L de SO₂ livre libera 0,4 mg/L de SO₂ molecular em pH 3,7, e 0,8 mg/L de SO₂ molecular em pH 3,4. Durante o processo de fermentação para produção de etanol combustível, isso deve ser levado em conta, uma vez que durante o tratamento do fermento o pH da cuba pode chegar a 2,0, e durante a fermentação em si, o pH inicial do mosto gira em torno de 4-5.

Uma outra alternativa de inibidor de crescimento de leveduras é o dimetil dicarbonato (DMDC), e embora a sua eficácia tenha sido comprovada, um estudo recente mostrou que uma dose de 400 mg/L não inibiu completamente o crescimento de *B. anomalus*, podendo unicamente restringir seu crescimento. Por outro lado, outras leveduras fermentativas são inibidas por dosagens de 250-400 mg/L (DELFINI et al., 2002).

A quitosana (polissacarídeo derivado de quitina) também tem se mostrado um bom inibidor, possuindo um efeito seletivo sobre *Brettanomyces*, causando um atraso em sua fase latente em experimentos realizados em co-culturas com *S. cerevisiae* (GÓMEZ-RIVAS et al., 2004). *B. bruxellensis* e *B. intermedius* não cresceram na presença de 3-6 g/L de quitosana, e essa concentração não afetou o desenvolvimento de *S. cerevisiae*. A quitosana em concentração de 0,05-0,1% pode ser utilizada para retardar a deterioração por leveduras a 25°C, podendo chegar a inativar algumas espécies (KISKO; AFIADO; ROLETE, 2005).

O controle biológico também vem sendo estudado no controle de leveduras e bactérias contaminantes, envolvendo a utilização de vários agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas, enzimas e linhagens de leveduras geneticamente modificadas com ação antimicrobiana, mas no ambiente de vinho não são muito eficazes, dando espaço a outras técnicas mais utilizadas (du TOIT; PRETORIUS, 2000). Duas toxinas *killer* foram relatadas como eficientes contra *Dekkera/Brettanomyces* (COMITINI et al., 2004), produzidas por *Pichia anomala* (DBVPG 3003) e *Kluyveromyces wickerhamii* (DBVPG 6077). Estas toxinas mostraram um efeito fungicida contra *D. bruxellensis* em vinho durante pelo menos 10 dias, podendo ser utilizadas durante o armazenamento ou envelhecimento. Para o processo de produção de etanol ainda não foram realizados testes de controle biológico, mas pelo fato de o processo de produção não ser estéril e haver uma grande diversidade de micro-organismos, esse tipo de controle pode se tornar mais difícil.

2.3 Contaminantes da fermentação etanólica: bactérias *Lactobacillus*

A contaminação pode vir não somente da cana, mas de focos de contaminação das esteiras, moendas, tubulações e outros equipamentos. Não são todos os micro-organismos que são capazes de crescer no caldo de cana, embora seja um meio propício. A quantidade e os tipos de micro-organismos presentes irão depender das condições de cada etapa do processo de fermentação. No processo fermentativo, bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium* e *Leuconostoc* são normalmente encontradas no caldo. Estes gêneros de micro-organismos produzem ácidos orgânicos tais como o butírico, acético, fórmico e láctico (CAETANO; MADALENO, 2011).

Dentre as bactérias contaminantes, o gênero *Leuconostoc* se destaca por ser comum na produção tanto de açúcar quanto de álcool, causando grandes prejuízos. Este micro-organismo utiliza o açúcar disponível no caldo e produz goma, prejudicando o açúcar como produto final e também o processo em etapas como a de centrifugação. Há outros gêneros produtores de goma como *Klebsiella* e *Acetobacter*, encontrados geralmente na condução de caldo na usina.

Levantamentos da predominância da microbiota presente no processo fermentativo revelaram que 98,52% das bactérias encontradas e isoladas eram Gram-positivas, sendo o gênero *Lactobacillus* o mais frequente (59,75%) entre eles (GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010; CAETANO; MADALENO, 2011).

As infecções por bactérias podem chegar à taxas de 10^8 - 10^9 células/mL e são muitas vezes caracterizadas pelo acúmulo de subprodutos como ácido lático e ácido acético. Estes ácidos orgânicos podem inibir o crescimento das leveduras do processo (BAYROCK; INGLEDEW, 2004; BURTNER et al., 2009) causando queda no rendimento e aumento dos custos de produção por requerer paralisações para limpeza e desinfecção das instalações (NARENDRANATH et al., 1997; BISCHOFF et al., 2009; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011).

A contaminação pode ocorrer em diferentes locais dentro da linha de produção de etanol combustível, sendo que os lactobacilos podem ser encontrados em locais após o trocador de calor, em tanques de sacarificação e em sistemas de propagação contínua de levedura. Ficam protegidos na forma de biofilmes, onde podem atuar como reservatórios de bactérias que continuamente reintroduzem contaminantes (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007; KHATIBI et al., 2014).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são tradicionalmente classificadas em dois sub-grupos metabólicos de acordo com a via utilizada para metabolizar hexoses: homo- e heterofermentativo (KANDLER, 1983). Os homofermentativos não fermentam pentoses ou glucanato. Os heterofermentativos convertem hexoses em CO₂, etanol ou ácido acético e ácido lático, e as pentoses são convertidas a ácido lático e acético (CHERUBIN, 2003).

A espécie *L. fermentum* é um bastonete de 0,5 a 0,9 µm de largura e comprimento bastante variável, podendo apresentar-se isolado ou aos pares, e Gram-positiva, não esporulada e raramente possui motilidade. As principais características fisiológicas dessas bactérias são: anaeróbias facultativas, heterofermentativas, catalase negativa, temperatura ótima entre 30 °C e 40 °C e pH ótimo na faixa de 5,5 a 5,9 (OLIVEIRA; GALLO; ALCARDE, 1995).

Basso et al. (2014) estudaram os efeitos da contaminação por duas espécies de *Lactobacillus*, a *L. plantarum*, pertencente ao grupo das homofermentativas, e a *L. fermentum*, representante do grupo das heterofermentativas, sobre o desempenho fermentativo da levedura CAT-1 no processo de produção de etanol. Quando foram inoculados números iguais de leveduras e bactérias, a espécie homofermentativa foi

mais prejudicial para a levedura de processo do que a heterofermentativa. No entanto, nas condições das unidades industriais, alta densidade celular e curto tempo de fermentação, a espécie heterofermentativa foi mais prejudicial que a homofermentativa, provocando menor rendimento na produção de etanol e maior produção de glicerol.

As bactérias podem também induzir a floculação das leveduras do processo. A formação desses flocos compromete a conversão de açúcar em etanol e CO₂ pela redução da superfície de contato direto entre as células e o meio. Além disso, as operações de recuperação de fermento (reciclo celular) ficam prejudicadas pela presença dessas estruturas, comprometendo seriamente o desempenho industrial (LUDWIG; OLIVA NETO; ANGELIS, 2001).

Carvalho-Netto et al. (2015) estudaram a fisiologia molecular da linhagem industrial PE-2 sob duas condições: fermentação típica (quando a maioria das células está em suspensão) e co-agregação na fermentação. Observaram o perfil de transcrição dessa levedura através de RNA-seq em escala industrial em fermentação descontínua com alimentação. A análise comparativa das duas condições revelou perfis de transcrição diferenciados principalmente por uma repressão gênica profunda nas amostras co-agregadas. Os dados também indicaram que a bactéria *L. fermentum* era a espécie bacteriana responsável pela co-agregação celular e pelos altos níveis de ácidos orgânicos detectados nas amostras.

As espécies *L. fermentum*, *L. vini* e *L. plantarum* foram relatadas como os principais agentes responsáveis pela co-agregação de células de leveduras (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2014). A manose adesina específica (MSA) encontrada em *L. plantarum* e *L. fermentum* tem sido indicada como a responsável pelas interações célula-célula (PRETZER; SNEL; MOLENAAR, 2005; TURNER; SUBRAHMANYAMB; PILETSKYB, 2009).

Apesar de *S. cerevisiae* ser um micro-organismo tolerante a ácidos (ABBOTT et al., 2009), a exposição à concentrações elevadas de ácidos orgânicos produzidos por contaminantes bacterianos retardam o metabolismo da levedura e reduz a aptidão fermentativa (DORTA et al., 2005). Narendranath, Thomas e Ingledew (2001) relataram que o sinergismo entre ácido láctico e ácido acético reduziu a taxa de crescimento de levedura, havendo uma queda no consumo de glicose e na produção de etanol.

Para fermentações industriais, as contaminações bacterianas acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/mL são consideradas prejudiciais, acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL os prejuízos econômicos são significativos e acima de $1,0 \times 10^8$ UFC/mL ocorrem quedas nos rendimentos fermentativo e industrial, dificultando operações de centrifugação devido ao aumento da floculação, ocorrendo ainda o aumento do consumo de ácido sulfúrico e de antibióticos (CHERUBIN, 2003; AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; BASSO et al., 2014).

Em processos industriais de etanol com recirculação de células, a espécie *L. vini* foi encontrada em várias ocasiões associada com *D. bruxellensis* (PASSOTH; BLOMQVIST; SCHNURER, 2007; LUCENA et al., 2010; TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2013). Passoth, Blomqvist e Schnurer (2007) verificaram que um processo industrial de produção de etanol combustível foi dominado por *D. bruxellensis* e *L. vini*, com um alto número de bactérias lácticas. Não houve prejuízo à produtividade e estabilidade do processo, de forma que o consórcio levedura – bactéria foi considerado benéfico. Os experimentos em co-culturas descrito por Tiukova, Eberhard e Passoth (2013) foram a primeira tentativa de compreender a interação específica entre estas duas espécies; no entanto, o resultados não forneceram uma explicação óbvia para essa convivência freqüente. Em cultura em batelada, *L. vini* aparentemente atua como um contaminante, convertendo o açúcar em lactato e biomassa bacteriana às custas da formação de etanol, mas não há nenhuma prova ainda se e como *L. vini* influencia a competição entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*.

Souza et al. (2012) mostraram que a adição de *L. vini* à culturas de *S. cerevisiae* não afetou as células da levedura. Quando adicionado à culturas de *D. bruxellensis*, houve um estímulo na atividade fermentativa da leveduras com conseqüente aumento no rendimento em etanol.

Os resultados descritos acima estimularam o estudo do efeito da contaminação conjunta por *L. fermentum* e *D. bruxellensis* no presente trabalho, procurando verificar se há interação entre os micro-organismos e de que forma isso poderia afetar a fermentação etanólica.

O controle da contaminação bacteriana é normalmente realizado durante a etapa de tratamento do fermento entre os ciclos fermentativos, o qual consiste na adição de ácido sulfúrico a fim de diminuir a floculação causada por bactérias, as quais não suportam pH baixo. Além disto, o ácido promove uma “seleção” de células jovens de

leveduras e uma limpeza da parede celular da levedura, porém, dependendo da agressividade da aplicação, a levedura investe muita energia para recuperar a parede celular, causando lentidão na fermentação e consumo de açúcares para recompor as células (ANGELIS, 2012).

Albers et al. (2011) estudaram o tratamento combinado de NaCl e etanol para o controle de bactérias lácticas e acéticas, sendo as acéticas também muito prejudiciais à viabilidade celular da levedura. Houve ainda um aumento na viabilidade da levedura industrial e aumento na produção de etanol, mesmo em escala industrial, confirmando os resultados positivos encontrados em escala de laboratório, utilizando-se hidrolisado de madeira.

Referências

ABBOTT, D.A.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, v. 66, p. 641-647, 2005.

ABBOTT, D.A.; ZELLE, R.M.; PRONK, J.T.; van MARIS, A.J.A. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 9, p. 1123–1136, 2009.

AGUILAR-USCANGA, M.G.; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 61, p. 157–162, 2003.

AGUILAR-USCANGA, M.G.; GARCIA-ALVARADO, Y.; GOMEZ-RODRIGUEZ, J.; PHISTER, T.; DELIA, M.L.; STREHAIANO, P. Modelling the growth and ethanol production of *Brettanomyces bruxellensis* at different glucose concentrations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 53, p. 141–149, 2011.

ALBERS, E.; EMMA, J.; FRANZEN, C.J.; LARSSON, C. Selective suppression of bacterial contaminants by process conditions during lignocelluloses based yeast fermentations. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 4, n. 59, p. 1-8, 2011.

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBRE, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

AMORIM, H.V.; LEÃO, R.M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, D.R.; AUSTIN, G.D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th edn. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39-46.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.D.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – what has Brazil learned about yeasts inhabiting the ethanol production processes from sugar cane? In: BERNARDES, M.A.S. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Luxembourg: InTech, 2011. p. 67-84.

ANGELIS, D.F. **Controle microbiológico e prevenção de perdas na floculação**.

Disponível em:

<<http://www.cca.ufscar.br/~vico/2%20monitoramento/5%20CONTROLE.pdf>> Acesso em: 23 jun. 2012.

ARAÚJO, P.R.L.; BASÍLIO, A.C.M.; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr, M.A.; MORAIS, J.O.F. Informações sobre algumas leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial isoladas no Nordeste do Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife: Ed. UFPE, 2005. p. 1-7.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 811 p.

BASÍLIO, A.C.M.; PINHEIRO, W.; BRASILEIRO, B. MORAIS Jr, M.A.; SIMÕES, D.A. Utilização do padrão de amplificação com marcador (GTG)5 para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 15., 2005, Recife. **Anais...** Recife, 2005.

BASSI, A.P.G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica**. 2011. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BASSI, A.P.G.; PARALUPPI, A.L.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 3, p. 248-258, 2015.

BASSI, A.P.G.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Single and combined effects of low pH and high concentrations of ethanol on the growth of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains from the fermentation for fuel alcohol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS, A.A.; ORELLI, V.F.D.M. Estabilidade da levedura em condições industriais avaliada pela técnica da cariotipagem (separação eletroforética do DNA cromossômico). In: ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ". **Relatório anual de pesquisas em fermentação alcoólica**: 1993. Piracicaba, 1993. p. 79-95.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. (Ed.). **Biofuel production**: recent developments and prospects. Croatia: INTECH, 2011. p. 85-100.

BASSO, L.C.; ROSA C.A. Sugar cane for potable and fuel ethanol. In: WALKER, G.M.; HUGHES, P.S. (Ed.). **Worldwide distilled spirits conference**: new horizons; energy, environment and enlightenment. Nottingham: Nottingham University Press, 2010. p. 1-7.

BASSO, T.O.; EGGLESTON, G.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; GOMES, F.S.; BASSO, L.C. Homo-and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 169-177, 2014.

BAYROCK, D.P.; INGLEDEW, W.M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 31, p. 362–368, 2004.

BECKNER, M.; IVEY, M.L.; PHISTER, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 53, p. 387–394, 2011.

BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; LEATHERS, T.D.; WORTHINGTON, R.E.; RICH, J.O. Modelling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 103, p. 117–122, 2009.

BLOMQVIST, J. **Dekkera bruxellensis**: a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2011. 59 p.

BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentations characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 87, p. 1487-1497, 2010.

BURTNER, C.; MURAKAMI, C.J.; KENNEDY, B.K.; KAEBERLEIN, M. A molecular mechanism of chronological aging in yeast. **Cell Cycle**, Buffalo, v. 8 p. 1256–1270, 2009.

CAETANO, A.C.G.; MADALENO, L.L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 2, n. 1, p. 27-37, 2011.

CALDERÓN, F.; MORATA, A.; UTHURRY, C.; SUÁREZ, J.A. Aplicaciones de la ultrafiltración en la industria enológica: últimos avances tecnológicos. **Tecnología del vino**, Barcelona, v. 16, p. 49–54, 2004.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.; NORONHA, M.F.; CALDERON, L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J., PEREIRA, G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v. 14, p. 1-13, 2015.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J.N.; DUBOURDIEU, D. Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en ethyl-phenols. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, Villenave d'Ornon, v. 27, p. 277–298, 1993.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. The influence of *Dekkera/Brettanomyces* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Berkeley, v. 46, p. 463-468, 1995.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J.; PONS, M. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 60, p.165-178, 1992.

CHATONNET, P.; VIALA, C.; DUBOURDIEU, D. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. **American Journal of Enology and Viticulture**, Berkeley, v. 48, p. 443-448, 1997.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 137 p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 19, p. 419-422, 2003.

COMITINI, F.; INGENIIS D.J.; PEPE, L.; MANNAZZU, I.; CIANI, M. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 238, p. 235–240, 2004.

DELFINI, C.; GAIA, P.; SCHELLINO, R.; STRANO, M.; PAGLIARA, A.; AMBRO, S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 5605-5611, 2002.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M.S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A.I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 22, p. 177–182, 2005.

du TOIT, M.; PRETORIUS, I.S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal- a review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, Dennesig, v. 21, p. 74–96, 2000.

du TOIT, W.J.; PRETORIUS, I.S.; LONVAUD-FUNEL, A. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 862–871, 2005.

EDLIN, D.A.N.; NARBAD, A.; DICKINSON, J.R.; LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 125, p. 311-316, 1995.

FERNANDES, M.T.N. **Studies on the wine spoilage yeast *Brettanomyces pruxellensis*: 4-ethylphenol production and improved detection**. 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2013.

FERREIRA, R.J.A. **Tecnologia de produção de álcool: fermentação alcoólica**, Rio de Janeiro: [s.ed.], 2008. 73 p.

FUGELSANG, K.; EDWARDS, C.G. **Wine microbiology: practical applications and procedures**. 2nd ed. New York: Springer. 2007. 381 p.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcóolica**. 1990. 338 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade de Campinas, Campinas, 1990.

GÓMEZ-RIVAS, L.; ESCUDERO-ABARCA, B.I.; AGUILAR-USCANGA, M.G.; HAYWARD-JONES, P. M.; MENDOZA, P.; RAMÍREZ, M. Selective antimicrobial action of chitosan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 31, p. 16-22, 2004.

GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcoólica industrial por *Brettanomyces bruxellensis*, impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso**. 1998. 92 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1998.

HERESZTYN, T. Metabolism of volatile phenolic compounds from hydroxycinnamic acids by *Brettanomyces* yeast. **Archives of Microbiology**, Braunschweig, v. 146, p. 96-98, 1986.

KANDLER, O. Carbohydrate-metabolism in lactic-acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 49, p. 209–224, 1983.

KHATIBI, P.A.; ROACH, D.R.; DONOVAN, D.M.; HUGHES, S.R.; BISCHOFF, K.M. *Saccharomyces cerevisiae* expressing bacteriophage endolysins reduce *Lactobacillus* contamination during fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 7, n. 104, p. 1-13, 2014.

KISKO, G.; SHARP, R.; ROLLER, S. Chitosan inactivates spoilage yeasts but enhances survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, p. 872–880, 2005.

KREGER-van RIJ, N.J.W. **The yeasts**: a taxonomic study. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

LALUCE, C.; PALMIERI, M.C.; CRUZ, R.C.L. Growth and fermentation characteristics of new selected straining of *Saccharomyces* at high temperatures and high cell densities. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 37, p. 528-536, 1991.

LEITE, F.C.B.; GOMBERT, A.K.; MORAIS JR, M.A.; SIMÕES, D.A. Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 13, p. 34–43, 2012.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spoilage yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 23–50, 2003.

LOUREIRO, V., MALFEITO-FERREIRA, M., *Dekkera/Brettanomyces* spp. In: BLACKBURN, C. (Ed.). **Food spoilage microorganisms**. Cambridge: Woodhead Publ., 2006. p. 354–398.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M. dos; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, Nottingham, v. 10, p. 298-306, 2010.

LUDWIG, K.M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

MARQUES, A.S. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

MENEGHIN, M.C.; BASSI, A.P.G.; CODATO, C.B.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 295-305, 2013.

MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. **Industries Agricoles et Alimentaires**, Paris, v. 106, p. 559-563, 1989.

MURAT, M.L.; DUMEAU, F. Impact of fining on population levels of certain spoilage micro-organisms in red wines. **Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker**, South Australia, v. 478, p. 92-94, 2003.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 26, p. 171-177, 2001.

NARENDRANATH, N.V.; HYNES, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.S.; du TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during Winemaking: a synoptic review. **South African Journal for Enology and Viticulture**, Dennesig, v.29, n. 2, p.1-17, 2008.

OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E. Efeito da temperature e pH na germinação de esporos de esperos de bactérias em processos de fermentação alcoólica. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 15, n. 80, p. 32-35, 1995.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 73, p. 4354-4356, 2007.

PEREIRA, L.F.; BASSI, A.P.G.; AVANSINI, S.H.; BARBOSA-NETO, A.G.; BRASILEIRO, B.T.R.V.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; MORAIS Jr, M.A. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.

PEREIRA, L.F.; LUCATTI, E.; BASSO, L.C.; MORAIS Jr., M.A. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 481-489, 2014.

PHOWCHINDA, O.; DELIA-DUPUY, M.L.; STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 17, p. 237-242, 1995.

PITA, W.B.; LEITE, F.C.B.; SOUZA-LIBERAL, A.T.; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr., M.A. The ability to use nitrate confers advantage for *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011.

PITA, W.B.; TIUKOVA, I.; LEITE, F.C.; PASSOTH, V.; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr., M.A. The influence of nitrate on the physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis* grown under oxygen limitation. **Yeast**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 111–117, 2013.

PRETZER, G.J.; SNEL, D.; MOLENAAR, A.; WIERSMA, P.A.; BRON, J.; LAMBERT, W.M.; de VOS, R.; van DER MEER, SMITS M. A.; KLEEREBEZEM, M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 187, p. 6128–6136, 2005.

PROCHÁZKA, E.; POLÁKOVÁ, S.; PIŠKUR, J.; SULO, P. Mitochondrial genome from the facultative anaerobe and petite positive yeast *Dekkera bruxellensis* contains the NADH dehydrogenase subunit genes. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 10, n. 5, p. 545–557, 2010.

SKINNER-NEMEC, K.A.; NICHOLS, N.N.; LEATHERS, T.D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 29, p. 379–383, 2007.

SILVA, G.A. ***Dekkera/Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos; características, problemas e identificação**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. 62 p.

SILVA, G.A.; POLETO, C.M.; POLI, J.S.; VALENTE, P. Influence of *Brettanomyces custersianus* upon the activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the tumultuous phase of vinification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, p. 347–356, 2011.

SILVA, L.R.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.M.; TRUJILLO, M.E.; VELÁSQUEZ, E. Analysis of non-coloured phenolics in red wine: effect of *Dekkera bruxellensis* yeast. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 89, p. 185–189, 2005.

SILVA, R.B.O. **Leveduras contaminantes na produção de etanol industrial por processo contínuo: quantificação e identificação**. 1994. 145 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1994.

SOUZA, R.B.; MENEZES, J.A.S.; SOUZA, R.F.R.; DUTRA, E.D.; MORAES JR., M.A. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 209–222, 2015.

SOUZA, R.B.; SANTOS, B.M.; SOUZA, R.F.R.; SILVA, P.K.N.; LUCENA, B.T. L.; MORAIS JR., M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 39, p. 1645–1650, 2012.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; SILVA FILHO, E.A. da; MORAIS, J.O.F. de; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr., M.A. de. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, p. 19–23, 2005.

SOUZA-LIBERAL, A.T.; BASÍLICO, A.C.M.; MONTE RESENDE, A. do; BRASILEIRO, B.T.V.; SILVA FILHO, E.A. da; MORAIS, J.O.F. de; SIMÕES, D.A.; MORAIS Jr., M.A. de. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 538-547, 2007.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J.A.; MORATA, A.; CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 102, p. 10–21, 2007.

TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Torino, v. 61, p. 40-44, 2014.

TURNER, N.W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKYB, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, Kentucky, v.632, p.168-180, 2009.

van DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 32, p. 199–224, 1986.

WALKER, G.M.; MAYNARD, A.I. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 1-3, 1997.

WIJSMAN, M.R.; van DIJKEN, J.P.; van KLEEFF, B.H.A.; SCHEFFERS, W.A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer's effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 50, p. 83–192, 1984.

WOOLFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; PISKUR, J.; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 6, n. 4, p. 721-33, 2007.

YAHARA, G.A.; JAVIER, M.A.; TULIO, M.J.M.; JAVIER, G.R.; GUADALUPE, A.U. M. Modelling of yeast *Brettanomyces bruxellensis* growth at different acetic acid concentrations under aerobic and anaerobic conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Garching, v. 30, n. 6, p. 389-395, 2007.

YOKOYA F.; OLIVA-NETO P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 22, p. 12-18, 1991.

3 EFEITO DO SUBSTRATO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS CONTAMINAÇÕES POR *D. bruxellensis* e *L. fermentum* EM CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO

Resumo

As contaminações por leveduras selvagens e por bactérias no processo de produção de etanol combustível no Brasil causam prejuízos ao rendimento fermentativo e aumento de custos pelo uso de biocidas. No entanto, poucos estudos tem focado no efeito das contaminações conjuntas de leveduras selvagens e bactérias e as possíveis interações entre os micro-organismos, especialmente em função dos diferentes substratos de fermentação. Este trabalho teve por objetivos verificar o efeito do substrato (caldo de cana e melaço) sobre o desenvolvimento das contaminações pela levedura da espécie *Dekkera bruxellensis* e pela bactéria *Lactobacillus fermentum*, em co-culturas. Os testes foram realizados em condições de crescimento (substrato com 4 °Brix, culturas agitadas) e fermentação com reciclo celular (substrato com 16 °Brix, culturas estáticas) tendo a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 como levedura do processo. Houve interação entre as leveduras e a bactéria quando crescidas em caldo de cana 4 °Brix. A levedura industrial não foi afetada pela presença dos micro-organismos contaminantes, no entanto, para *D. bruxellensis* a presença de *L. fermentum* interferiu positivamente no crescimento, com aumento no número de UFC, e consequentemente inibição do crescimento da bactéria. Em melaço, houve um estímulo ao crescimento de *L. fermentum* quando em co-cultura com *S. cerevisiae*. Houve influência das contaminações sobre os parâmetros avaliados no experimento (pH, açúcar redutor total, etanol, glicerol e crescimento das células) e a contaminação conjunta de *L. fermentum* e *D. bruxellensis* potencializou o efeito das contaminações pelos micro-organismos isoladamente, tanto em caldo quanto em melaço.

Palavras-chave: Crescimento; Fermentação; Etanol; Contaminação

Abstract

The contaminations by wild yeasts and bacteria are harmful to the fermentative process for fuel ethanol production in Brazil due to the decrease in ethanol yield and increase in the industrial costs by the use of biocides. However, a few studies have been focused in the effects of simultaneous contaminations of wild yeasts and bacteria and the possible interactions among the microorganisms, especially when different fermentation substrates are utilized. This work aimed to verify the effect of the substrate (sugar cane juice and molasses) on the development of contaminations by *Dekkera bruxellensis* yeast and *Lactobacillus fermentum* bacteria, in co-cultures. Tests were carried out in growing conditions (substrate with 4 °Brix, shaken cultures) and cell-recycled fermentation (substrate with 16 °Brix, static cultures) with the strain PE-2 of *Saccharomyces cerevisiae* as starter yeast. There was interaction among the yeasts and the bacteria when growing in sugarcane juice 4 °Brix. The industrial yeast strain was not affected by the presence of the

contaminant microorganisms, however, for *D. bruxellensis*, the presence of *L. fermentum* influenced positively in the growth, increasing the number of CFU and consequently inhibiting the bacterial growth. In molasses, there was an increase in the growth of *L. fermentum* when in co-culture with *S. cerevisiae*. The contaminations influenced the fermentative parameters (pH, total reducing sugars, ethanol, glycerol and cell growth) and the simultaneous contamination by *L. fermentum* and *D. bruxellensis* potentiated the effect of the contaminations isolately, both in sugarcane juice as in molasses.

Keywords: Growth; Fermentation; Ethanol; Contamination

3.1 Introdução

As unidades produtoras de etanol acopladas às usinas de açúcar utilizam como substrato na fermentação, mosto a base de caldo e melaço, ou muitas vezes somente utilizam melaço e água. A concentração de nutrientes presente no melaço é maior para todos os componentes, pois durante o processo de produção de açúcar, o caldo passa por vários evaporadores e cozedores que concentram o açúcar e os demais nutrientes. Durante esse processo, alguns compostos também podem ser destruídos e se transformar em produtos não desejáveis, com o surgimento de ácidos orgânicos que podem prejudicar o desempenho da levedura por sua ação antimicrobiana.

Outro fator a ser considerado quanto ao substrato refere-se ao estresse osmótico devido à presença de sais nos diferentes substratos, levando à redução no crescimento e perda da viabilidade celular das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática.

Sabe-se que as bactérias e leveduras selvagens produzem metabólitos que podem interferir de alguma forma no crescimento e fermentação das leveduras do processo. A levedura *D. bruxelensis* em mosto a partir de melaço pode produzir acetato, o que não foi observado em caldo de cana, mostrando que o substrato pode desempenhar um papel importante na interação entre os micro-organismos (contaminantes e levedura do processo) durante a fermentação.

Poucos trabalhos tem focado no estudo das contaminações conjuntas de bactérias e leveduras selvagens, restringindo-se ao estudo do efeito de cada micro-organismo isoladamente sobre o processo fermentativo. Menos ainda se conhece o efeito que os diferentes substratos de fermentação pode exercer sobre as interações

microbianas e a influência sobre o rendimento fermentativo. Sendo assim, o objetivo dessa etapa do trabalho foi inicialmente avaliar o crescimento das co-culturas de leveduras industrial e selvagem (*S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, respectivamente) e bactéria *L. fermentum* em diferentes substratos (caldo e melaço). Em seguida, foram conduzidas fermentações contaminadas com um ou dois micro-organismos, tendo a linhagem *S. cerevisiae* PE-2 como levedura do processo, procurando identificar se a presença da bactéria potencializa o efeito da contaminação por *D. bruxellensis* e se há interferência do substrato.

3.2 Revisão Bibliográfica

O melaço é um subproduto do processamento do açúcar e representa uma promissora matéria-prima para a produção de etanol. O Brasil é pioneiro na produção em larga escala de etanol carburante a partir da fermentação de melaço de cana por leveduras, e na Índia, o melaço é amplamente utilizado nas indústrias de álcool (SCHWEINITZER; JOSENHANS, 2010).

A composição do mosto pode variar muito, afetando vários parâmetros operacionais industriais, principalmente o rendimento da fermentação. Embora o teor de cinzas em caldo de cana seja considerado constante, a sua composição mineral pode variar amplamente, dependendo da matéria-prima, ou seja da cana. A fim de minimizar estas diferenças, muitas destilarias passaram a utilizar a estratégia de adição de melaço ao mosto (BASSO et al., 2011). Esta mistura é a mais recomendada, já que algumas unidades possuem caldo com nível nutricional deficiente e o melaço geralmente contém altas concentrações de sais minerais em sua composição (AMORIM; BASSO; LOPES, 2008).

Apesar da importância da composição mineral do caldo e do melaço utilizado nas destilarias do Brasil, esse parâmetro é muitas vezes ignorado pelos analistas do processo, não levando em consideração os diversos minerais que estão presentes no mosto e que são importantes na nutrição da levedura, permitindo um metabolismo celular e crescimento adequado. Os principais componentes são amônio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre e ferro. Além disso, no caso do processo fermentativo, minerais como potássio,

magnésio, cálcio, manganês, ferro, zinco e cobre, são de algum modo essenciais para que se tenha como produto o etanol com um rendimento desejável (WALKER, 2004; AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; SOUZA et al., 2015).

O estresse osmótico pode trazer problemas às fermentações quando o substrato utilizado é o melaço de cana, visto que este substrato apresenta grandes quantidades de sais, também elevados níveis de cálcio, potássio e magnésio, sendo estes níveis excedentes aos necessários à nutrição da levedura. Os níveis médios de potássio (4.000 mg/L), presentes nos processos fermentativos com melaço são suficientes para induzir uma resposta ao estresse com aumento na formação de glicerol, o que pode causar uma diminuição do rendimento em etanol (ALVES, 2000).

Além das questões envolvendo o substrato, as contaminações microbianas merecem ampla atenção. O crescimento de microorganismos contaminantes pode desviar a formação de etanol a partir do açúcar ou mesmo resultar em fermentações incompletas, devido ao acúmulo de compostos tóxicos e por ocorrer de forma mais lenta. O uso de linhagens de leveduras robustas que podem operar em alta concentração de etanol e baixo pH cria uma vantagem seletiva sobre potenciais contaminantes e diminui estas perdas (GOMBERT; van MARIS, 2015).

Outra consequência da natureza não estéril das fermentações nas destilarias, especialmente no cenário brasileiro, é que não importa qual é a linhagem de levedura inoculada, ela pode ser substituída por uma cepa de levedura selvagem diferente durante o processo de produção. De fato, a estirpe exibindo a maior taxa de crescimento específico sob as condições especiais de processo sempre compete com outras cepas, o que complica a introdução de estirpes manipuladas geneticamente ou selecionadas (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

A maioria dos contaminantes bacterianos durante a fermentação de etanol compreendem bactérias do ácido láctico (GALLO, 1990). Espécies de *Lactobacillus* são os principais contaminantes bacterianos encontrados na produção de etanol a partir da cana, devido à sua capacidade de tolerar o estresse gerado pelo etanol (8 – 11%, v/v) e o tratamento ácido (pH 2,0-3,0) com ação antibacteriana que é feito nas células antes de serem inoculadas em uma nova batelada (LUCENA et al., 2010).

Existe uma correlação significativa entre o número de células de bactérias e o rendimento de etanol em escala industrial. Por exemplo, tem sido calculado que

cerca de 20.000 litros de etanol são perdidos por dia (em uma destilaria de tamanho médio), quando a contaminação bacteriana aumenta de 10^7 a 10^8 células/mL (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009).

As bactérias *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. vini* foram relatadas como os principais agentes responsáveis pela co-agregação de células de levedura, ou seja pela floculação. Esse processo gera problemas, pois prejudica a etapa de centrifugação que é necessária para a reciclagem de células, e também reduz a superfície de contato entre a célula da levedura e o substrato, atrasando assim a cinética fermentativa e reduzindo o rendimento (YOKOYA; OLIVA-NETO, 1991; TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2014; CARVALHO-NETTO et al., 2015). A análise comparativa da fermentação industrial conduzida pela linhagem PE-2 nas condições com e sem contaminação por *L. fermentum*, revelou perfis de transcrição diferenciados principalmente por uma repressão gênica profunda nas amostras co-agregadas devido à presença da bactéria (CARVALHO-NETTO et al., 2015).

Basso et al. (2014), com o objetivo de avaliar os efeitos das bactérias lácticas dos dois tipos metabólicos (homo e heterofermentativo) em sistema de fermentação em co-cultura com a levedura utilizando melaço como substrato, detectaram a presença significativa de manitol nas fermentações contaminadas, podendo ser esse metabólito um indicador sensível da contaminação bacteriana, conforme já descrito anteriormente por Eggleston et al. (2007). O rendimento em etanol foi diminuído na presença de ambas as bactérias, mas em maior quantidade com a heterofermentativa (*L. fermentum*), quando uma maior quantidade de açúcar foi desviada para a produção de glicerol e manitol. Este resultado é frequentemente observado em plantas industriais de etanol combustível, pois quando o número de células bacterianas aumenta no fermentador, o rendimento em etanol é afetado negativamente.

Tiukova, Eberhard e Passoth (2014) verificaram que em processos fermentativos com recirculação de células, a bactéria *L. vini* foi associada a *D. bruxellensis* em diversas ocasiões. Observaram que a levedura *D. bruxellensis* parecia ser mais afetada por *L. vini* do que a levedura *S. cerevisiae*, sendo uma possível explicação o fato de a concentração de etanol ter diminuído enquanto a produção de ácido láctico aumentava nas co-culturas. No entanto, isso parece se aplicar somente a culturas em batelada, onde as condições não são favoráveis à *D. bruxellensis*, devido ao fato dessa levedura apresentar consumo de glicose mais

lento e ter baixa taxa de crescimento específico. Os experimentos foram conduzidos em sistema de co-culturas e foram uma primeira tentativa de compreender a interação específica entre estas duas espécies, mas os resultados ainda não forneceram uma explicação óbvia para esta coexistência frequente.

A agregação de *Lactobacillus* com as células de leveduras tem sido atribuída às proteínas ligadas à manose. Foram observadas diferenças quanto ao efeito da manose sobre os flocos formados na associação *L. vini* – *D. bruxellensis* e *L. vini* – *S. cerevisiae*, o que tem sido atribuído ao fato de a parede celular de *S. cerevisiae* apresentar um conteúdo maior de manose do que a parede celular de *D. bruxellensis*. Essa característica resulta na maior capacidade de agregação de *L. vini* com *S. cerevisiae*. As células incorporadas dentro dos flocos tendem a sedimentar enquanto as células individuais permanecem em suspensão. Desta forma, a co-ocorrência frequente de *D. bruxellensis* e *L. vini* pode ocorrer devido ao fato de *D. bruxellensis* estar menos envolvida na floculação e ser assim, menos prejudicada pela presença de *L. vini* (TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2014).

A levedura *D. bruxellensis* pode competir pela glicose com a *S. cerevisiae* em cultivos com limitadas concentrações de substrato mesmo sem o envolvimento de qualquer bactéria (BLOMQVIST et al., 2012). No entanto, é possível que os flocos menores com as células protuberantes formadas pela associação *D. bruxellensis* – *L. vini* representem uma vantagem para as células, pois aumenta a superfície celular, permitindo a absorção mais eficiente dos nutrientes limitados e, ao mesmo tempo protegendo as células na parte interior do floco/agregado das condições de estresse (WUERTZ; OKABE; HAUSNER, 2004; BHINU, 2005; TIUKOVA, EBERHARD; PASSOTH, 2014).

Dessa forma a interação entre a levedura contaminante *D. bruxellensis* e as bactérias pode ser importante para o estabelecimento das contaminações, pois as bactérias lácticas além de afetar a produção de etanol, competindo por substrato e produzindo ácido lático, podem também influenciar a estrutura espacial da população no fermentador (TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2014). Nessa direção, é o que o presente trabalho pretende contribuir ao avaliar a contaminação conjunta de *D. bruxellensis* e *L. fermentum* no processo de fermentação etanólica.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Micro-organismos

Foram utilizadas as linhagens de *D. bruxellensis* CCA155 (CCT7784), *S. cerevisiae* PE-2 e *L. fermentum* CCT5852 (ATCC19255). As linhagens pertencem à coleção de culturas do LAMAM - Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – UFSCar – Campus de Araras.

3.3.2 Testes de crescimento em caldo e melaço

3.3.2.1 Preparo do inóculo

Para os testes de crescimento em meio caldo de cana e melaço com 4 °Brix, primeiramente fez-se a reativação dos micro-organismos, transferindo-os para placas de Petri com meio de cultura sólido: YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L de agar, em água destilada) para leveduras, e MRS (Himedia®) para bactérias, e incubando-se a 30°C por 48 horas. Em seguida, duas alçadas foram retiradas e colocadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de crescimento (caldo ou melaço) e levados para agitação em *shaker* a 30°C, 160 rpm, *overnight*. Este preparo do inóculo foi realizado da mesma maneira para todos os micro-organismos, e quando necessária uma quantidade maior de células, realizou-se uma segunda etapa, onde toda essa suspensão foi centrifugada (Centrifuga *Eppendorf*®) a 580 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas com água destilada estéril, ressuspensas em meio de crescimento e os frascos foram colocados no *shaker* até obtenção do número de células necessário. Para este teste foi padronizado um número de células entre 10^6 – 10^7 UFC/mL de cada levedura tanto nos testes em culturas puras como em co-culturas. A bactéria *L. fermentum* foi quantificada através da densidade ótica em espectrofotômetro *Thermo BioMate 3* em comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se uma curva padrão correlacionando UFC/mL X Absorbância, para 10^7 - 10^8 UFC/mL.

3.3.2.2 Montagem dos experimentos e análises

Foram realizados testes de crescimento com culturas puras e co-culturas de *S. cerevisiae* (Sc), *D. bruxellensis* (Db) e *L. fermentum* (Lf) em meios líquidos de crescimento com caldo e com melaço, ambos com 4 °Brix. Os frascos inoculados foram incubados sob agitação em *shaker* a 160 rpm, a 30°C e nos períodos de tempos determinados, uma amostra foi retirada para acompanhamento do crescimento celular da mesma forma para os dois meios de crescimento. O período de amostragem variou de acordo com o tipo de cultura, sendo que para a cultura pura de *S. cerevisiae*, as amostras foram retiradas em tempos de 0h; 12h; 24h; 36h; e 48h; para a cultura pura de *D. bruxellensis*, 0h; 12h; 24h; 36h; 48; 60h e 72h; e para a cultura pura de *L. fermentum*, 0h; 4h; 8h; 12h; 24h; 36h e 48h. Em sistemas de co-culturas, as amostras foram retiradas nos seguintes períodos de tempos: para Sc+Db: 0h; 12h; 24; 36h; 48h; 60h e 72h; para Sc+Lf: 0h; 4h; 8h; 12h; 24h; 36h e 48h; e para Sc+Db+Lf, 0h; 4h; 8h; 12h; 24h; 36h; 48h; 60h e 72h.

Nos testes com as culturas puras, o crescimento foi quantificado por densidade óptica (absorbância) em espectrofotômetro a 600 nm. Posteriormente os resultados foram transformados em UFC/mL segundo a curva-padrão Absorbância X UFC/mL estabelecida para cada micro-organismo.

Para as co-culturas, a análise da viabilidade celular foi realizada por plaqueamento das amostras nos meios WLN (Acumedia®, adicionado dos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol, ambos na concentração de 10 mg/L), WLD (WLN adicionado de actidione na concentração de 5 mg/L e dos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol, ambos na concentração de 10 mg/L cada) e MRS Himedia® (adicionado do antifúngico nistatina na concentração de 10 mg/L). O meio WLN foi utilizado para estimar o número de UFC/mL de *S. cerevisiae*, após incubação das placas a 30°C por 3 dias, enquanto o meio WLD foi utilizado para estimar o número de UFC/mL de *D. bruxellensis*, com incubação das placas a 30°C por 5 dias. O meio MRS foi empregado nos experimentos em que *L. fermentum* foi inoculado, com incubação das placas a 35°C por 3 dias.

3.3.3 Testes de fermentação em caldo e melaço

3.3.3.1 Preparo do inóculo para a fermentação

Para os testes fermentativos em meio caldo de cana e melaço com 4 °Brix, primeiramente fez-se a reativação dos micro-organismos, transferindo-os para placas de Petri com meio de cultura sólido: YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L de agar, em água destilada) para leveduras, e MRS (Himedia®) para bactérias, e incubando-se a 30°C por 48 horas. Em seguida, duas alçadas foram retiradas e colocadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de crescimento (caldo ou melaço 4 °Brix) e levados para agitação em *shaker* a 30°C, 160 rpm, por cerca de 18 horas. Este preparo do inóculo foi realizado da mesma maneira para todos os micro-organismos, e quando necessária uma quantidade maior de células, realizou-se uma segunda etapa, onde toda essa suspensão foi centrifugada a 580 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células lavadas com água destilada estéril, ressuspendidas em meio de crescimento e os frascos foram colocados no shaker até obtenção do número de células necessário. Para este teste foi padronizado um número de células de aproximadamente 10^8 UFC/mL de cada levedura tanto nos testes em culturas puras como em co-culturas. A bactéria *L. fermentum* foi quantificada através da densidade ótica em espectrofotômetro *Thermo BioMate 3* em comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se uma curva padrão correlacionando UFC/mL X Absorbância, para 10^7 - 10^8 UFC/mL.

3.3.3.2 Montagem dos experimentos

As células foram inoculadas em meio de caldo de cana ou melaço para fermentação com 16 °Brix adicionado de solução de sais (dissolveu-se 50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em 500 mL de água destilada, completando-se o volume para 1000 mL, e esterilizando a seguir) e pH ajustado para 4,5, totalizando um volume de 100 mL em frascos erlenmeyers de 250

mL, em duplicata, sendo os frascos levados para estufa a 30°C, por 12 horas. Em seguida, foi retirada uma amostra para análise do número de micro-organismos e o restante do meio fermentado foi centrifugado a 580 g, por 6 minutos. O sobrenadante foi armazenado a 4°C para análises. A massa celular foi assepticamente adicionada à novo meio de fermentação e a fermentação prosseguiu por 12 h. Este procedimento foi repetido por 6 ciclos fermentativos. Para este experimento, foram testadas a cultura pura de *S. cerevisiae*, e as co-culturas de *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis* (1:1 v/v); *S. cerevisiae* + *L. fermentum* (1:1 v/v) e *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis* + *L. fermentum* (1:1:1 v/v) em igual proporção de células iniciais, para cada substrato caldo e melaço.

3.3.3.3 Análises

Alíquotas de 1 mL do meio fermentado (ao final do ciclo fermentativo) foram diluídas em série em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueadas em meio de cultura respectivo aos micro-organismos (meio de cultura WLN para contagem de leveduras *S. cerevisiae*, meio WLD para contagem de leveduras *D. bruxellensis* e meio MRS para contagem da bactéria *L. fermentum*), conforme especificado no item 3.3.2.2. O restante da amostra foi centrifugado para as análises de pH em pH-metro digital; quantificação do etanol produzido, após destilação das amostras e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital *Anton Paar*; determinação de açúcar redutor total, pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (MILLER, 1959); e quantidade de glicerol por meio de um ensaio enzimático-colorimétrico using o Kit Triglicérides GOD-PAD Liquid Stable, LaborLab.

3.3.3.4 Cálculo de eficiência fermentativa

Para calcular a eficiência fermentativa utilizou-se a fórmula baseada no cálculo estequiométrico teórico de Gay-Lussac (0,511 g/ de etanol/g de glicose) a seguir:

$$Eficiência\ fermentativa\ (%) = \frac{Etanol / (ART_{inicial} - ART_{final})}{0,511} \times 100$$

Foram utilizados os dados de etanol, ART inicial e ART final em g/100 mL, para cada ciclo de cada fermentação, calculando-se ao final, a eficiência fermentativa média (dos 6 ciclos) para cada fermentação.

3.3.3.5 Açúcares Redutores Totais (ART)

Para a quantificação de açúcares redutores totais utilizou a metodologia de Miller (1959). Inicialmente, para a hidrólise da sacarose, pipetou-se 1 mL de cada amostra do sobrenadante para balões volumétricos de 100 mL, em seguida adicionou-se 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizou-se. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionou-se 2,8 mL de NaOH 12 mol/L e completou-se o volume do balão até o menisco com água destilada. Retirou-se 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vortex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital (Thermo® Biomate 3). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado para calibrar o aparelho.

A quantidade de açúcares redutores totais (ART) foi obtida através de uma curva padrão de glicose, pesando-se 1,2 g de glicose previamente seca em dessecador de sílica gel por 7 dias e depois colocada em estufa a 70°C durante 2 horas e novamente levada ao dessecador para ser resfriada. A glicose foi transferida cuidadosamente para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com água destilada. Alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 mL desta solução foram transferidas com pipeta graduada de 10 mL, para balões volumétricos de 100 mL, completando-se o volume também com água destilada. Cada mL dessas

soluções, considerando-se a diluição, continha, respectivamente, 0,12; 0,24; 0,36; 0,48; 0,60; 0,72; 0,84; 0,96; 1,08; 1,20 mg de glicose. Para a leitura da absorbância a 540 nm, realizou-se o mesmo procedimento anterior. A partir da concentração de glicose e da respectiva absorbância, efetuou-se a regressão linear e determinou-se a correlação ($R^2 = 0,9998$). O cálculo da quantidade de açúcares redutores totais foi realizado da seguinte forma:

$$ART \text{ (mg/mL)} = \frac{A \text{ 540 nm} + 0,589 \times \text{diluição da amostra}}{0,7445}$$

3.3.3.6 Análise estatística

Os resultados de eficiência fermentativa foram submetidos à análise de variância, e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software *Statistica*. Os valores de média e desvio-padrão foram determinados no software Microsoft Excel (Microsoft Windows XP).

3.4 Resultados e Discussão

Os resultados de crescimento dos micro-organismos em culturas puras e co-culturas (duplas e triplas) em meio caldo de cana 4 °Brix, estão representados nas Figuras 1, 2 e 3, para *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, respectivamente.

Figura 1 – Crescimento de *S. cerevisiae* (Sc) em meio de caldo de cana 4°Brix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf)

Figura 2 – Crescimento de *D. bruxellensis* (Db) em meio de caldo de cana 4°Brix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* (Sc) e ou *L. fermentum* (Lf)

Figura 3 – Crescimento de *L. fermentum* (Lf) em meio de caldo de cana 4°Brix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* (Sc) e ou *D. bruxellensis* (Db)

A levedura PE-2 apresentou pico de crescimento em 12 horas de cultivo, seja em cultura pura quanto em co-cultura com *D. bruxellensis*, permanecendo em fase

estacionária até o final da amostragem em 48 horas. Não se observou prejuízo ao crescimento de *S. cerevisiae* quando na presença de *D. bruxellensis* ou *L. fermentum* (Figura 1).

A levedura *D. bruxellensis* apresentou mudança em seu padrão de crescimento quando em cultura mista com a levedura industrial, uma vez que a partir de 24 horas o número de UFC foi sempre menor na co-cultura do que em cultura pura. Na presença da bactéria, houve um estímulo ao crescimento de *D. bruxellensis* no período de 36 a 48 horas (Figura 2).

Houve diferença no crescimento da bactéria quando em co-cultura com a levedura industrial e ou com a levedura contaminante em comparação com o cultivo puro. O crescimento de *L. fermentum* foi prejudicado pela presença de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* ou de ambas. Não houve variação no número de UFC/mL de *L. fermentum* quando em associação com *D. bruxellensis* ao longo de 72 horas de co-cultura (Figura 3).

Os resultados mostraram que há interação entre as leveduras e a bactéria quando crescidas em caldo de cana 4 °Brix. A levedura industrial não foi afetada pela presença dos micro-organismos contaminantes, no entanto, para *D. bruxellensis* a presença de *L. fermentum* interferiu positivamente no crescimento, com aumento no número de UFC, e consequentemente inibição do crescimento da bactéria.

Quanto à fermentação em caldo de cana, os resultados estão demonstrados nas Figuras 4, 5 e 6.

A produção de álcool foi sempre menor nas fermentações onde havia contaminação com *D. bruxellensis* e ou *L. fermentum* (Figuras 4B e 4C). A partir do 3º. ciclo fermentativo para *S. cerevisiae*, a produção de etanol se estabilizou (Figura 4A). Nas fermentações contaminadas, não houve estabilização na produção dentro dos seis ciclos fermentativos, porém ao final do 6º. ciclo o teor alcoólico se equipaleou àquele obtido no 3º. ciclo na fermentação não contaminada, ou seja, houve um retardo na produção de etanol devido às contaminações. O teor alcoólico atingiu o máximo de 2 g/100 mL na fermentação contaminada com ambos os micro-organismos, *D. bruxellensis* e *L. fermentum* (Figura 4D).

Quanto ao teor de açúcar redutor total, houve maior sobra na fermentação contaminada com *D. bruxellensis* e *L. fermentum* (Figura 4D).

Figura 4 – pH final e concentrações de açúcar redutor total (ART), glicerol e álcool nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana 16°Brix, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30 °C. Ciclo 0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo

Figura 5 – Número de micro-organismos (UFC/mL) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana 16°Brix, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30 °C. Ciclo 0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo fermentativo

Houve decréscimo do pH nas fermentações contaminadas, quando comparadas com a fermentação sem contaminação, onde o valor do pH permaneceu estável (de 4,5 a 4,4 (Figura 4A). Na presença da *D. bruxellensis*, chegou a 3,44 (Figura 4C), e 3,00 quando *L. fermentum* estava também presente (Figura 4D), comprovando a produção de ácidos tanto pela levedura *D. bruxellensis* quanto por *L. fermentum*.

Pereira (2013) verificou que *D. bruxellensis* produz baixa quantidade de ácidos orgânicos nos substratos da fermentação etanólica. Sendo assim, em condições fermentativas não deve haver relação entre produção de ácidos orgânicos fracos e queda de viabilidade celular de *S. cerevisiae*. No entanto, verificou-se uma queda no número de UFC de *S. cerevisiae* na fermentação contaminada tanto com *D. bruxellensis* quanto com *L. fermentum*, coincidente com a diminuição no pH do meio de fermentação (Figura 5D).

A capacidade de crescimento e tolerância a ambientes com baixo pH tem sido intensamente investigada para linhagens de *D. bruxellensis*. Blomqvist (2011) investigou a influência do pH e temperatura sobre a taxa de crescimento e o rendimento em etanol para uma linhagem industrial de *D. bruxellensis*, e observou que as faixas de pH (3 a 5) e temperatura (25 °C a 37 °C) testadas não afetaram os parâmetros analisados, concluindo que *D. bruxellensis* é bastante resistente às mudanças nas condições ambientais. No presente trabalho, o pH final na fermentação contaminada com ambos (levedura e bactéria) chegou a 3,0, e não houve prejuízo à viabilidade de *D. bruxellensis* (Figuras 5C e 5D). *D. bruxellensis* tem mostrado ser mais bem adaptada ao ambiente industrial do que *S. cerevisiae*, e isto pode estar relacionado à capacidade que estas células possuem em tolerar baixos pH além de possuir elevada resistência ao etanol (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

Em meio de caldo de cana houve produção de glicerol em todas as fermentações, sendo maior já a partir do primeiro ciclo fermentativo na fermentação contaminada unicamente com *D. bruxellensis* (Figura 4C). Na fermentação contaminada com *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, a concentração de glicerol no meio foi máxima no 2º. ciclo, decaindo significativamente a seguir, coincidindo com o abaixamento do pH e aumento na produção de etanol para esta fermentação. No entanto, nas outras fermentações, houve produção crescente de glicerol ao longo dos ciclos fermentativos, à medida em que a produção de etanol aumentava e o pH decaía (Figuras 4A, 4B e 4C).

O glicerol é o mais efetivo osmorregulador presente nas leveduras *S. cerevisiae* e é produzido em situações de estresse osmótico, pois sua formação é aumentada em meios com baixa atividade de água, onde a produção de glicerol sofre influência do pH, temperatura, concentração elevada de sacarose e das linhagens presentes no processo. Quanto maiores os valores destes parâmetros, maior é a produção de

glicerol (GUTIERREZ, 1997). A produção de glicerol está também associada ao crescimento da levedura, de forma que a levedura que apresentasse crescimento mais vigoroso produziria mais glicerol. Além disso, o glicerol também é formado em resposta aos fatores de estresse, como por exemplo, os ciclos celulares na fermentação alcoólica (BASSO et al., 2008), como pode ser aqui observado.

A levedura *S. cerevisiae* PE-2 mostrou o mesmo padrão de crescimento ao longo dos ciclos fermentativos comparando-se a fermentação não contaminada com as fermentações contaminadas com *D. bruxellensis* ou *L. fermentum* (Figuras 5A, 5B e 5C). No entanto, embora tenha ocorrido um aumento no número de UFC ao final do primeiro ciclo fermentativo, houve uma queda na viabilidade da levedura PE-2 na presença de ambos, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, que se manteve constante até o sexto ciclo fermentativo, porém em valores inferiores aos observados em fermentação não contaminada (Figura 5D). Esse resultado pode ser atribuído à queda no pH, conforme discutido anteriormente e ou ao crescimento de ambos os contaminantes (Figura 5D). Nessa fermentação, com a dupla contaminação, o número de UFC de *S. cerevisiae* ao final do sexto ciclo fermentativo foi inferior ao número de UFC dos contaminantes, cerca de 1 ciclo log, embora tenham iniciado a fermentação com números equivalentes. Em caldo de cana 4 °Brix, sob agitação, não foi verificado esse efeito dos contaminantes sobre a viabilidade da PE-2 (Figura 1).

A levedura *D. bruxellensis* apresentou maior variação no número de UFC ao longo dos ciclos fermentativos quando foi inoculada juntamente com *S. cerevisiae* e *L. fermentum*, de $1,46 \times 10^8$ UFC/mL a $7,84 \times 10^8$ UFC/mL, do que com *S. cerevisiae* somente, de $3,35 \times 10^8$ UFC/mL a $6,05 \times 10^8$ UFC/mL (Figuras 5C e 5D). Em meio de caldo de cana 4°Brix, o crescimento de *D. bruxellensis* foi estimulado na presença da bactéria *L. fermentum*, mostrando que há uma interação positiva entre ambos os micro-organismos.

A bactéria *L. fermentum* apresentou crescimento ao longo dos ciclos fermentativos, tanto na presença de *S. cerevisiae* somente quanto na presença dessa levedura e de *D. bruxellensis*, cerca de 1 ciclo log (Figuras 5B e 5D). Em meio de caldo de cana 4°Brix, o crescimento de *L. fermentum* foi prejudicado na presença das leveduras.

Quanto a eficiência fermentativa, houve diferença significativa entre as fermentações contaminadas e não contaminada, não diferindo entre a contaminação

por *D. bruxellensis* ou *L. fermentum*, e sendo estatisticamente inferior na fermentação contaminada com ambos os micro-organismos (Figura 6).

Com os resultados aqui apresentados em substrato caldo, pode-se constatar que houve influência da contaminação sobre os parâmetros avaliados no experimento (pH, ART, etanol, glicerol e crescimento das células) e que a contaminação conjunta de *L. fermentum* e *D. bruxellensis* potencializou o efeito das contaminações pelos micro-organismos isoladamente.

Figura 6 – Eficiência fermentativa média (%) nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30 °C. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey

Os resultados de crescimento dos micro-organismos em culturas puras e co-culturas (duplas e triplas) em meio melaço 4ºBrix, estão representados nas Figuras 7, 8 e 9, para *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, respectivamente.

Figura 7 – Crescimento de *S. cerevisiae* (Sc) em meio de melaço 4ºBrix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf)

Figura 8 – Crescimento de *D. bruxellensis* (Db) em meio de melaço 4ºBrix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* (Sc) e ou *L. fermentum* (Lf)

Figura 9 – Crescimento de *L. fermentum* (Lf) em meio de melaço 4°Brix, a 30 °C, 160 rpm, em cultura pura e em co-cultura com *S. cerevisiae* (Sc) e ou *D. bruxellensis* (Db)

Em meio de melaço 4°Brix, a levedura *S. cerevisiae* apresentou o mesmo padrão de crescimento em cultura pura e co-cultura com *D. bruxellensis*, porém com *L. fermentum* houve um estímulo ao crescimento da levedura, o que não ocorreu em caldo de cana (Figura 7).

O padrão de crescimento de *D. bruxellensis* em melaço em cultura pura e co-culturas foi muito semelhante ao apresentado em caldo, onde verificou-se que o número de UFC dessa levedura foi menor em co-cultura com *S. cerevisiae*, após 24 horas de crescimento. Houve um estímulo ao crescimento de *D. bruxellensis* na presença de *L. fermentum*, como também observado em caldo (Figuras 2 e 8).

Tiukova, Eberhard e Passoth (2014) verificaram que *D. bruxellensis* é favorecida em co-cultivos com bactérias lácticas. Segundo Passoth, Blomqvist e Schnurer (2007), a produção de etanol em processos onde utiliza-se como levedura do processo *D. bruxellensis*, é favorecida na presença de bactérias lácticas, porém, não se conhece a natureza e os mecanismos desta interação. Este resultado foi também observado por Souza et al. (2012), em cultivos mistos associando *D. bruxellensis*, *S. cerevisiae* e *L. vini*.

Para *L. fermentum*, houve um efeito do substrato sobre o crescimento, pois em caldo, a presença dos outros micro-organismos afetou consideravelmente o crescimento da bactéria (Figura 3), enquanto em melaço houve um estímulo ao seu

crescimento quando em co-cultura com *S. cerevisiae*. Houve pouca variação no número de UFC da bactéria na cultura pura e nas co-culturas somente com *D. bruxellensis* e com *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* (Figura 9). A bactéria teve um aumento de um ciclo log no crescimento em caldo (Figura 3).

Quanto à fermentação em melaço, os resultados estão demonstrados nas Figuras 10, 11 e 12.

Em melaço, a produção de álcool foi também inferior nas fermentações onde havia contaminação com *D. bruxellensis* e ou *L. fermentum*. No 4º ciclo fermentativo com *S. cerevisiae* em meio de melaço, a produção de etanol se estabilizou. Nas fermentações contaminadas, não houve estabilização na produção dentro dos seis ciclos fermentativos, como ocorreu em caldo (Figuras 4 e 10).

O pH se manteve entre 4 e 5 para as fermentações sem contaminação e contaminadas ou com *D. bruxellensis* ou com *L. fermentum*. Na fermentação com dupla contaminação, atingiu o valor de 3,1 ao final do sexto ciclo fermentativo (Figura 10D). Essa queda pode ser explicada pela produção de ácidos pela bactéria e por *D. bruxellensis*, quando em co-cultura com ambas e *S. cerevisiae*, pois não houve abaixamento do pH nas co-culturas com os micro-organismos contaminantes isoladamente em melaço (Figura 10).

Os ácidos orgânicos que são frequentemente produzidos em ambientes de fermentação são o láctico e acético. O ácido láctico é produzido por bactérias lácticas contaminantes dos processos industriais, e o ácido acético é sintetizado em pequenas quantidades por leveduras, o efeito inibitório tanto do ácido acético como láctico torna-se maior quanto menor for o pH do meio, devido a uma maior concentração da forma não dissociada dos mesmos (GRAVES et al., 2006).

Quanto ao teor de açúcar redutor total, houve maior sobra na fermentação contaminada com *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, assim como verificado em caldo (Figura 10D).

Figura 10 – pH final, concentrações de açúcar redutor total (ART), glicerol e álcool nas fermentações desenvolvidas em melaço 16°Brix, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C. Ciclo 0 refere-se aos resultados no início do 1º. ciclo

A concentração de glicerol no meio de melaço foi muito semelhante ao apresentado em meio de caldo de cana, tanto na fermentação não contaminada quanto nas fermentações contaminadas. Houve uma queda na produção de glicerol no terceiro ciclo da fermentação com a dupla contaminação, o que pode estar relacionada ao aumento do número de colônias de *D. bruxellensis* e queda no

número de UFC de *S. cerevisiae* (Figura 11D), resultado também observado em caldo de cana.

Sob condições anaeróbias, pouco ou nenhum glicerol foi produzido por células de *D. bruxellensis* (BLOMQVIST et al., 2010; PEREIRA et al., 2012) em comparação com a produção de glicerol por *S. cerevisiae* durante a fermentação. Este efeito é considerado como evidência da baixa capacidade de *D. bruxellensis* em restaurar o equilíbrio redox através da produção de metabólitos, tais como o glicerol (WIJSMAN et al., 1984).

Esse domínio do meio fermentativo pela levedura *D. bruxellensis*, quando em combinação com *L. fermentum*, causou provavelmente os resultados observados quanto à baixa produção de glicerol e etanol. O efeito na produção de etanol foi muito maior em melaço do que em caldo. Esses resultados mostram o efeito que a ocorrência simultânea de *D. bruxellensis* e *L. fermentum* pode causar na fermentação etanólica, especialmente quando o substrato for o melaço. A natureza da interação entre *D. bruxellensis* e *L. fermentum* é desconhecida, demandando estudos posteriores e análises mais refinadas quanto aos metabólitos produzidos e que interferem no desenvolvimento dos contaminantes.

Pereira et al. (2014) concluíram que a fermentação do melaço de cana por *D. bruxellensis* pode exibir alguma diferença em relação ao caldo de cana, sendo mais significativa a capacidade do melaço de estimular a produção de ácido acético, mesmo em anaerobiose, e isso pode ocorrer devido às diferenças na composição mineral/química entre estes substratos.

A quantidade de trealose e glicerol (carboidratos de reserva) parece não estar relacionada ao sucesso adaptativo da *D. bruxellensis* em condições de fermentação industriais, pois em fermentações com melaço a produção de glicerol por células de *D. bruxellensis* foi muito baixa quando comparada com a de *S. cerevisiae*. Com *D. bruxellensis*, muito pouco ou nenhum glicerol foi produzido (PEREIRA et al., 2014).

Quanto ao crescimento, a levedura industrial manteve a população constante por 3 e 2 ciclos fermentativos, em meio de caldo e melaço, respectivamente, crescendo a seguir, justamente onde se observou um menor teor de açúcar residual, em cultivo puro (Figura 11A). Quando em cultivo misto com *D. bruxellensis* ou *L. fermentum*, manteve o padrão de crescer mais rápido em melaço que em caldo (Figuras 11B e 11C). A levedura contaminante teve um aumento de um ciclo log em melaço quando em cultura mista com *S. cerevisiae*, do 2º para o 5º ciclo fermentativo. Em relação à

L. fermentum, a bactéria cresceu significativamente até o 3º ciclo fermentativo, decrescendo a seguir, quando em co-cultura com *S. cerevisiae* (Figura 11B).

Na fermentação com a dupla contaminação, o número de UFC de *S. cerevisiae* ao final do sexto ciclo fermentativo foi inferior ao número de UFC dos contaminantes, cerca de 1 ciclo log em relação à bactéria e de 2 ciclos log em relação à *D. bruxellensis*, embora tenham iniciado a fermentação com números equivalentes (Figura 11D).

Análises fisiológicas de isolados desta espécie mostraram que as leveduras do gênero *Dekkera* apresentam alta capacidade de crescimento, mas reduzida capacidade fermentativa em relação à levedura do processo *S. cerevisiae*, nas condições em que a fermentação é realizada no Brasil (PEREIRA et al., 2012). Esse crescimento foi observado durante as fermentações aqui realizadas, sendo mais pronunciado em melaço do que em caldo.

Segundo Pereira et al. (2014), a fermentação em meio a partir de melaço por *D. bruxellensis* pode exibir características diferentes quando comparadas com caldo, sendo significativa a produção de acetato em meio de melaço, mesmo em anaerobiose. Isso pode ocorrer devido às diferenças de composição química e mineral entre estes substratos. Outro fator também estudado por esses autores foi o acúmulo de trealose, constatando-se que a mesma não é acumulada pela *D. bruxellensis*, e o conteúdo de glicogênio foi 30% inferior ao de *S. cerevisiae*.

Figura 11 – Número de micro-organismos nas fermentações desenvolvidas em melaço 16°Brix, com as culturas pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C

Quanto à eficiência fermentativa, houve diferença significativa entre as fermentações contaminadas com *D. bruxellensis* e não contaminada, não diferindo

entre a contaminação por *D. bruxellensis* ou *L. fermentum*, e sendo estatisticamente inferior na fermentação contaminada com ambos os micro-organismos (Figura 12).

Figura 12 – Eficiência fermentativa média (%) nas fermentações desenvolvidas em melaço 16°Brix, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey

A análise estatística comparativa entre os substratos e cultivos quanto à eficiência fermentativa mostrou que não há diferença entre os substratos (caldo e melaço) mas há diferença entre os cultivos. Houve interação significativa entre substrato e cultivo, de forma que dependendo do tipo de cultivo, o substrato pode influenciar a eficiência fermentativa (Tabela 2). A contaminação com *D. bruxellensis* reduziu a eficiência fermentativa em ambos os substratos, mas com a bactéria *L. fermentum*, a queda na eficiência fermentativa somente é significativa em caldo, mas não é em melaço. Basso et al. (2014) verificaram uma queda de cerca de 4 pontos percentuais na eficiência fermentativa comparando-se a fermentação com cultura pura da linhagem CAT-1 e a fermentação com a CAT-1 contaminada com *L. fermentum* em substrato misto (50% de caldo e 50% de melaço). O decréscimo na eficiência fermentativa no presente trabalho foi bem superior com a contaminação por *D. bruxellensis* em caldo e melaço e com *L. fermentum* em caldo. Nas

fermentações com dupla contaminação (*D. bruxellensis* e *L. fermentum*) houve uma grande queda do rendimento fermentativo, independente do tipo de substrato, sendo significativa diferente dos resultados obtidos nas fermentações contaminadas com um ou outro micro-organismo e na não contaminada (Figura 13).

Tabela 2 – Análise de variância dos valores de eficiência fermentativa (%) apresentada pelos cultivos puro de *S. cerevisiae* (Sc), duplos de *S. cerevisiae* + *D. bruxellensis* (Sc + Db) e *S. cerevisiae* + *L. fermentum* (Sc + Lf) e triplos (Sc+Lf+Db) em fermentações desenvolvidas em caldo e melaço, ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C. O símbolo * indica diferença significativa a 5% para o parâmetro analisado

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Substrato	9,7	1	9,7	0,071
Cultivos	22046,2	3	7348,7	53,528*
Substrato X Cultivos	1829,5	3	609,8	4,442*
Resíduo	12081,3	88	137,3	
Total	35966,7	95	8105,5

Figura 13 – Valores de eficiência fermentativa média (%) nas fermentações desenvolvidas em caldo e melaço, com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Sc) e contaminadas com *D. bruxellensis* (Db) e ou *L. fermentum* (Lf), ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30 °C. Letras diferentes indicam diferença significativa a 5% de significância pelo teste de Tukey

3.5 Conclusões

A contaminação por *D. bruxellensis* provocou o mesmo efeito que a contaminação por *L. fermentum* sobre o parâmetro eficiência fermentativa, comparando-se com a fermentação não contaminada. Houve um decréscimo significativo na eficiência fermentativa, porém esta não diferiu entre as fermentações contaminadas com um ou outro micro-organismo. No entanto, quando ambos os contaminantes estavam presentes, ocorreu um decréscimo maior na eficiência em ambos os substratos. Embora o tipo de substrato tenha influenciado o crescimento dos contaminantes, isso não resultou em alteração na eficiência fermentativa, quando comparados os dois substratos.

Referências

- ALVES, D.M.G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica**. 2000. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Rio Claro, 2000.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Controle da fermentação aumenta e melhora produção do setor. **Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 8, p. 34-37, 2008.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W.M.; KELSALL, A.G.D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. p. 39-46.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. ; LOPES, L. M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v.8, p.1155-1163, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. Ethanol production in Brasil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: SANTOS BERNARDES, M.A. dos. (Ed.). **Biofuel production: recent developments and prospects**. Croatia: INTECH, 2011. chap. 5, p. 85-100.
- BASSO, T.O.; EGGLESTON, G.; AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; GOMES, F.S.; BASSO, L.C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 169-177, 2014.
- BHINU, V.S. Insight into biofilm-associated microbial life. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Norwich, v. 10, p. 15–21, 2005.

BLOMQVIST, J. ***Dekkera bruxellensis* - a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2011. 59 p.

BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Fermentations characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 87, p. 1487-1497, 2010.

BLOMQVIST, J.; NOGUÉ, V.N.; GORWA-GRAUSLUND, M.; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen limited or anaerobic conditions. **Yeast**, Oxford, v. 29, p. 265-274, 2012.

CARVALHO-NETTO, O.V.; CARAZZOLLE, M.F.; MOFATTO, L.S.; TEIXEIRA, P.; NORONHA, M.F.; CALDERON, L.; MIECZKOWSKI, P.A.; ARGUESO, J., PEREIRA, G. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. **Microbial Cell Factories**, Barcelona, v. 14, p. 1-13, 2015.

EGGLESTON, G.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; PAULILLO, S.C.D.; BASSO, T.O. Mannitol as a sensitive indicator of sugarcane deterioration and bacterial contamination in fuel alcohol production. **Zuckerindustrie**, Berlin, v. 132, p. 33-39, 2007.

GALLO, C.R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1990. 338 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

GOMBERT, A.K.; van MARIS, A.J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, Cambridge, v. 33, p. 81-86, 2015.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 6, p. 469-474, 2006.

GUTIERREZ, L.E. Produção de glicerol por linhagens de *Sacharomyces cerevisiae* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 48, p. 55-69, 1991.

LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M. dos; MOREIRA, J.L.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO V. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, Nottingham, v. 10, p. 298, 2010.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007.

PEREIRA, L.F. **Fisiologia da levedura *Dekkera bruxellensis* durante a fermentação com substratos industriais.** 2013. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

PEREIRA, L.F.; BASSI, A.P.G.; AVANSINI, S.H.; BARBOSA-NETO, A.G.; BRASILEIRO, B.T.R.V.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; MORAIS JR, M.A. The physiological characteristics of the yeast *Dekkera bruxellensis* in fully fermentative conditions with cell recycling and in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 101, n. 3, p. 529-539, 2012.

PEREIRA, L.F.; LUCATTI, E.; BASSO, L.C.; MORAIS JR., M.A. The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, n. 3, p. 481-489, 2014.

ROZPEDOWSKA, E.; HELLBORG, L.; ISHCHUK, O.P.; ORHAN, F.; GALAFASSI, S.; MERICO, A.; WOOLFIT, M.; COMPAGNO, C.; PISKUR, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, Evanston, v. 2, n. 302, p. 1-7, 2011. doi: 10.1038/ncomms1305.

SCHWEINITZER, T.; JOSENHANS, C. Bacterial energy taxis: a global strategy? **Archives of Microbiology**, Braunschweig, v. 170, p. 5507-5511, 2010.

SOUZA, R.B.; MENEZES, J.A.S.; SOUZA, R.F.R.; DUTRA, E.D.; MORAES JR., M.A. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 209–222, 2015.

SOUZA, R.B.; SANTOS, B.M.; SOUZA, R.F.R.; SILVA, P.K.N.; LUCENA, B.T. L.; MORAIS JR., M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 39, p. 1645-1650, 2012.

TIUKOVA, I.A.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Applied Biochem**, v.61, p.40-44, 2014.

WALKER, G. M. Metals in yeast fermentation processes. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 54, p. 197–229, 2004.

WIJSMAN, M.R.; van DIJKEN, J.P.; van KLEEFF, B.H.A.; SCHEFFERS, W.A. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditons (Custer's effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 50, p. 83–192, 1984.

WUERTZ, S.; OKABE, S.; HAUSNER, M. Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. **Water Science and Technology**, London, v. 49, p. 327-336, 2004.

YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 22, p. 12-16, 1991.

4 EFEITO DO TRATAMENTO CELULAR BASEADO EM BAIXO pH E ETANOL SOBRE *Dekkera bruxellensis* E *Lactobacillus fermentum* EM CO-CULTURAS

Resumo

O processo de produção de álcool no Brasil possui várias peculiaridades, entre elas o fato do substrato não ser esterilizado, o que demanda o controle das contaminações pelo uso de biocidas ou através do tratamento ácido realizado entre os ciclos fermentativos. A busca por um tratamento que minimize o uso de insumos sem danificar a viabilidade da linhagem industrial é uma busca desejável no setor. Este trabalho teve por objetivos verificar o efeito do tratamento combinado de etanol (13% v/v) e baixo pH (2,0) sobre a viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis* (3 linhagens) e *Lactobacillus fermentum* em cinco ciclos de tratamento e recuperação das células em meio de caldo de cana, em co-culturas. O efeito combinado do pH 2,0 + 13% etanol no tratamento celular resultou em uma diminuição significativa no número de UFC de *D. bruxellensis* (entre 90 e 99%). A levedura PE-2 foi pouco afetada pelo tratamento proposto. A bactéria *L. fermentum* teve seu crescimento afetado em todas as combinações testadas. Como os experimentos foram feitos em co-culturas, verificou-se que pode haver influência de um micro-organismo sobre a viabilidade do outro, dependendo da reação ao tratamento.

Palavras-chave: Tratamento celular; Contaminação; Crescimento

Abstract

The fuel ethanol production in Brazil has some peculiarities, especially the fact that the substrate is not sterile, demanding the control of the contaminations by the use of biocides or by the acid treatment carried out between the fermentative cycles. The search for a treatment that minimizes the use of products without damaging the industrial yeast viability is a desirable task. This work aimed to verify the effect of the cell treatment based on the addition of ethanol (13% v/v) to a acid solution (pH 2.0) on the cell viability of *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis* (3 strains) and *Lactobacillus fermentum* in five cycles of treatment and cell recovery after inoculation in sugarcane juice medium, in co-cultures. The combined effect of pH 2.0 + 13% ethanol in the cell treatment resulted in a significant decrease (90-99%) in the CFU number of *D. bruxellensis*. The industrial yeast PE-2 was a little affected by the treatment. The growth of the bacteria *L. fermentum* was affected in all the combinations tested. As the experiments were performed with co-cultures, an influence of a microorganism over the viability of another was observed, depending of the reaction to the treatment.

Keywords: Cell treatment; Contamination; Growth

4.1 Introdução

A produção de etanol no Brasil possui particularidades, dentre elas vale destacar o reciclo do fermento durante toda a safra e o tratamento ácido que é realizado com a finalidade de redução da quantidade de bactérias presentes na massa de leveduras. Esse tratamento ocorre antes do início de cada batelada, de forma que o creme ou leite de levedura passa por cerca de uma a duas horas em cuba de tratamento com pH 2,0 a 3,0, dependendo da taxa de contaminação, e em seguida segue para uma nova fermentação.

Esse tratamento é de certa forma eficiente no controle de bactérias, mas não tem efeito sobre as leveduras contaminantes que estão presentes no processo, como por exemplo, as leveduras do gênero *Dekkera*, que vem se tornando cada vez mais importante como contaminante em virtude da sua robustez e adaptação ao meio estressante que é o ambiente industrial. Há também uma grande diversidade bacteriana nas dornas de fermentação, predominando as bactérias lácticas. As espécies *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* são as mais comuns nas dornas de fermentação na produção de etanol.

Poucos trabalhos tem estudado a interação entre a levedura industrial, as bactérias e as leveduras contaminantes. Esse estudo se faz necessário uma vez que na dorna de fermentação há uma dinâmica microbiana muito intensa devido a não esterilização do mosto. A busca por um tratamento físico ou químico que afete seletivamente a levedura e a bactéria contaminante sem afetar a levedura do processo não é uma tarefa fácil, mas é sem dúvida desafiadora.

Resultados obtidos em trabalho anterior (BASSI et al., 2013) mostraram que o tratamento combinado de baixo pH (2,0) e etanol (11 ou 13%) resultou em decréscimo da viabilidade celular de *D. bruxellensis* cerca de três vezes maior quando comparado com *S. cerevisiae*. A viabilidade inicial das células tratadas foi restaurada após 8 horas de crescimento em caldo de cana, com exceção do tratamento combinado em relação à *D. bruxellensis*. Dessa forma, o objetivo nesse trabalho foi verificar o efeito do tratamento combinado baixo pH + etanol sobre o crescimento das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* e da bactéria *Lactobacillus fermentum*, em co-culturas, ao longo de 5 ciclos de tratamento celular, procurando verificar se a contaminação pela bactéria poderia afetar o controle exercido pelo tratamento combinado sobre *D. bruxellensis*.

4.2 Revisão Bibliográfica

São vários os fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana), que afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol. Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes. Altos teores alcoólicos, temperaturas elevadas, acidez do meio, presença de sulfito (utilizado no tratamento do caldo) e contaminação bacteriana são exemplos de condições que causam estresse às células de levedura (ALVES, 1994; LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001; LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; LUCENA et al., 2010; BASSO et al., 2014).

As respostas aos diferentes tipos de estresse é uma característica fundamental na adaptação dos organismos vivos às condições adversas do ambiente. As células de *S. cerevisiae*, quando submetidas a condições de estresse, desenvolvem uma rápida resposta molecular para reparar danos e proteger as estruturas (ESTRUCH, 2000).

Amorim (2005) afirmou que na fermentação industrial, a levedura encontra-se continuamente exposta a situações estressantes e que de acordo com a intensidade, tais situações podem acarretar a exaustão de seu conteúdo de trealose, o que gera, segundo ele, queda da viabilidade da célula.

Segundo Torija et al. (2003), quando a temperatura do biorreator é maior que 35°C ocorre um decréscimo da viabilidade celular. As linhagens industriais de *S. cerevisiae* são normalmente resistentes a alta temperatura (MONACO, 2007), mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH, além dos metabólitos formados por contaminantes (SILVA-FILHO et al., 2005).

Sabe-se que as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de pH, sendo mais adequada a faixa entre 4 e 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5. A tolerância à acidez é outra característica importante para as leveduras industriais (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001), porém, sabe-se que valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, podem ainda aumentar a sensibilidade ao

etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO₂, ocorrendo o sinergismo acima mencionado (GOMES, 1988).

Trabalhos têm demonstrado a eficiência do tratamento ácido do fermento para o bom desempenho da fermentação, utilizando ácido sulfúrico em níveis de pH de 2,0 a 3,0, sem afetar consideravelmente a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (STUPIELLO; HORII, 1981; GOMES, 1988). Além disso, o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção constitui-se em uma técnica simples que auxilia também na desfloculação do fermento, principalmente quando contaminado com bactérias indutoras de floculação (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001).

Ceballos-Schiavone (2009) realizou testes com diferentes valores de pH (2,5 e 6,0) e concentrações de etanol (15, 20, 25, 30 e 35%) com a finalidade de controlar sete espécies de *Lactobacillus*, verificando que essas bactérias se mostraram sensíveis às concentrações superiores a 20% (v/v) de etanol, não sendo observado efeitos negativos sobre as células de leveduras quando utilizadas as concentrações de 20 a 25% (v/v). Em pH 2,5, concentração de 20% v/v de etanol e 90 minutos de tratamento, a contagem da bactéria foi próxima de zero (36 UFC/mL), chegando a zero em 120 minutos. Para o pH 6,0, os valores de contagem chegaram próximo de zero (0,77 UFC/mL) em concentração de 25% v/v no tempo de 90 minutos, também chegando a zero a 120 minutos.

Em processos industriais, um caminho para o controle de *D. bruxellensis*, uma importante levedura contaminante na produção de etanol combustível, é conhecer os limites dessa levedura, para assim poder atingi-la sem prejudicar a levedura industrial. Trabalho de Guerra (1998) mostrou a possibilidade de controle do crescimento dessa levedura mediante procedimentos como minimização do teor de oxigênio e concentrações de etanol maximizadas. Essas condições poderiam exercer um controle do crescimento das linhagens contaminantes por estas não suportarem altas taxas de etanol e anaerobiose.

No entanto, Blomqvist (2011) pesquisou a influência do pH e temperatura sobre a taxa de crescimento e o rendimento em etanol para uma linhagem industrial de *D. bruxellensis*, e observou que valores de pH na faixa de 3 a 5 e temperatura de 25 °C a 37 °C não afetaram o crescimento e a produção de etanol dessa levedura, concluindo que *D. bruxellensis* é bastante resistente às mudanças nas condições ambientais. Essa espécie tem se mostrado bem adaptada ao ambiente industrial, com maior tendência em tolerar baixos valores de pH, além de possuir elevada

resistência ao etanol, parâmetros esses que estão presentes nos processos fermentativos (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

Verificou-se que as linhagens de *D. bruxellensis* têm boa adaptabilidade às situações de estresse de etanol e pH, pois em condições não estressantes a linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 se sobressaiu no crescimento, porém nas situações de estresse de pH e etanol, as linhagens de *D. bruxellensis* mostraram maior adaptabilidade (MENEZHIN et al., 2013).

Nas unidades industriais, normalmente é realizado o tratamento ácido do fermento com solução de ácido sulfúrico pH 2,0-3,0, por cerca de 1-2 horas, com agitação (BASSO et al., 2008), porém, nesta condição, dificilmente se conseguiria controlar a contaminação por *D. bruxellensis*, mesmo se considerando que na indústria o fermento passa por ciclos sucessivos do início ao fim da safra, e conseqüentemente por sucessivos tratamentos ácidos.

Bassi et al. (2013), em trabalho sobre o efeito do pH e etanol sobre três linhagens de *D. bruxellensis*, testaram um tratamento combinado pH 2,0 e 13% etanol no controle de *D. bruxellensis* e concluíram que o tratamento não afetava a levedura PE-2, mas significativamente inibia o desenvolvimento da levedura contaminante.

Como na dorna de fermentação e conseqüentemente em todo o processo há uma grande diversidade de micro-organismos que entram através da matéria-prima e de certa forma se adaptam às condições estressantes do ambiente industrial, há necessidade de verificar o efeito de diferentes tratamentos sobre os contaminantes em co-culturas. Há relatos da co-ocorrência de *L. vini* e *D. bruxellensis* em unidades de produção de etanol (PASSOTH; BLOMQVIST; SCHNURER, 2007; SOUZA et al., 2012; TIUKOVA; EBERHARD; PASSOTH, 2014), demonstrando haver interação entre esses micro-organismos.

Verificar o efeito do baixo pH associado com etanol sobre as linhagens de *D. bruxellensis*, de *S. cerevisiae* e da bactéria *L. fermentum*, é portanto, o objetivo principal desse trabalho, procurando modificar a etapa do tratamento celular realizado entre os ciclos de fermentação visando o controle do crescimento dos contaminantes e o efeito mínimo sobre a levedura do processo, e se a presença da bactéria afeta o controle exercido pelo tratamento proposto.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Micro-organismos

Foram utilizadas três linhagens de *D. bruxellensis*, CCA155 (CCT7784), CCA059 (CCT7786) e CCA077 (CCT7785), uma linhagem de *S. cerevisiae* (PE-2) e uma linhagem de *L. fermentum* CCT5852 (ATCC 19255). Foram testadas as combinações CCA155 + PE-2 + *L. fermentum*, CCA059 + PE-2 + *L. fermentum* e CCA077 + PE-2 + *L. fermentum*.

4.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado da seguinte forma: em tubos falcon de 50 mL contendo 20 mL de meio caldo de cana 4 °Brix, pH 5,5, foram colocadas duas alçadas dos micro-organismos separadamente, estes levados ao agitador a 30°C e 160 rpm por 12 horas. Para cada linhagem foram utilizados 12 tubos falcons, a fim de conseguir a quantidade de massa úmida necessária para o experimento. Em seguida, o material foi centrifugado em centrífuga Eppendorf Centrifuge 5810R por cinco minutos a 580 g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 5 mL de caldo a 4 °Brix. Este volume foi adicionado a erlenmeyers de 125 mL contendo 45 mL de caldo 4 °Brix, a 30°C e 160 rpm, também por 12 horas. Esses foram centrifugados a 580 g por 5 minutos, novamente o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas uma vez com água destilada estéril. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em água para contagem em câmara de Neubauer, padronizando-se a contagem final em $\sim 10^8$ células/mL para cada levedura. A bactéria *L. fermentum* foi quantificada através da densidade ótica em espectrofotômetro *Thermo BioMate 3* com comprimento de onda de 540 nm, utilizando-se uma curva padrão correlacionando UFC/mL X Absorbância, para $\sim 10^8$ UFC/mL.

4.3.3 Montagem do experimento

Um volume de 5 mL de massa celular (em igual proporção para cada micro-organismo, 1:1:1 v/v/v), foi ressuspensionado em solução de ácido sulfúrico esterilizada (pH 2,0) e acrescida de 13% de etanol absoluto (v/v), em um volume final de 50 mL em erlenmeyers de 125 mL. Os frascos (em duplicata) com os micro-organismos em co-cultura foram levados ao agitador a 30°C, 160 rpm por 1 hora e 30 minutos. Em seguida as células foram separadas da solução ácida por centrifugação, lavadas com água destilada estéril duas vezes e inoculadas em meio de caldo de cana 4 °Brix, incubação a 30°C e 160 rpm por 9 horas, em 5 ciclos sucessivos de tratamento e recuperação em meio de caldo de cana.

Foram retiradas amostras da massa celular antes e após o tratamento das células, e 8 horas após a inoculação das células tratadas em meio de caldo de cana. As células foram lavadas em água destilada e a análise da viabilidade celular foi realizada por plaqueamento das amostras em meio YPD (adicionado dos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol, ambos na concentração de 10 mg/L) para a contagem de *S. cerevisiae*, YPDD (YPD adicionado de actidione na concentração de 5 mg/L e dos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol, ambos na concentração de 10 mg/L cada) para contagem de *D. bruxellensis*, e meio MRS Himedia® (adicionado do antifúngico nistatina na concentração de 10 mg/L) para *L. fermentum*. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas (leveduras) e 35°C por 72 horas (bactéria), para contagem do número de UFC/mL.

A solução ácida foi preparada adicionando-se ácido sulfúrico à água destilada até obtenção do pH 2,0, monitorando-se os valores de pH em pH-metro digital. Em seguida, um volume de 45 mL da solução foi transferido para erlenmeyers de 125 mL, sendo a seguir os frascos esterilizados em autoclave.

4.4 Resultados e Discussão

Estudos anteriores indicaram que uma ação combinada de baixo pH 2,0 e 13% de etanol inibiu o crescimento da linhagem CCA155 de *D. bruxellensis* durante a fermentação, quando aplicada no tratamento do fermento a cada ciclo de

fermentação (BASSI et al., 2013). No presente trabalho, foi avaliado o efeito desse tratamento celular sobre co-culturas de *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* e *L. fermentum* em cinco ciclos sucessivos de tratamento, verificando-se também a capacidade de recuperação das células quando inoculadas em meio de caldo de cana após o tratamento ácido - etanol.

Em co-cultura com a linhagem CCA155 de *D. bruxellensis*, para *S. cerevisiae* foi observada uma diminuição no número de UFC após cada ciclo de tratamento, mas o número de colônias aumentou após cada ciclo em meio de caldo de cana, ou seja, após cada período de recuperação. Ao final do segundo ciclo, o número de UFC após crescimento em caldo de cana ($4,0 \times 10^8$ UFC/mL) foi muito semelhante ao valor inicial ($3,1 \times 10^8$ UFC/mL), mostrando que a linhagem industrial não sofreria redução no número de colônias se esse tratamento fosse utilizado (Figura 1A). No entanto, para *D. bruxellensis*, ao final do quinto ciclo, o número de UFC foi inferior ao valor inicial, com redução de cerca de 1 ciclo log (de $7,4 \times 10^8$ UFC/mL para $5,7 \times 10^7$ UFC/mL), ou seja, uma redução de 92% (Figura 1B). A capacidade de se recuperar a partir das condições de estresse em ciclos sucessivos de tratamento da célula foi maior para *S. cerevisiae* do que para *D. bruxellensis* linhagem CCA155. A bactéria *L. fermentum* foi totalmente controlada desde o primeiro ciclo de tratamento em co-cultura com *S. cerevisiae* e a linhagem CCA155 de *D. bruxellensis* (Figura 1C).

Figura 1 – Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), em cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + *D. bruxellensis* (CCA155) + *L. fermentum*. Legenda: **Inicial**: contagem de colônias antes do tratamento; **Final**: contagem de colônias após o tratamento; **Recuperação**: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4 °Brix, incubação a 30 °C, 160 rpm

Os resultados obtidos para a linhagem PE-2 de *S. cerevisiae* em co-cultura com a linhagem CCA059 de *D. bruxellensis* foram diferentes dos resultados obtidos na co-cultura com a linhagem CCA155 de *D. bruxellensis*, pois com a primeira linhagem, a levedura do processo não teve alterações no número de UFC/mL, porém com a segunda, houve queda no número de UFC ao longo dos ciclos de tratamento - recuperação. Possivelmente, a morte das células da linhagem contaminante CCA059 pode ter de alguma forma interferido com a viabilidade da PE-2, especialmente nos primeiros ciclos, e embora tenha havido uma recuperação, no 5º. ciclo o efeito sobre a linhagem CCA059 foi ainda maior, e assim a levedura do processo não conseguiu reconstituir a população aos níveis iniciais.

Em co-cultura com a linhagem *D. bruxellensis* CCA077, a linhagem industrial *S. cerevisiae* PE-2 apresentou o mesmo resultado que na co-cultura com a linhagem CCA155, com queda de 33,2% no número de UFC, comparando-se o valor inicial e ao final do 5º. ciclo de tratamento-recuperação, se mantendo estável por todos os cinco ciclos (Figura 3A). A linhagem CCA077 apresentou uma queda no crescimento de cerca de um ciclo log (90%), considerando-se o início dos ciclos e o término do último ciclo, após recuperação das células em caldo de cana (Figura 3B). Quanto à bactéria *L. fermentum*, não foram detectadas células viáveis após o primeiro ciclo de tratamento pH 2,0 + 13% etanol tampouco após o período de recuperação, e até o final do 5º. ciclo (Figura 3C).

A

B

C

Figura 2 – Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), em cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + *D. bruxellensis* (CCA059) + *L. fermentum*. Legenda: **Inicial**: contagem de colônias antes do tratamento; **Final**: contagem de colônias após o tratamento; **Recuperação**: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4 °Brix, incubação a 30 °C, 160 rpm

Figura 3 – Número de UFC/mL durante os ciclos sucessivos de tratamento com solução de ácido sulfúrico (pH 2,0) e etanol (13% v/v), em cultura mista de *S. cerevisiae* PE-2 + *D. bruxellensis* (CCA077) + *L. fermentum*. Legenda: **Inicial**: contagem de colônias antes do tratamento; **Final**: contagem de colônias após o tratamento; **Recuperação**: contagem de colônias após 8 horas de incubação das células tratadas em meio caldo de cana 4 °Brix, incubação a 30 °C, 160 rpm

A linhagem de *D. bruxellensis* CCA059 mostrou uma resistência menor ao etanol quando adicionado ao meio YPD líquido. A concentração mínima de etanol que causou inibição total do crescimento foi de 5% (MENEZHIN et al., 2013). Para a linhagem CCA077, houve inibição total do crescimento a 2% de etanol com 10^5 células/mL, enquanto com 10^6 células/mL, a concentração inibitória foi 4%, comprovando que a quantidade de células inicial é fator importante em particular para a linhagem CCA077 no tocante à tolerância ao estresse alcoólico (CODATO, 2009).

Trabalhos anteriores demonstraram a eficiência do tratamento ácido do fermento para o bom desempenho da fermentação, utilizando ácido sulfúrico em níveis de pH de 2,0 a 3,0, sem afetar consideravelmente a viabilidade celular de *S. cerevisiae* (STUPIELLO; HORII, 1981; GOMES, 1988). Della-Bianca et al. (2014) avaliaram a cinética de crescimento da linhagem PE-2 e da levedura de panificação incubando-as em pH 1,5, e observaram uma maior sobrevivência da linhagem PE-2, indicando que a lavagem com ácido sulfúrico exerce uma pressão seletiva sobre os micro-organismos ali presentes e que a linhagem selecionada obteve melhor desempenho com esse tratamento.

Além disso, o uso do ácido sulfúrico como agente de desinfecção constitui-se em uma técnica simples que auxilia também na desfloculação do fermento, principalmente quando contaminado com bactérias indutoras de floculação (LUDWIG; OLIVA-NETO; ANGELIS, 2001). Trabalhos anteriores mostraram que o tratamento celular em solução ácida com pH 2,0 não causou perda de viabilidade da linhagem industrial PE-2 e da levedura contaminante *D. bruxellensis* (linhagem CCA155), mas reduziu o número de UFC de *L. fermentum* de 10^8 UFC/mL para 10^1 UFC/mL, com recuperação de um ciclo log após crescimento em meio de caldo de cana (dados não publicados). Desta forma, somente a utilização de solução ácida pH 2,0 não seria suficiente para afetar o crescimento da levedura contaminante, embora tenha causado grande diminuição na viabilidade da bactéria.

A proposição da adição de etanol ao tratamento ácido pode resultar em um maior controle do crescimento da levedura contaminante *D. bruxellensis*, sem necessidade de alterar significativamente o processo industrial. Verificou-se reduções de 90 a 99,9% no número de UFC/mL das linhagens de *D. bruxellensis*, enquanto a levedura do processo teve uma redução variando de 27 a 60%, ao final dos cinco ciclos de tratamento – recuperação. A viabilidade da linhagem do processo

dependeu da linhagem de *D. bruxellensis* adicionada em co-cultura. A bactéria *L. fermentum* não exerceu nenhuma influência sobre a viabilidade da levedura do processo ou da levedura contaminante, tendo sido morta pelo tratamento ácido + etanol logo no primeiro ciclo de tratamento, não apresentando recuperação em meio de caldo de cana.

Os testes realizados foram feitos com uma alta concentração de levedura contaminante (cerca de 10^8 UFC/mL) e mesmo com essa alta taxa de contaminação, alcançou-se um bom resultado para as três linhagens de *D. bruxellensis*. No sistema industrial onde a taxa de contaminação inicial geralmente é menor, espera-se que haja um bom controle da levedura e bactéria contaminantes sem prejudicar a levedura de interesse industrial, utilizando-se esse tratamento.

Os testes foram feitos em condições de crescimento (baixo teor de açúcar no caldo e agitação) e não se sabe se o tratamento ácido – etanol pode afetar a fisiologia da levedura do processo, impactando o rendimento em etanol. Bassi et al. (2013) testaram esse tratamento combinado, com adição parcelada de 13% etanol à solução ácida - pH 2,0, e verificaram que, a despeito da menor velocidade de fermentação, o crescimento de *D. bruxellensis* foi inibido, sem afetar *S. cerevisiae*.

Gombert; van Maris (2015) afirmaram que além de se proceder às medidas de higiene, tais como centrifugação e lavagem das células com ácido sulfúrico durante a reciclagem do fermento em processos brasileiros de etanol, a diferença quanto à tolerância às condições do processo entre a levedura industrial e os micro-organismos contaminantes, no sentido de minimizar o impacto da contaminação em fermentações, deve ser avaliada. Teores elevados de etanol podem dar uma vantagem seletiva para levedura do processo, o que foi também observado nesse teste. Os mesmos autores citam ainda que investigando a fisiologia das leveduras contaminantes, tais como *D. bruxellensis* ou bactérias contaminantes como os lactobacilos, pode-se chegar a novas estratégias para controlar os níveis de contaminação.

4.5 Conclusões

O efeito combinado de pH 2,0 e 13% de etanol no tratamento das células resultou em redução de 90 e 99,9% no número de UFC de linhagens de *D. bruxellensis*. A levedura PE-2 foi pouco afetada pelo tratamento proposto. A bactéria *L. fermentum* teve seu crescimento afetado em todas as combinações testadas. Como os experimentos foram feitos em co-culturas, verificou-se que pode haver influência de um micro-organismo sobre a viabilidade do outro, dependendo da reação ao tratamento.

Referências

ALVES, D.M.G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. Piracicaba, 1994. 274 p.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. São Paulo: Fermentec, 2005. 448 p.

BASSI, A.P.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Single and combined effects of low pH and high concentrations of ethanol on the growth of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains from the fermentation for fuel alcohol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, L.M. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASSO, T.O.; GOMES, F.S.; LOPES, M.L.; AMORIM, H.V.A.; EGGLESTON, G.; BASSO, L.C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 169–177, 2014.

BLOMQVIST, J. ***Dekkera bruxellensis*: a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates**. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 2011. 59 p.

CEBALLOS-SCHIAVONE, C.H.M. **Tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar visando a redução de contaminantes bacterianos *Lactobacillus* na produção de etanol e eficiência de tratamento do fermento.** 2009. 177 p.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”; Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

CODATO, C.B. **Potencial fermentativo e tolerância ao etanol de linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica.** 2009. 53 p. Monografia (Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas) – Fundação Hermínio Ometto, Araras, 2009.

DELLA-BIANCA, B.E.; HULSTER, E.; PRONK, J.T.; MARIS, A.J.A.; GOMBERT, A.K. Physiology of the fuel ethanol strain *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 at low pH indicates a context-dependent performance relevant for industrial applications. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 14, p. 1196-1205, 2014.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factor, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 469-486, 2000.

GOMBERT, A.K.; van MARIS, A.J. Improving conversion yield of fermentable sugars into fuel ethanol in 1st generation yeast-based production processes. **Current Opinion in Biotechnology**, Cambridge, v. 33, p. 81-86, 2015.

GOMES, E. **Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica.** 1988. 206 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba, 1988.

GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcoólica industrial por *Brettanomyces bruxellensis*, impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso.** 1998. 92 p. Tese (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1998.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 1-43. (Biotecnologia Industrial, 3).

LUCENA, B.T.L.; SANTOS B.M. dos; MOREIRA, J.L.S.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES A.C.; AZEVEDO V.; MIYOSHI A.; THOMPSON F.L.; MORAIS, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, Nottingham, v. 10, p. 298–306, 2010.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. Quantificação da floculação de *S. cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, p. 63-68, 2001.

MENEGHIN, M.C.; BASSI, A.P.G.; CODATO, C.B.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Oxford, v. 30, n. 8, p. 295-305, 2013.

MONACO, M.A.S.L. **Efeito protetor do magnésio no choque térmico e estresse pelo etanol em leveduras *Saccharomyces cerevisiae***. 2007. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007.

ROZPEDOWSKA, E.; HELLBORG, L.; ISHCHUK, O.P.; ORHAN, F.; GALAFASSI, S.; MERICO, A.; WOOLFIT, M.; COMPAGNO, C.; PISKUR, J. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. **Nature Communications**, Evanston, v. 2, n. 302, p. 1-7, 2011. doi: 10.1038/ncomms1305.

SILVA-FILHO, E.A.; SANTOS, S.K.B.; RESENTE, A.M.; MORAIS, J.O.F.; MORAIS Jr., M.A.; SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 88, p. 13-23, 2005.

SOUZA, R.B.; SANTOS, B.M.; SOUZA, R.F.R.; SILVA, P.K.N.; LUCENA, B.T. L.; MORAIS JR., M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 39, p. 1645-1650, 2012.

STUPIELLO, J.P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, São Paulo, v. 17, p. 43-46, 1981.

TIUKOVA, I.A.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Torino, v. 61, p. 40-44, 2014.

TORJA, M.J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J.M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, p. 47-53, 2003.

5 METABISSULFITO DE POTÁSSIO COMO UM BIOCIDA EM POTENCIAL CONTRA *Dekkera bruxellensis* EM FERMENTAÇÕES ETANÓLICAS

Resumo

Dekkera bruxellensis é uma levedura importante como contaminante de fermentações para produção de álcool combustível no Brasil, cujo sistema utilizado se baseia na recirculação do fermento. Este trabalho avaliou a adição de metabissulfito de potássio (MBP) no crescimento e fermentação de culturas puras e co-culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *D. bruxellensis* em duas situações: adição na solução ácida no tratamento celular entre os ciclos fermentativos e no meio de fermentação. No intervalo entre 200-400 mg/L, o MBP foi eficaz para controlar o crescimento de *D. bruxellensis* dependendo do meio de cultura. Quando adicionado à solução ácida (250 mg/L), um efeito significativo foi observado nas culturas mistas, pois ocorreu a inativação do SO₂ pela *S. cerevisiae* e uma provável proteção das células de *D. bruxellensis*, não sendo essa levedura prejudicada pelo MBP. A resposta fisiológica de *S. cerevisiae* na presença de MBP pode explicar a diminuição significativa na produção de etanol. Quando o MBP foi adicionado ao meio de fermentação, resultou no controle da *D. bruxellensis* mas não em sua morte, com efeito menos intensivo sobre a eficiência fermentativa. Em co-cultura com a adição de MBP, a eficiência fermentativa foi significativamente menor do que na ausência de MBP.

Palavras-chave: Biocida; Etanol; Fermentação; Sulfito; Leveduras contaminantes

Abstract

Dekkera bruxellensis is an important contaminant yeast of fuel ethanol fermentations in Brazil, whose system applies cell repitching between the fermentative cycles. This work evaluated the addition of potassium metabisulphite (PMB) on yeast growth and fermentative yields in pure and cocultures of *Saccharomyces cerevisiae* and *D. bruxellensis* in two situations: addition to the acidic solution in which the cells are treated between the fermentative cycles or to the fermentation medium. In the range of 200– 400 mg/L, PMB was effective to control the growth of *D. bruxellensis* depending on the culture medium and strain. When added to the acidic solution (250 mg/L), a significant effect was observed in mixed cultures, because the inactivation of SO₂ by *S. cerevisiae* most likely protected *D. bruxellensis* from being damaged by PMB. The physiological response of *S. cerevisiae* to the presence of PMB may explain the significant decrease in alcohol production. When added to the fermentation medium, PMB resulted in the control but not the death of *D. bruxellensis*, with less intensive effect on the fermentative efficiency. In co-culture with the addition of PMB, the fermentative efficiency was significantly lower than in the absence of PMB.

Keywords: Biocide; Ethanol; Fermentation; Sulphite; Yeast contaminants

5.1 Introdução

A levedura *Dekkera bruxellensis* é um dos principais contaminantes na indústria do vinho, possuindo algumas particularidades como crescimento lento, alta eficiência energética, crescimento em baixa concentração de açúcar e oxigênio, o que proporciona seu desenvolvimento após o engarrafamento do vinho, causando a depreciação do mesmo pela produção de etilfenóis.

O tratamento com sulfito é a maneira mais comum de prevenir a deterioração do mosto de uva na vinificação, pois a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é particularmente resistente a esta substância. O metabissulfito de potássio (MBP) é um aditivo utilizado na indústria de alimentos, sendo que em soluções aquosas, ocorre um equilíbrio complexo de acordo com a sua concentração, pH e temperatura.

É grande a interação entre o MBP e o meio em que está diluído, podendo sofrer interferência do pH, álcool e concentração de açúcar. Essa substância pode ser encontrada em três formas diferentes, com diferentes modos de ação, dificultando assim o estudo das interações possíveis durante a fermentação alcoólica, em decorrência do tipo de substrato utilizado.

Devido ao papel da *D. bruxellensis* na fermentação industrial de álcool combustível no Brasil e ao fato de que o SO₂ ainda não foi utilizado como um agente antimicrobiano para esta fermentação em particular, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de SO₂, sob a forma de MBP, tanto sobre o crescimento como em condições de fermentação de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em culturas puras e em co-culturas. A adição de MBP foi avaliada em duas etapas diferentes durante o processo: foi adicionado à solução de ácido utilizada para tratar as células entre os ciclos fermentativos industriais, e diretamente no meio de fermentação composto por caldo de cana em fermentações com reciclo celular.

Este estudo é o primeiro a avaliar a ação de metabissulfito de potássio no controle do crescimento de *D. bruxellensis* no processo de fermentação para a produção de álcool combustível, visto que até o momento foi estudado somente na produção de vinho de uva. A viabilidade do emprego dessa substância para essa fermentação específica foi discutida em vista das possíveis interações biológicas e químicas com o substrato e os micro-organismos.

Esse presente capítulo é a versão em português do artigo “Potassium metabisulphite as a potential biocide against *Dekkera bruxellensis* in fuel ethanol fermentations”, publicado no periódico *Letters in Applied Microbiology*, v.60, p.248-258, 2015, dos autores Ana Paula Guarnieri Bassi, Anna Livia Paraluppi, Vanda Renata Reis e Sandra Regina Ceccato-Antonini.

5.2 Revisão Bibliográfica

Dekkera bruxellensis é uma levedura de múltiplas ‘faces’ para a indústria da fermentação. Devido ao seu metabolismo energético mais eficiente em comparação com *S. cerevisiae*, a capacidade de usar nitrato como única fonte de nitrogênio, capacidade de produção de etanol sob condições aeróbias e de crescimento sem a presença de oxigênio, alta tolerância ao etanol e ácidos e a capacidade de utilizar uma vasta gama de fontes de carbono, ela é considerada uma levedura relevante na indústria do etanol (PASSOTH; BLOMQVIST; SCHNURER, 2007; GALAFASSI et al., 2011, 2013; BLOMQVIST et al., 2012; SOUZA et al., 2012). No entanto, essa levedura está envolvida na produção de fenóis voláteis em vinhos, com a formação de odores desagradáveis que causam importantes perdas econômicas na indústria do vinho (OELOFSE; PRETORIUS; du TOIT, 2008). *D. bruxellensis* também tem sido relatada como um contaminante em unidades de produção de etanol devido à sua capacidade de competição com a levedura industrial *S. cerevisiae* (SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Apresenta uma baixa taxa de produção de etanol e crescimento expressivo em condições de limitação de oxigênio, deixando quantidade significativa de açúcar residual ao final do período de fermentação. O esgotamento de açúcares redutores prolonga o tempo de fermentação a um nível impraticável (MENEHIN et al., 2013).

O efeito do dióxido de enxofre (SO₂) em *D. bruxellensis* tem sido extensivamente estudado na indústria vinícola (BARATA et al., 2008; MENDOZA; FARIAS, 2010; DIVOL; du TOIT; DUCKITT, 2012) para se conseguir vinhos de alta qualidade. Apesar da controvérsia sobre a dose necessária para causar a inativação das células, resultados demonstraram que o controle do crescimento de populações de *D. bruxellensis* no vinho tinto só pode ser alcançado na presença de doses

relativamente elevadas de SO₂ molecular (BARATA et al., 2008). Além disso, a química do SO₂ no vinho é bastante complexa devido à sua dissociação em diferentes espécies, tais como o bissulfito e sulfito, dependendo do pH e da ligação aos compostos presentes no meio de fermentação, tais como açúcares, pigmentos e outros subprodutos da fermentação (DIVOL; du TOIT; DUCKITT, 2012). O SO₂ pode ser adicionado direto ou indiretamente por meio de sais de sulfito, tais como sulfito de sódio, bissulfito de sódio, bissulfito de potássio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio (FAVERO; RIBEIRO; AQUINO, 2011). O metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅), aqui designado como "MBP", rende 57,6% de SO₂ em solução aquosa (ROTTER, 2011). O SO₂ inibe o crescimento microbiano pela interferência com metabólitos da glicólise e se ligando à glicose, fosfato di-hidroxiacetona, piruvato, acetaldeído, ácido oxaloacético e ácido alfa-cetoglutárico, impedindo-os de serem utilizados como substratos para vias metabólicas (DIVOL; du TOIT; DUCKITT, 2012). A tolerância ao SO₂ varia com a espécie e também entre as linhagens de leveduras. *Saccharomyces cerevisiae* é geralmente considerada como tolerante ao SO₂ (DIVOL; MIOT-SERTIER; LONVAUD-FUNEL, 2006; NARDI et al., 2010).

5.3 Material e Métodos

5.3.1 Micro-organismos

Três linhagens de *D. bruxellensis* (CCA059, CCA077 e CCA155) isoladas do processo de fermentação para a produção de álcool foram utilizadas nos experimentos, após identificação por seqüenciamento do domínio D1/D2 do *locus* 26S e da região ITS do DNA ribossomal. Foi também utilizada uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* (PE-2) nos experimentos (BASSO et al., 2008). As linhagens foram mantidas em YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L de ágar e água destilada; para meio líquido não foi adicionado ágar) a 4 °C com repiques constantes para meio de cultura novo.

5.3.2 Tolerância ao MBP em condições de crescimento com diferentes meios de cultura

Inicialmente, os testes foram realizados em tubos Falcon de 50 mL com 15 mL de YPD líquido (volume final), em duplicata, com pH inicial de 4,5. Uma alíquota de 1 mL de uma suspensão concentrada de células foi adicionada a cada tubo para uma densidade óptica final (a 600 nm) de 0,2-0,3. Soluções de MBP (*Synth*) foram preparadas em água destilada estéril, e alíquotas de 1 ml foram adicionadas ao meio para uma concentração final de 0, 100, 200 e 400 mg/L. Os tubos foram incubados a 30°C, a 160 rpm, durante 72 h. As amostras foram retiradas a cada 24h para avaliar a densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro Bio-Mate® (Thermo Electron Corporation, Madison, WI, EUA). Os mesmos procedimentos foram realizados com melaço diluído e caldo de cana no lugar do meio YPD, com um pH inicial de 4,5 e uma concentração total de açúcar total de 4 g/100 mL.

Para determinar a concentração inibitória mínima do MBP para a linhagem CCA155 de *D. bruxellensis*, foi utilizado caldo de cana diluído (como descrito acima) em Erlenmeyer contendo 25 mL de meio. Foram testadas concentrações de 0, 200, 250, 300, 350 e 400 mg/L de MBP. O crescimento foi avaliado por densidade óptica a 600 nm, conforme descrito acima.

5.3.3 Efeito da adição de MBP no tratamento ácido durante a fermentação

Este experimento foi realizado em cultura pura e co-cultura, com as leveduras *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* (CCA155). As células foram cultivadas em caldo de cana (4 g/100 mL de açúcares totais, pH 5,5) até uma concentração final de células de 5×10^9 células/mL. Foram realizadas transferências diárias para um novo meio a fim de alcançar a concentração de células desejada. Alíquotas de 10 mL da suspensão concentrada (previamente centrifugadas e ressuspensas em água destilada estéril) foram adicionadas a uma solução ácida estéril, preparada com ácido sulfúrico e água, até pH final de 2,0, e adicionado o MBP para atingir uma concentração de 250 mg/L em frascos Erlenmeyer de 250 ml ambas as culturas puras de leveduras. Co-culturas foram preparadas com a adição de 5 mL da

suspensão concentrada de cada linhagem de levedura na solução ácida. Os frascos foram mantidos durante 90 minutos a 30°C sob 150 rpm. O conteúdo foi centrifugado, o sobrenadante foi descartado, e as células lavadas com água destilada estéril. As células foram em seguida ressuspensas em meio de fermentação (100 mL de caldo de cana com 16 g/100 mL de açúcares totais, pH 5,5), e os frascos de Erlenmeyer de 250 mL foram incubados a 30°C durante 12 h sem agitação.

Foram retiradas amostras imediatamente após as células serem adicionadas à solução ácida, após o tratamento das células na solução ácida com e sem MBP e após 12h de fermentação. Alíquotas (1 mL) foram diluídas em série em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueadas em meio YPD com e sem actidione (50 mg/L) para crescimento das leveduras *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*, respectivamente. As placas foram incubadas a 30°C durante 5 dias e as colônias foram então contadas. O restante da amostra foi centrifugado, e o sobrenadante foi avaliado quanto ao teor alcoólico (destilação da amostra e determinação da densidade da solução hidroalcoólica utilizando densímetro *Anton Paar®* digital).

5.3.4 Efeito da adição do MPB ao meio de fermentação

Este experimento foi realizado com culturas puras e co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* (CCA155). As células foram preparadas como descrito acima. Alíquotas de 20 mL da suspensão concentrada (previamente centrifugada e ressuspensa em meio de fermentação como descrito acima) foram inoculadas em um volume final de 100 mL, em duplicata, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo o meio de fermentação. MBP foi adicionado a uma concentração final de 250 mg/L no meio de fermentação quando necessário. Os frascos foram incubados durante 12 horas a 30°C sem agitação.

Concentrações iguais de células de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* (fermentações em co-culturas) foram adicionadas aos frascos de fermentação, como descrito anteriormente. O meio de fermentação foi amostrado para estimar a quantidade inicial de células de *S. cerevisiae* e de *D. bruxellensis* (como descrito acima) e, subsequentemente, as amostras foram centrifugadas para separar o

sobrenadante da massa de células de levedura, a qual foi inoculada em novos meios de fermentação com MBP, quando necessário. Foram realizados seis ciclos de 12 h de fermentação. No sobrenadante, o teor alcoólico (g/100 ml) foi avaliado na solução hidroalcoólica utilizando densitômetro *Anton Paar®*, após destilação das amostras, e a quantidade de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico após hidrólise das amostras (MILLER, 1959). A eficiência fermentativa (%) foi calculada com base no rendimento em álcool (g de álcool produzido /g açúcar consumido) dividido por 0,51 (valor teórico) e multiplicado por 100.

5.3.5 Análise estatística

As contagens de leveduras (UFC/mL) foram transformadas em $\log_{10}$. Os experimentos foram replicados pelo menos duas vezes utilizando duas repetições por tratamento. Os valores médios e desvios-padrão foram determinados através do programa Microsoft Excel (Microsoft Windows XP). Todas as análises estatísticas (ANOVA e teste de Tukey) foram realizadas utilizando o software *Statistica®* versão 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA), e os dados foram considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

5.4 Resultados e Discussão

O efeito do MBP em concentrações variando de 100 a 400 mg/L sobre o crescimento de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* em diferentes meios de cultura está representado nas Figuras 1 a 3.

Figura 1 – Crescimento de *S. cerevisiae* (PE-2) e *D. bruxellensis* (linhagens CCA059, 077 e 155) em meio YPD, pH 4,5, com metabissulfito de potássio adicionado em concentrações de 0 (♦), 100 (■), 200 (▲) e 400 (●) mg/L

Figura 2 – Crescimento de *S. cerevisiae* (PE-2) e *D. bruxellensis* (linhagens CCA059, 077 e 155), em meio de caldo de cana, 4 g/L de açúcares, pH 4,5, com metabissulfito de potássio adicionado em concentrações de 0 (♦), 100 (■), 200 (▲) e 400 (●) mg/L

Figura 3 – Crescimento de *S. cerevisiae* (PE-2) e *D. bruxellensis* (linhagens CCA059, 077 e 155), em meio melaço, 4 g/L açúcares, pH 4,5, com metabissulfito de potássio adicionado em concentrações de 0 (♦), 100 (■), 200 (▲) e 400 (●) mg/L

Em YPD e meio de caldo de cana, o crescimento da *S. cerevisiae* não foi afetado em qualquer concentração de MBP, mas para *D. bruxellensis* foi observado um crescimento mais lento com 100 e 200 mg/L de MBP e quase inibição completa com 400 mg/L, mas havendo uma inibição menor para a linhagem CCA155. No meio de melaço, houve um crescimento mais lento em qualquer concentração de MBP para todas as leveduras, mas a concentração de 400 mg/L não foi inibitória para *D. bruxellensis*. A análise comparativa das concentrações de MBP em 72h de cultivo em meios diferentes é apresentada na Figura 4. Além dos açúcares, o melaço também apresenta compostos corantes, tais como taninos, que podem se ligar ao sulfito e inativá-lo, resultando em substâncias como hidroxissulfonatos, com baixa atividade antimicrobiana (ROTTER, 2011). Essa pode ser a razão pela qual o MBP foi menos inibitório para as leveduras em melaço do que em caldo de cana ou YPD.

Figura 4 – Crescimento de *S. cerevisiae* (A) e linhagens de *D. bruxellensis* (em B-D para as cepas CCA059, 077 e 155, respectivamente) em YPD (■), meio caldo de cana (▲) e melaço (◆), pH 4,5, com metabissulfito de potássio (MBP) adicionado em concentrações de 0, 100, 200 e 400 mg/L. Em (E), a concentração inibitória mínima de MBP para *D. bruxellensis* CCA155 em meio de caldo de cana. As culturas foram mantidas a 30°C, sob 160 rpm, durante 72 h. A variação da DO (densidade óptica a 600 nm) foi calculada pela diferença nos valores obtidos ao final de 72 e 0h para cada concentração de MBP. Letras diferentes sobre as barras em (E) indicam diferenças significativas ($P < 0,05$)

As linhagens de *D. bruxellensis* foram afetadas de forma diferente pelo MBP, como já verificado por Barata et al. (2008) e Curtin, Kennedy e Henschke (2012). Há controvérsia sobre o nível de SO_2 necessário para provocar a inativação ou morte das células de *D. bruxellensis*. O crescimento desta levedura foi inibido pela manutenção de 25-35 mg/L de SO_2 livre (concentração de 45-60 mg/L de MBP) em vinhos (du TOIT et al., 2005), 30 mg/L em pH 3,4-3,5 (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006) ou 50 mg/L para leveduras não *Saccharomyces* em geral (MENDOZA; FARIAS, 2010). A levedura mais tolerante foi *S. cerevisiae*, crescendo na presença de 200 mg/L de MBP, enquanto *D. bruxellensis* cresceu na faixa de 60-90 mg/L em meio de cultura sintético com um pH inicial de 3,5 (BARATA et al., 2008). Para os experimentos posteriores que simulam a fermentação industrial, a linhagem CCA155 de *D. bruxellensis* foi escolhida por sua maior resistência ao MBP em meio de caldo de cana e YPD. A concentração inibitória mínima de MBP para essa linhagem foi determinada, e com uma concentração de 250 mg/L de MBP, o seu crescimento foi bastante reduzido, sem diferença significativa em relação às maiores concentrações testadas (Figura 4E).

Os testes para avaliar os efeitos do MBP sobre a fermentação foram realizados adicionando a substância ao tratamento ácido, etapa industrialmente utilizada para minimizar a contaminação bacteriana (AMORIM et al., 2011). Nesta situação, um efeito significativo ($P < 0,05$) foi observado para *S. cerevisiae* após o tratamento, no entanto, o número de UFC foi restabelecido após 12 h de fermentação, o que não ocorreu com *D. bruxellensis*. Mesmo com a recuperação da população de células, houve um efeito significativo ($P < 0,05$) do MBP sobre a produção de álcool por *S. cerevisiae* (Figura 5A e 5B).

Dois pontos devem ser explorados para explicar os resultados acima. Quando o MBP é adicionado a uma solução aquosa, ele dissocia-se em três espécies moleculares: SO_2 molecular, o antimicrobiano na forma mais ativa; bissulfito (HSO_3^-); e sulfito (SO_3^{2-}). O equilíbrio químico entre as três espécies é dependente do pH. O SO_2 molecular é predominante entre pH 0 a 2, bissulfito em pH 2 a 7, e sulfito a partir de pH 7 a 10 (DIVOL; du TOIT; DUCKITT, 2012). Na solução ácida (pH 2,0) em que as células de levedura foram tratadas durante 90 min a 30°C, havia provavelmente cerca de 40% de SO_2 , o que corresponde a uma concentração de 58 mg/L de SO_2 . Em pH 4,5, que foi o valor do pH no meio de crescimento, nenhum SO_2 estava disponível, com predominância de bissulfito. O segundo ponto diz

respeito ao mecanismo pelo qual o SO_2 inibe o crescimento. O SO_2 é uma molécula altamente reativa, que pode ligar-se a diversos metabólitos celulares e enzimas, tais como o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima crítica na via glicolítica, que pode perder toda a atividade após a incubação de *S. cerevisiae* com 2 mmol/L de sulfito por 45 minutos (HINZE; HOLZER, 1986; CASALONE et al., 1992). Os baixos níveis de sulfito inibiram a ação da álcool desidrogenase, que afeta a conversão do acetaldeído em etanol (MAIER; HINZE; LEUSCHEL, 1986). Além disso, o acetaldeído tem uma forte afinidade com o SO_2 não ligado, reduzindo a eficácia do sulfito contra bactérias e leveduras (DIVOL; du TOIT; DUCKITT, 2012). Estes eventos certamente prejudicariam a fermentação pelas leveduras.

Além disso, a combinação de acetaldeído com o íon bissulfito também pode resultar em super produção de glicerol por *S. cerevisiae* (WANG et al., 2001). O desvio da rota para produção de glicerol pode afetar a produção de etanol.

A capacidade de sintetizar acetaldeído pode explicar a tolerância ao dióxido de enxofre em *S. cerevisiae*. A concentração de acetaldeído aumentou rapidamente em *S. cerevisiae* após a adição de 10 e 50 mg/L de dióxido de enxofre (DIVOL; MIOT-SERTIER; LONVAUD-FUNEL, 2006). O acetaldeído ligado ao SO_2 resulta em hidroxissulfonato, que não é ativo contra os micro-organismos (ROTTER, 2011). Se esse investimento em produção de acetaldeído ocorre às custas da energia dedicada à fermentação ou crescimento ainda não está claramente entendido. Em condições não proliferativas, quando o MBP foi adicionado à solução ácida, as células de *S. cerevisiae* podem ter produzido acetaldeído para inativar o SO_2 , o qual ocorreu a uma elevada concentração; assim, a produção de álcool foi substancialmente prejudicada. Isto explica o resultado obtido em co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*. Nesta situação, a levedura *D. bruxellensis* não foi afetada pela adição de MBP provavelmente porque ocorreu a inativação do SO_2 por *S. cerevisiae*, sendo assim houve uma “proteção” das células de *Dekkera* aos danos causados pelo MBP. O efeito na produção de álcool também foi significativo ($P < 0,05$), indicando que o maior efeito do MBP foi sobre a *S. cerevisiae* e não sobre *D. bruxellensis* (Figura 5C).

Figura 5 – Número de leveduras (UFC/mL) e produção de álcool (g/100mL) em culturas puras de *S. cerevisiae* (A), *D. bruxellensis* (B) e co-cultura (C) inoculadas em meio caldo de cana, 16 g/100 mL de açúcares redutores, pH 4,5, a 30°C, durante 12 h. O metabissulfito de potássio (MBP, 250 mg/L) foi adicionado à solução ácida (pH 2,0) na qual as células foram tratadas antes da inoculação em meio de fermentação, a 30°C, durante 90 min, sob 160 rpm. As amostras foram retiradas antes do tratamento ácido (■), após o tratamento ácido (▒) e após 12 h de fermentação (□). Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Para contagens de UFC, os valores médios foram comparados estatisticamente entre os tratamentos e não entre as leveduras

Em resumo, a adição de MBP à solução ácida em que as células de levedura são comumente tratadas na indústria de fermentação, sobrecarregou especificamente a *S. cerevisiae*, prejudicando a produção de álcool e não afetando a levedura contaminante *D. bruxellensis*, apesar da sensibilidade exibida por este último ao sulfito em culturas puras em ambas as condições de cultivo e fermentação. Comparando-se aos experimentos realizados por Bassi et al. (2013), no qual ocorreu a diminuição de 14% na produção de álcool e de 10 vezes no número de *D. bruxellensis* quando 13% de etanol foi adicionado à solução ácida, com o presente estudo realizado nas mesmas condições, pode-se dizer que é melhor adicionar etanol à solução ácida do que MBP.

Qual seria o efeito na produção de álcool se o MBP fosse adicionado diretamente ao meio de fermentação? Fermentações com reciclo de células foram realizadas em co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* com e sem MBP e em comparação com culturas puras de *S. cerevisiae* sem a adição de MBP para avaliar se o MBP é mais prejudicial para a fermentação do que a contaminação por *D. bruxellensis* (Figuras 6, 7 e 8). Sem a adição de MBP, a população de *D. bruxellensis* aumentou significativamente 100 vezes nos dois últimos ciclos de 12 h de fermentação (Figura 6A), mantendo-se constante quando o MBP foi adicionado na concentração de 250 mg/L (Figura 7A). A população de *S. cerevisiae* apresentou pequenas flutuações durante os ciclos de fermentação, independentemente do MBP, com um significativo aumento do número de células no último ciclo com MBP (Figura 7A). Este é um ponto interessante que foi conseguido quando adicionado MBP em cada ciclo de fermentação: o crescimento de *D. bruxellensis* foi controlado, mas a morte celular não ocorreu. O bissulfito, que é a espécie molecular predominante no meio com pH de 4,5, é considerado fungistático (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Contudo, os efeitos sobre a fisiologia da *S. cerevisiae* persistiram, pois a eficiência fermentativa foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando o MBP foi adicionado. A contaminação por *D. bruxellensis* causou também uma diminuição significativa na eficiência fermentativa em comparação com a fermentação sem contaminação, mas o uso de uma concentração de 250 mg/L de MBP em cada ciclo fermentativo diminuiu o rendimento de álcool ainda mais (Figura 8D).

No entanto, o efeito do MBP sobre a produção de álcool foi inferior quando adicionado ao meio de fermentação ao invés da solução ácida. Espécies

moleculares diferentes estavam presentes em cada situação, sendo o SO₂ molecular muito mais reativo do que o bissulfito (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006).

A

B

C

Figura 6 – Número de leveduras (UFC/mL, em A), açúcares redutores totais residuais (g/100 mL, em B) e produção de álcool (g/100 mL, em C) em co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* inoculadas em meio de caldo de cana, 16 g/100 ml de açúcares redutores, pH 4,5, a 30°C, durante seis ciclos com duração de 12 h de fermentação cada. Metabissulfito de potássio **não** foi adicionado ao meio de fermentação. As células foram recicladas ao final de cada fermentação, após a centrifugação do meio fermentado. 'Início' significa o número de leveduras inoculadas no começo do processo de fermentação. O número de leveduras foi quantificado após 12 h de fermentação em cada ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas (P<0,05). Para contagens de UFC, os valores médios foram comparados estatisticamente entre os ciclos e não entre as leveduras

A **B** **C**

Figura 7 – Número de leveduras (UFC/mL, em A), açúcares redutores totais residuais (g/100 mL, em B) e produção de álcool (g/100 mL, em C) em co-cultura de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* inoculadas em meio caldo de cana, 16 g/100 mL de açúcares redutores, pH 4,5, a 30°C, durante seis ciclos com duração de 12 h de fermentação cada. Metabissulfito de potássio (MBP, 250 mg/L) foi adicionado ao meio de fermentação no início de cada ciclo. As células foram recicladas ao final de cada fermentação, após a centrifugação do meio fermentado. 'Início' significa o número de leveduras inoculadas no começo do processo de fermentação. O número de leveduras foi quantificado após 12 h de fermentação em cada ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Para contagens de UFC, os valores médios foram comparados estatisticamente entre os ciclos e não entre as leveduras

A

B

C

D

Figura 8 – Número de leveduras (UFC/mL, em A), açúcares redutores totais residuais (g/100 mL, em B) e produção de álcool (g/100 mL, em C) e eficiência fermentativa (% , em D) dos experimentos fermentativos com cultura pura de *S. cerevisiae* inoculadas em meio caldo de cana, 16 g/100 mL de açúcares redutores, pH 4,5, a 30°C, durante seis ciclos com duração de 12h de fermentação cada. Metabissulfito de potássio (MBP) **não** foi adicionado ao meio de fermentação. As células foram recicladas ao final de cada fermentação, após a centrifugação do meio fermentado. 'Início' significa o número de leveduras inoculadas no começo do processo de fermentação. O número de leveduras foi quantificado após 12h de fermentação em cada ciclo fermentativo. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças significativas ($P < 0,05$). Para contagens de UFC, os valores médios foram comparados estatisticamente entre os ciclos e não entre as leveduras

Os experimentos foram realizados com seis ciclos de fermentação, mas qual seria a extensão do crescimento de *D. bruxellensis* por um longo período de tempo sem qualquer tipo de controle é uma questão a ser considerada. Seria melhor controlar o crescimento de *D. bruxellensis* utilizando o MBP mesmo às custas de uma produção de álcool inferior? Um tratamento celular à base de etanol, como proposto por Bassi et al. (2013), apesar de retardar a fermentação, propiciou o controle e a diminuição da população de *D. bruxellensis* enquanto a levedura *S. cerevisiae* tomava conta da fermentação durante o ciclos fermentativos. Ambos os experimentos, MBP adicionado ao meio de fermentação em cada ciclo (este estudo) e etanol (13%) adicionado à solução ácida, ajudaram a controlar o crescimento de *D. bruxellensis*, mas com um rendimento menor em álcool. Em ambos os experimentos, *D. bruxellensis* foi inoculada no sistema de fermentação em elevada concentração celular (cerca de 10^9 UFC/mL).

A capacidade de crescimento da população de *D. bruxellensis* em fermentações com reciclo foi demonstrada por Meneghin et al. (2013), que mostraram que uma contaminação inicial de 10^3 células/mL pode tornar a produção de álcool mais lenta e resultar em um aumento celular de 3 ciclos log ao final de 14 ciclos fermentativos com duração de 12 h cada. Estes resultados demonstraram que se algumas células entrarem no tanque de fermentação, elas serão recicladas em conjunto com a *S. cerevisiae* e podem alcançar elevado número após algum tempo. Os autores concluíram que esta peculiaridade do sistema fermentativo brasileiro – reciclo celular – favorece o desenvolvimento e o estabelecimento de *D. bruxellensis* no processo.

O uso de MBP na indústria da fermentação para controlar o crescimento de *D. bruxellensis* requer mais investigação, incluindo também uma análise econômica. O papel do acetaldeído como mecanismo de defesa contra o SO_2 e a interação entre etanol e outros componentes do meio açucarado são questões também a serem avaliadas.

5.5 Conclusões

Na concentração de 200-400 mg/L, o MBP foi eficaz para controlar o crescimento de *D. bruxellensis* dependendo do meio de cultura testado. Quando

adicionado à solução ácida (250 mg/L) em que as células de leveduras são tratadas entre os ciclos fermentativos, foi observado um efeito significativo nas culturas mistas, pois ocorreu a inativação do SO₂ pela *S. cerevisiae* e uma provável proteção às células de *D. bruxellensis*. A resposta fisiológica de *S. cerevisiae* na presença de MBP pode explicar a diminuição significativa na produção de álcool. Quando o MBP foi adicionado ao meio de fermentação em sistema de batelada com reciclo celular, resultou no controle do crescimento de *D. bruxellensis*, mas não em sua morte, com efeito menos intensivo sobre a eficiência fermentativa. Em co-cultura com a adição de MBP, a eficiência fermentativa foi significativamente menor do que na ausência do MBP.

Referências

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 91, p. 1267–1275, 2011.

BARATA, A.; CALDEIRA, J.; BOTELHO, R.; PAGLIARA, D.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 121, p. 201–207, 2008.

BASSI, A.P.G.; SILVA, J.G.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Single and combined effects of low pH and high concentrations of ethanol on the growth of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae* strains from the fermentation for fuel alcohol production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Hull, v. 29, n. 9, p. 1661-1676, 2013.

BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, Gothenburg, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BLOMQUIST, J.; NOGUÉ, V.N.; GORWA-GRAUSLUND, M.; PASSOTH, V. Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen limited or anaerobic conditions. **Yeast**, Oxford, v. 29, p. 265–274, 2012.

CASALONE, E.; COLELLA, C.M.; DALY, S.; GALLORI, E.; MORIANI, L.; POLSINELLI, M. Mechanism of resistance to sulfite in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, New York, v. 22, p. 435–440, 1992.

CURTIN, C.; KENNEDY, E.; HENSCHKE, P.A. Genotype dependent sulfite tolerance of Australian *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis* wine isolates. **Letter in Applied Microbiology**, Oxford, v. 55, p. 56–61, 2012.

DIVOL, B.; Du TOIT, M.; DUCKITT, E. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 95, p. 601–613, 2012.

DIVOL, B.; MIOT-SERTIER, C.; LONVAUD-FUNEL, A. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in *Botrytis* affected wines. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, p. 516–526, 2006.

FAVERO, D.M.; RIBEIRO, C.S.G.; AQUINO, A.D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutrição**, Campinas, v. 18, p. 11–20, 2011.

GALAFASSI, S.; MERICO, A.; PIZZA, F.; HELLBORG, L.; MOLINARI, F.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low pH conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, p. 1079–1088, 2011.

GALAFASSI, S.; CAPUSONI, C.; MOKTADUZZANMAN, M.; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 40, p. 297–303. 2013.

HINZE, H.; HOLZER, H. Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulphite or nitrite. **Archives of Microbiology**, Braunschweig, v. 145, p. 27–31, 1986.

MAIER, K.; HINZE, H.; LEUSCHEL, L. Mechanism of sulphite action on the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry Biophysica Acta Bioenergetics**, Cambridge, v. 848, p. 120–130, 1986.

MENDOZA, L.; FARIAS, M.E. Improvement of wine organoleptic characteristics by non-*Saccharomyces* yeasts. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology**. Badajoz: Formatex, 2010. p. 908-919.

MENEGHIN, M.C.; BASSI, A.P.G.; CODATO, C.B.; REIS, V.R.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Fermentative and growth performances of in different batch systems and the effect of initial low cell counts of *Dekkera bruxellensis* in cocultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Oxford, v. 30, p. 295-305, 2013.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426, 1959.

NARDI, T.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; BLONDIN, B. A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene SSU1 in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **Microbiology**, Washington, v. 156, p. 1686-1696, 2010.

OELOFSE, A.; PRETORIUS, I.S.; Du TOIT, M. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review, **South African Journal for Enology and Viticulture**, Dennesig, v. 29, n. 2, p.1-17, 2008.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, Bayreuth, v. 73, n. 13, p. 4354-4356, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. Chichester: Wiley, 2006. 479 p.

ROTTER, B. Sulphur dioxide. In: IMPROVED winemaking: advanced theory, practical solutions and opinion. Disponível em: <<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm>>. Acesso em: 23 maio 2014.

SOUZA, R.B.; SANTOS, B.M.; SOUZA, R.F.R.; SILVA, P.K.N.; LUCENA, B.T.L.; MORAIS Jr., M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 39, p. 1645-1650, 2012.

SOUZA-LIBERAL, A.T.S.; BASÍLICO, A.C.M.; do MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B.T.V.; da SILVA FILHO, E.A.; de MORAIS, J.O.F.; SIMÕES, D.A.; de MORAIS Jr, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 102, p. 538-547, 2007.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos na presente tese permitem concluir que o tipo de substrato de fermentação, caldo de cana ou melaço, afeta o desenvolvimento das contaminações por *D. bruxellensis* na presença ou ausência da bactéria *L. fermentum*. Em caldo, a levedura industrial PE-2 não foi afetada pela presença dos micro-organismos contaminantes, no entanto, *D. bruxellensis* teve aumento no número de UFC na presença de *L. fermentum*, seja em condições de crescimento quanto na fermentação. O padrão de crescimento das duas leveduras não diferiu nos dois substratos, no entanto, com *L. fermentum*, houve estímulo ao crescimento na presença da levedura industrial. A contaminação com *D. bruxellensis* reduziu a eficiência fermentativa em ambos os substratos, mas com a bactéria *L. fermentum*, a queda na eficiência fermentativa somente é significativa em caldo, mas não é em melaço. Nas fermentações com dupla contaminação (*D. bruxellensis* e *L. fermentum*) houve uma grande queda do rendimento fermentativo, independentemente do tipo de substrato, sendo significativamente diferente dos resultados obtidos nas fermentações contaminadas com um ou outro micro-organismo e na não contaminada. Pode-se concluir quanto ao substrato que a utilização de caldo ou melaço pode influenciar o efeito que as contaminações causam ao processo fermentativo, em se tratando de *D. bruxellensis* e *L. fermentum*.

O controle do crescimento dos contaminantes pode ser realizado tanto com a utilização de metabissulfito de potássio quanto com a adição de etanol ao tratamento ácido. A bactéria *L. fermentum* foi totalmente controlada com o tratamento etanol-ácido. Com *D. bruxellensis*, ocorreu redução de 90 a 99% no número de UFC, dependendo da linhagem utilizada, com prejuízo mínimo à viabilidade da linhagem industrial. Nesse sentido, com esses resultados, espera-se que esse tratamento celular (solução ácida pH 2,0 + 13% etanol) pode ser viável se empregado especialmente em situação de dupla contaminação, evitando assim o efeito positivo ao crescimento de *D. bruxellensis* pela presença de *L. fermentum*, o que ocasionaria sérios prejuízos à fermentação.

Quanto ao metabissulfito de potássio, a adição de 250 mg/L ao tratamento ácido teve efeito muito expressivo sobre a fisiologia da levedura industrial, prejudicando a produção de etanol. O metabissulfito pode reagir com substâncias do meio levando à inativação do produto, e em co-culturas de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis*, a

levedura contaminante acaba se beneficiando do mecanismo de defesa que a linhagem industrial possui, que é de inativação do metabissulfito com acetaldeído, o que acaba trazendo prejuízo ao rendimento etanólico. Quando adicionado ao meio de fermentação, no início de cada ciclo fermentativo, o efeito sobre a fermentação é menor, causando controle no crescimento da linhagem contaminante.

Concluiu-se portanto, que a utilização de caldo de cana ou melaço como substrato da fermentação poderá afetar o desenvolvimento das contaminações por *D. bruxellensis* e *L. fermentum*, e que a dupla contaminação é de tal forma prejudicial ao processo fermentativo que ações no sentido de controle de crescimento de ambos os micro-organismos devem ser estimuladas. Propõe-se a modificação do tratamento ácido com adição de 13% de etanol para reduzir o crescimento de *D. bruxellensis* e matar as células de *L. fermentum*. O metabissulfito de potássio pode também ser uma alternativa para o controle do crescimento de *D. bruxellensis*, quando adicionado ao meio de fermentação, com pequeno prejuízo ao rendimento fermentativo. O efeito desse produto sobre *L. fermentum* deve também ser investigado. A adoção de estratégias de controle do crescimento dos contaminantes deve ser avaliada à luz dos custos para sua adoção em relação às perdas na produção se as contaminações não foram controladas.