

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA ADAPTAÇÃO DE *LACTOBACILLUS VINI* À  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL**

ANDRÉ RIBAS DE MIRANDA

RECIFE  
2015

ANDRÉ RIBAS DE MIRANDA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DA ADAPTAÇÃO DE *LACTOBACILLUS VINI* À  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA INDUSTRIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Antônio de Morais Júnior

RECIFE  
2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

**Miranda, André Ribas de**

**Aspectos fisiológicos da adaptação de *Lactobacillus vini* à fermentação alcoólica industrial/ André Ribas de Miranda– Recife: O Autor, 2015.**

**91 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Marco Antonio de Moraes Júnior**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2015.**

*Inclui bibliografia*

- 1. Fermentação 2. Lactobacillus 3. Álcool I. Moraes Júnior, Marco Antonio de (orientador) II. Título**

**547.29**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2015-112**

**Aspectos fisiológicos da adaptação de *Lactobacillus vini* a fermentação alcoólica industrial**

André Ribas de Miranda

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Aprovado em:** 06/03/2015

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Depto. de Genética / UFPE)

---

Prof. Dr. Diogo Ardaillon Simões ( Depto. de Bioquímica / UFPE)

---

Profa. Dra. Márcia Vanuza da Silva (Departamento de Bioquímica/ UFPE)

---

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas (Departamento de Genética/ UFPE)

---

Prof. Dr. Will de Barros Pita (Departamento de Antibióticos/ UFPE)

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amigos e colegas do LABEM, pelo convívio e crescimento durante esses quatro anos de aprendizado, em especial a Raquel, Zé Nunes, Bruno, Tereza Domingos, Tereza Liberal, Dani, Karol, Carol (Argentina), Rodrigo, Manu, Denise, Paula, Rafael, Allyson e Dayvison.

Aos amigos e colegas do CETENE pelo convívio agradável, pelas conversas e até brincadeiras: Isac, Fernanda, Aldenise, Alexandre Libânio, Manoel, Manu, Patrícia, Ramon, Carminha, Flávia, Ludmila e Rômulo.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, Genética e do CETENE pelo auxílio técnico.

Agradeço a Deus pelo seu Amor e por sua presença na minha vida.

Aos meus pais Geraldo e Marilene, pelo amor e dedicação, me ensinando os verdadeiros valores da vida.

A meu irmão Thiago e minha irmã Milena pelos momentos sinceros de amizade e fraternidade vivenciados.

A minha namorada Geórgia pela compreensão e carinho.

A todos os meus Familiares, pois vocês me dão força para vencer.

Aos amigos que estando perto ou longe são especiais na minha vida!

Enfim a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior pela oportunidade, confiança e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

## RESUMO

O termo biocombustível refere-se aos biocombustíveis sólidos, líquidos ou gasosos que são produzidos predominantemente por matérias-primas. Atualmente, dois tipos de combustíveis são utilizados para o transporte a nível global, o bioetanol e o biodiesel. Destacando-se o bioetanol, sendo este o mais consumido mundialmente. A produção desse biocombustível a partir da cana-de-açúcar no Brasil e milho nos Estados Unidos apresenta um mercado maduro com os dois países liderando a produção mundial. Contudo as destilarias de todo mundo que produzem etanol a partir dessas matérias primas ou outros cereais tem presenciado diminuição no rendimento industrial, e uma das causas é a presença de contaminantes bacterianos. Os episódios de contaminação são normalmente causados por bactérias lácticas (LAB), devido à sua capacidade de adaptação às condições adversas impostas pelo processo industrial. Além disso, o aumento da população de espécies de leveduras contaminantes, podem também contribuir para a redução da produção de etanol. O presente trabalho avaliou a possível relação ecológica entre a levedura comercialmente utilizada para o processo fermentativo das destilarias de etanol a *S. cerevisiae* e dois microrganismos frequentemente encontrados no processo: a levedura *Dekkera bruxellensis* e a bactéria *Lactobacillus vini*. Os resultados mostraram que o elevado teor de etanol no meio produzido por *S. cerevisiae*, pode controlar a população de bactérias, enquanto que a diminuição deste metabolito causada pelo aumento de contagem de células de *D. bruxellensis* poderia favorecer o crescimento bacteriano. Além disso, o elevado número de células bacterianas promoveu o aumento na produção de ácido orgânico que reduz o crescimento de levedura. No entanto, este fenômeno pareceu dependente do pH do meio. Por fim, foi realizado um estudo acerca do metabolismo de carboidratos de *L. vini* em meio sintético similar ao Manga Rosa Shape, com o objetivo de analisar a velocidade específica de *L. vini* e a sua biomassa final, tendo sido demonstrado uma alta biomassa quando celobiose, glicose, frutose e sacarose foram utilizados em relação a lactose e maltose, quando citrato de amônio estava presente no meio. Contudo a velocidade específica de crescimento de *L. vini* e sua biomassa variaram para os diferentes carboidratos com a mudança de citrato de amônio para sulfato de amônio, nitrato de sódio ou glutamato. A velocidade específica de crescimento e a biomassa de *L. vini* também foram analisadas em caldo e melaço da cana de açúcar com Brix 12, adicionados ou não de suplementos nutricionais como peptona, extrato de levedura, extrato de carne, citrato de amônia, Tween 80 e vitaminas, assim como com lisado celular de *S. cerevisiae*, interessantemente *L. vini* cresceu em caldo porém não em melaço quando adicionados do lisado de *S. cerevisiae*. Dessa forma, estamos apresentando um dos principais aspectos ecológicos da relação entre leveduras e bactérias que tem um enorme significado para o processo de produção de etanol.

Palavras chave: *Lactobacillus vini*, cana-de-açúcar, contaminação bacteriana, bioetanol, fermentação.

## ABSTRACT

The biofuel term refers to solid, liquid, or gaseous biofuels that are made predominantly of raw materials. Currently, two fuels are used to transport the global level, bioethanol and biodiesel. Highlighting bioethanol, which is the most consumed worldwide. The production of this biofuel from sugar cane in Brazil and corn in the United States has a mature market with more advanced technology. However distilleries worldwide that produce ethanol from these raw materials or other cereals has witnessed decline in industrial output, and one reason is the presence of bacterial contaminants. The episodes of contamination are normally caused by Lactic Acid Bacteria (LAB) due to their adaptability to the rough conditions imposed by the industrial process. Furthermore, the increase in the population of contaminating yeast species may also contribute to the reduction of ethanol production. This study evaluated the possible ecological relationship between the yeast commercially used for the fermentation of ethanol distilleries *S. cerevisiae* and two microorganisms frequently found in the process: the yeast *Dekkera bruxellensis* and the bacterium *Lactobacillus vini*. The results showed that high ethanol content in the medium produced by *S. cerevisiae* can control bacterial population, while the decrease of this metabolite caused by the raising of *D. bruxellensis* cell count could stimulate bacterial growth. Furthermore, the high number of bacterial cell promoted the increase in organic acid production that reduces yeast growth. However, this phenomenon seemed dependent on the medium pH. Finally, a study was conducted on the *L.vini* carbohydrate metabolism in synthetic medium, in order to analyze the specific growth rate and biomass of *L.vini*, it has been demonstrated high biomass while cellobiose, glucose, fructose and sucrose were used in connection with the lactose and maltose, while ammonium citrate was present in the medium. However, the specific growth rate and biomass of *L.vini* varied for different carbohydrates with a change in ammonium citrate to ammonium sulfate, sodium nitrate or glutamate. The specific growth rate and biomass of *L.vini* were also analyzed in broth and molasses from sugar cane with Brix 12, with or without nutritional supplements as peptone, yeast extract, meat extract, ammonium citrate, Tween 80 and vitamins, as well as with cell lysate of *S. cerevisiae*, interestingly *L.vini* grown in broth but not in molasses when added lysate of *S. cerevisiae*. Thus, we are presenting one of the major ecological aspects of the relationship between yeasts and bacteria that has an enormous significance to ethanol production process.

Keywords: *Lactobacillus vini*, sugarcane , bacterial contamination , bioethanol, fermentation.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

- Figura 1.** Diagrama representativo da demanda energética mundial referente ao ano de 2011. \**Outros inclui geotérmica, solar, eólica, etc.*(Fonte: [www.iea.org](http://www.iea.org) (Agência Internacional de Energia).....15
- Figura 2.** Esquema simplificado do processo de Batelada-Alimentada (Melle Boinot).....19
- Figura 3.** Mapa do metabolismo central mostrando a produção de etanol e de glicerol a partir dos carboidratos.....28

### Artigo 1

- Figura 1.** Efeito das diferentes concentrações de etanol adicionado ao meio MRS sobre o crescimento de *Lactobacillus vini*.....45
- Figura 2.** Efeito das diferentes concentrações de ácido acético (a) ou ácido lático (b) adicionado ao meio sintético com glicose sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (○) e *Dekkera bruxellensis* (△).....47
- Figura 3.** Cinética do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (painéis acima) e *Dekkera bruxellensis* (painéis abaixo) em meio YPD (painéis a,e) ou YPD contendo 2% de ácido lático (painéis b,f), 0.8% ácido acético (painéis c,g) de uma mistura de ambos ácidos (painéis d,h). O pH do meio foi ajustado com ácido sulfúrico para diferentes valores (símbolos foram colorido de acordo e apresentados como inseridos dos painéis a e d).....48

### Artigo 2

- Figura 1A.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul), caldo de cana (curva vermelha) e caldo de cana suplementado com extrato de levedura (curva verde).....64
- Figura 1B.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul), melão (curva vermelha) e melão suplementado com extrato de levedura (curva verde).....64
- Figura 2A.** Crescimento de *L. vini* em MRS (curva azul claro), caldo (curva laranja), caldo suplementado com extrato de levedura (curva verde), caldo com peptona (curva roxa), caldo

com peptona e vitamina (curva azul escuro) e caldo com extrato de levedura e peptona (curva vermelha).....	65
<b>Figura 2B.</b> Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus vini</i> nos meios MRS (curva azul claro), melão (curva laranja) e melão com extrato de levedura (curva verde), com extrato de levedura e peptona (curva vermelha), com peptona e vitamina (curva azul escuro) e com peptona (curva roxa).....	65
<b>Figura 3A.</b> Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus vini</i> nos meios MRS (curva azul claro), caldo de cana (curva laranja) e caldo com polisorbato, vitamina e peptona (curva roxa), polisorbato e peptona (curva vermelha), polisorbato e vitamina (curva azul petróleo) e extrato de levedura (curva verde).....	66
<b>Figura 3B.</b> Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus vini</i> nos meios MRS (curva azul claro), melão (laranja) e melão com polisorbato, peptona e vitamina (curva roxa), polisorbato e peptona (curva vermelha), polisorbato e vitamina (curva azul) e extrato de levedura (curva verde).....	66
<b>Figura 4A.</b> Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus vini</i> nos meios MRS (curva azul claro), caldo de cana (curva laranja) e caldo de cana com extrato de carne (curva verde), extrato de carne e peptona (curva vermelha), peptona e vitamina (2x) (curva azul petróleo) e peptona (curva roxa).....	67
<b>Figura 4B.</b> Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus vini</i> nos meios MRS (curva azul claro), melão (curva laranja) e melão com extrato de carne (curva verde), extrato de carne e peptona (curva vermelha), peptona e vitamina (curva azul escuro) e peptona (curva roxa).....	67
<b>Figura 5.</b> Crescimento de <i>L. vini</i> em caldo suplementado com lisado de <i>S. cerevisiae</i> e melão com lisado de <i>S.cerevisiae</i> .....	68

### Artigo 3

**Figura 1.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono. Gli: glicose; Fru: frutose; Sac: sacarose; Cel: cellobiose; Mal: maltose; Lac: lactose. O meio MRS reconstituído continha citrato de amônio como fonte de nitrogênio.....83

**Figura 2.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos contendo sulfato de amônio (A), nitrato de sódio (B) ou glutamato (C) como fonte de nitrogênio. O tipo de açúcar utilizado está definido segundo abreviação da

figura 1. O meio contendo glicose e citrato de amônio foi usado como referência.....86

**Figura 3.** Cinética da fermentação de glicose (A) e de sacarose (B) pelas células de *L. vini* JP7.8.9 em meio MRS reconstituído contendo citrato de amônio.....87

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

**Tabela 1.** Classificação dos biocombustíveis baseada na tecnologia de geração (Demirbas, A., 2011).....15

**Tabela 2.** Faixas da composição mineral da cana-de-açúcar.....16

### Artigo 1

**Tabela 1.** Efeito dos metabólitos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis* sobre o crescimento da bactéria *Lactobacillus vini*.  
.....44

**Tabela 2.** Efeito dos metabólitos produzidos por *Lactobacillus vini* cultivada em meio MRS sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*.  
.....46

### Artigo 3

**Tabela 1.** Comparação fenotípica entre espécies de *lactobacillus* com relação à assimilação de diferentes fontes de carbono.....78

## LISTA DE ABREVIACOES

pH	Potencial hidrogeniônico
ARDRA	Análise de restrio do DNA ribossomal amplificado
pheS	Subunidade alfa do RNA transportador que se liga a fenilalanina
16S	RNA ribossomal 16S
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
LAB	Bactérias cido lticas
ART	Acres redutores totais
CFU	Unidades formadoras de colnias
OD	Densidade ptica
C	Graus celsius
DNA	cido Desoxirribonucléico
PCR-fingerprint	Reao em cadeia da polimerase utilizada para identificao
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Considerações sobre Bioetanol e sua principal matéria prima	15
2.2 O processo de fermentação do mosto da cana-de-açúcar	18
2.3 Contaminação microbiana do processo fermentativo	19
2.4 Bactérias contaminantes do processo fermentativo	21
2.5 A contaminante <i>Lactobacillus vini</i>	22
2.6 Leveduras selvagens contaminantes do processo fermentativo	23
2.7 A levedura contaminante <i>Dekkera bruxellensis</i>	24
2.8 A linhagem de início <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
3 OBJETIVOS	29
REFERÊNCIAS	30
4 ARTIGO 1	38
Relação ecológica entre a <i>Sacharomyces cerevisiae</i> e dois microrganismos contaminantes <i>Dekkera bruxellensis</i> e <i>Lactobacillus vini</i>	
5 ARTIGO 2	57
Fisiologia de <i>Lactobacillus vini</i> em caldo e melaço de cana de açúcar	
6 ARTIGO 3	71
Avaliação do potencial de assimilação de nutrientes da bactéria <i>Lactobacillus vini</i> a partir meios de cultivo sintéticos	

## 1 INTRODUÇÃO

O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo, sendo o Brasil o primeiro país que introduziu esse combustível renovável em sua matriz energética. Uma grande indústria surgiu a partir dessa iniciativa pioneira e hoje o país possui o processo mais economicamente viável para produção desse biocombustível. Durante décadas, o país foi o principal produtor, mas recentemente foi superado pelos Estados Unidos. Os dois países respondem por cerca de 70% da produção de etanol mundial (RFA, 2011). No entanto, o Brasil ainda é o maior exportador de etanol (BASSO et al., 2011).

No Brasil, o etanol é produzido a partir da fermentação do caldo de cana de açúcar ou melaço de cana de açúcar, por células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em condições de anaerobiose. Na indústria, o caldo da cana é oriundo da moagem da cana-de-açúcar. O mesmo passa por um processo de tratamento para retenção das impurezas grosseiras, preservação de nutrientes, eliminação de partículas coloidais e redução de contaminantes microbianos. Com o tratamento do caldo, ocorre a correção dos seus açúcares totais e sua relação com sólidos solúveis, acidez e pH. Este passa então a ser denominado de mosto (o líquido fermentável), o qual será depositado nas dornas para dar início ao processo fermentativo industrial.

Apesar do tratamento da cana-de-açúcar, o mosto é não asséptico permitindo vários contaminantes (microrganismos que influenciam o rendimento e produtividade do etanol) no processo fermentativo, dentre eles estão às leveduras não selecionadas para produção de álcool assim como as bactérias.

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado sadio trabalha com níveis de bactérias nunca maiores que  $10^5$  células/mL. A procedência dessas é a mesma das leveduras nativas, isto é, a matéria prima. As fontes de contaminação incluem: a cana-de-açúcar, as práticas agrícolas, industrialização, extração, equipamentos (STUPIELLO, 1993). Entretanto a presença dessas no processo, diferindo das leveduras nativas, nunca é benéfica para a fermentação (ANDRIETTA et al., 2006).

Em nossos estudos prévios, o padrão populacional de bactérias lácticas envolvidas em episódios de contaminação bacteriana do processo industrial de produção de álcool combustível em destilarias no nordeste do Brasil, foi analisado através das técnicas moleculares ARDRA e pelo sequenciamento dos genes *pheS* e 16S. Os resultados mostraram que os principais contaminantes bacterianos do processo são os lactobacilos. A análise da

dinâmica da população bacteriana nestas destilarias, principalmente a safra 2007 / 2008, sugere que algumas bactérias surgem no processo, contudo não conseguem se manter, como por exemplo, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus ferintoshensis* e *Lactobacillus brevis*. Outras, contudo surgem e se mantêm, ainda que modificando a sua frequência, como *Lactobacillus vini* e *Lactobacillus fermentum*. A detecção da presença da bactéria *Lactobacillus vini* em alta proporção no processo representa um dado muito relevante, já que este é o primeiro trabalho que relata essa bactéria em processos fermentativos para produção de álcool combustível no Brasil (LUCENA, 2010).

É possível que a presença de certas espécies bacterianas sejam responsáveis pela instalação de eventos de contaminação por várias espécies de leveduras que já foram detectadas no ambiente industrial (BASÍLIO et al., 2008), com especial atenção para *Dekkera bruxellensis* que foi identificada como a principal levedura contaminante das destilarias de álcool do Nordeste do Brasil (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007).

Estudos recentes tem mostrado um possível consórcio entre *Dekkera bruxellensis/Lactobacillus vini* (PASSOTH et al., 2007). Esse consórcio pode ser prejudicial a levedura *S. cerevisiae* utilizada nas usinas, uma vez que tem sido aceito, que os *lactobacillus* sp. causam inibição a mesma e limita a produção de etanol, basicamente pela produção de ácido láctico e acético ou através da competição por nutrientes (NAREDRANATH et al., 1997; NAREDRANATH et al., 2003; BECKNER et al., 2011). Em nossos estudos prévios observamos que a presença dos contaminantes (*L. vini* / *D. bruxellensis*) não afetou a viabilidade de *S. cerevisiae* em condições fermentativas estáveis. Já no consórcio *L. vini* / *D. bruxellensis* houve um aumento na atividade fermentativa desta levedura, em relação à cultura pura de *Dekkera bruxellensis* (DE SOUZA et al., 2012; PEREIRA et al., 2011).

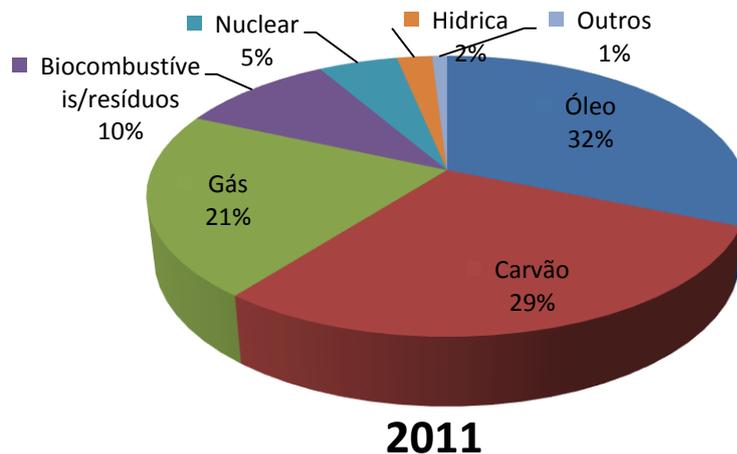
No presente trabalho serão abordados os metabólitos produzidos pelas leveduras *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* além de *L. vini* e a possível interação entre esses microrganismos. Os aspectos fisiológicos de *L. vini* também serão avaliados em meios industriais e sintéticos a fim de esclarecer o perfil nutritivo dessa bactéria e a prevalência ao fim das dornas de fermentação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Considerações sobre Bioetanol e sua principal matéria-prima

A biomassa corresponde a 10 por cento da demanda energética primária mundial (Figura 1). Num ambiente de crescente demanda por energia sustentável, clima mundial ameaçado por mudanças antrópicas, fornecimento de petróleo limitado e instabilidade política de países produtores, a utilização da biomassa como matéria-prima tem grande potencial de responder ao suprimento de uma civilização energeticamente dependente. Em termos energéticos, a biomassa representa um recurso derivado de organismos vivos. Logo os vegetais têm grande importância já que seus carboidratos ricos energeticamente podem ser eficientemente convertidos por microrganismos em biocombustíveis (ANTONI et al., 2007; IBRAHIM et al., 2014), os quais podem ser classificados de acordo a tecnologia de produção em primeira, segunda, terceira e quarta geração (Tabela 1) (DEMIRBAS, 2011).

**Figura 1.** Diagrama representativo da demanda energética mundial referente ao ano de 2011. \**Outros inclui geotérmica, solar, eólica, etc.*



**Fonte:** www.iea.org (Agência Internacional de Energia, 2011).

**Tabela 1.** Classificação dos biocombustíveis baseada na tecnologia de geração.

<b>Geração de Biocombustível</b>	<b>Matérias-primas</b>	<b>Exemplos</b>
Primeira Geração	Açúcar, amido, óleo vegetal ou gordura animal	Bioetanol, óleo vegetal, biodiesel, biosingás, biogás
Segunda Geração	Culturas não alimentares, palha de trigo, madeira, resíduos sólidos, milho	Bioetanol, bio-óleo, bio-DMF, biohidrogênio, bio-Fisher-Tropsch-diesel
Terceira Geração	Alga	Óleo vegetal, biodiesel
Quarta Geração	Óleo vegetal, biodiesel	Biogasolina

**Fonte:** DEMIRBAS, 2011.

Dentre os biocombustíveis, o etanol é o mais consumido no mundo. O Brasil, foi o primeiro país a introduzir esse combustível renovável em sua matriz energética. Uma grande indústria surgiu dessa iniciativa pioneira, e hoje detêm o processo mais economicamente viável para produção de bioetanol (BASSO et al., 2011).

O etanol combustível pode ser obtido de uma ampla variedade de matérias-primas renováveis, que podem ser classificadas em três tipos: (i) a sacarose contida nas matérias primas (ex: açúcares na cana, sorgo doce e beterraba) (ii) materiais com amido (trigo, milho e cereais), e (iii) biomassa lignocelulósica (madeira, palha e gramíneas). A viabilidade da matéria-prima para o bioetanol pode variar consideravelmente de estação para estação, e depende ainda de sua localização geográfica (BALAT et al., 2008).

A principal matéria prima para produção do etanol combustível é a cana-de-açúcar na forma de mosto de caldo de cana ou melaço, além da biomassa de amido. No Brasil, aproximadamente 79 por cento do etanol é produzido do caldo de cana e o restante do melaço de cana (FUKUDA et al., 2009; WILKIE et al., 2000). A cana-de-açúcar é uma cultura importante no país ocupando oito milhões de hectares com a produção de 600 milhões de

toneladas por ano, tornando o Brasil o maior produtor de mundial de cana de açúcar (BASSO et al., 2011).

Como uma espécie fotossintética do tipo C-4 a cana-de-açúcar apresenta uma elevada produtividade de biomassa, variando no valor entre 60-120 ton/ha.ano, com uma produção de etanol industrial de 8000 litros/ha, mais elevado quando comparado com 3000 litros/ha a partir do milho (BASSO et al., 2011). A cana-de-açúcar contém entre 12 a 17% de açúcares totais (90% sacarose e 10% glicose mais frutose) em base úmida de peso com 68-72% de umidade. A média da eficiência da extração de açúcar por esmagamento (ou difusão) é de aproximadamente 95%-97% (WHEALS et al., 1999).

A composição mineral de substratos de cana-de-açúcar variam amplamente, dependendo da variedade da cana-de-açúcar e maturidade, solo, clima e processamento da cana-de-açúcar (Tabela 2) (BASSO et al., 2011).

**Tabela 2.** Faixas da composição mineral da cana-de-açúcar e níveis recomendados para fermentação das leveduras. Concentração do elemento\*.

<b>Nutriente</b>	<b>Faixa de concentração*</b> <b>(mg/L)</b>	<b>Nível ótimo*</b> <b>(mg/L)</b>
Nitrogênio (NH <sub>4</sub> e R-NH <sub>2</sub> )	70-350	100-300
Fósforo	20-200	50-250
Potássio	300-12,000	700-1,300
Magnésio	80-3,900	100-200
Enxofre	80-3,900	Tão baixo quanto possível
Cálcio	150-2,000	Tão baixo quanto possível
Zinco	0,45-9	1-5
Cobre	0,20-8	1-5
Manganês	2-8	1-5
Alumínio**	2-500	<10 (em substrato de mosto)

**Fonte:** BASSO et al., 2011.

Na indústria a cana-de-açúcar passa por um processo de moagem, onde se retira o caldo, o mesmo passa por um processo de tratamento e passa a ser denominado mosto, o qual segue para as dornas onde iniciará o processo fermentativo.

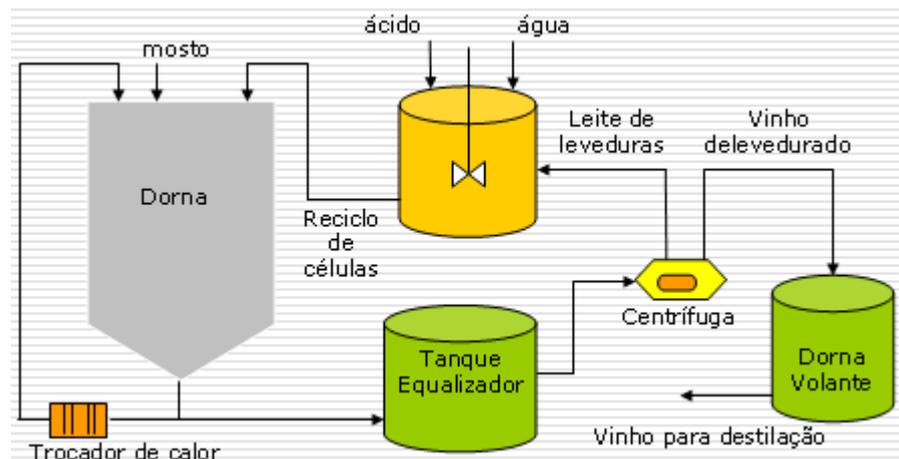
## **2.2 O processo de fermentação do mosto da cana-de-açúcar**

O processo de fermentação industrial para produção de álcool combustível ocorre através de dois métodos: a) em batelada (75% das destilarias) no qual toda fermentação se processa em dornas individuais com recuperação do fermento e sua reutilização em fermentações posteriores; b) o método contínuo que consiste na fermentação através de dornas interligadas nas quais a fermentação ocorre gradualmente em vários estágios (WHEALS et al., 1999; BASSO et al., 2011). Nesse processo também ocorre à reutilização do fermento. Até 90-95% das células de levedura são recicladas resultando em alta densidade celular dentro do fermentador [10-14% (base em peso úmido/v)]. O reuso celular reduz a necessidade da propagação intensiva da levedura e menos açúcar é desviado para biomassa. Normalmente a temperatura é mantida entre 32°C a 35°C, no entanto devido ao curto tempo de fermentação o arrefecimento nem sempre é suficiente para remoção do calor, e a temperatura pode alcançar até 40°C, especialmente no verão (LIMA et al 2001; AMORIM et al., 2004; ANDRIETTA et al., 2002, WHEALS et al., 1999).

Geralmente, a fermentação inicia por adição no mosto da cana (preparado pela mistura do suco da cana e melaço em qualquer proporção), que contém 12 a 22% (w/w) de açúcares redutores totais (ART) da suspensão da levedura. Esta suspensão representa cerca de 25 a 30% do volume total da fermentação, e é realizada em tanques de 300 a 3000 m<sup>3</sup>. O tempo de alimentação dura normalmente de 4 a 6h e a fermentação é finalizada dentro de 6 a 10 h (BASSO et al., 2011). Com a adição do fermento (levedura *S. cerevisiae* responsável pela assimilação de açúcar e sua conversão a etanol e CO<sub>2</sub>), ocorre a etapa fermentativa, que pode ser dividida em três fases: pré-fermentação, fermentação principal e a pós-fermentação. A fase de pré-fermentação inicia-se com a adição do mosto ao levedo. Quando o inóculo é pequeno, esta fase caracteriza-se pela multiplicação das leveduras, com consequente consumo de açúcares e lenta produção de álcool. A fermentação principal caracteriza-se pela intensa produção de álcool resultando em títulos de etanol de 8 a 12% (v/v) e liberação de CO<sub>2</sub>, aumento da temperatura, a qual deve ser controlada por resfriamento; progressivo aumento de espumas e elevação da acidez do mosto. A fermentação principal cessa quando diminui a liberação de gás e, conseqüentemente, a turbulência característica do mosto. Na pós-

fermentação verifica-se a diminuição da temperatura do vinho, elevação da acidez e a diminuição da atividade de fermentação da levedura pela ação do acúmulo de determinadas substâncias, do esgotamento dos carboidratos e das toxinas dos contaminantes (EMBRAPA, 2010). Quando a fermentação cessa as células de levedura são separadas por centrifugação. Depois da centrifugação o vinho segue para destilação para recuperação do etanol. Depois de destilar um líquido chamado vinhaça que é produzido na proporção de 10-15 litros por litro de etanol, e é entregue nas lavouras de cana para uso como água de irrigação e fertilizantes (adicionando ao solo potássio, cálcio, magnésio, outros micronutrientes e matéria orgânica) (BASSO et al., 2011).

**Figura 2.** Esquema simplificado do processo de Batelada-Alimentada (Melle Boinot).



Fonte: [www.ebah.com.br](http://www.ebah.com.br)

Como essa indústria continua a crescer, os produtores de bioetanol estão aplicando inovações tecnológicas para reduzir o consumo de energia e os custos de produção, e aumentar a eficiência utilizando a melhor tecnologia avaliada (DIEN et al., 2003; SCHELL et al., 2007). Contudo, apesar desse avanço tecnológico no processo, a contaminação microbiana permanece um dos maiores desafios econômicos nas operações de fermentação de etanol em larga escala. O crescimento microbiano é favorecido durante a produção de etanol industrial devido a condições não assépticas (CONNOLLY, 1999; NGANG et al., 1990).

### 2.3 Contaminação microbiana do processo fermentativo

A planta de cana-de-açúcar, como todo organismo vivo, encerra uma microbiota característica distribuída tanto no sistema vascular como em sua camada periférica

(ALQUATI, 1990). A presença maciça de micro-organismos tem origem no campo, estes adentram nos colmos através da ocorrência de infestação de pragas, danos provocados nos colmos pelas operações de corte/carregamento/transporte, facilitando assim a infecção. O corte da cana contribui significativamente neste contexto, sendo que o corte manual deixa menor área exposta para penetração de micro-organismos enquanto que o corte mecanizado aumenta esta área (MUTTON, 2003). As canas saudáveis podem conter de  $10^1$  a  $10^8$  bactérias/g e  $10^1$  a  $10^3$  bolores e leveduras/g (GALLO, 1989). Esta microbiota é levada juntamente com o caldo bruto no momento de sua obtenção através da moagem das plantas. O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como por insipiente assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material, necessitando muitas vezes do emprego de antissépticos para o controle da carga bacteriana (MUTTON, 2003).

A contaminação microbiana ocasiona perdas de rendimento potencial e produção de ácidos orgânicos indesejados (MUTHAIYAN, 2011). As bactérias e leveduras contaminantes competem com a *S. cerevisiae* por micro e macro nutrientes e produzem compostos inibitórios como ácido acético e lático. Esses ácidos tem causado aumento no tempo de fase lag, diminuição na proporção de crescimento, reduzido rendimento em biomassa, e até levado a morte de *S. cerevisiae* em determinados meios (MAKANJUOLA et al., 1992; THOMAS et al., 2002; ABBOTT et al., 2004; GRAVES et al., 2006; NARENDRANATH et al., 2001; THOMAS et al., 2001). A diminuição na proporção de produção do etanol e redução no rendimento em etanol, resultante da produção de ácido lático durante a fermentação ou ácido acético no meio, tem sido reportado (ABBOTT et al., 2004; GRAVES et al., 2006; NARENDRANATH et al., 2001). Graves e colaboradores (2006, 2007) demonstraram que em purê de milho o sinergismo do ácido acético e o ácido lático diminuíram a proporção de síntese de etanol e a sua quantidade final produzida pela levedura. A concentração requerida para a mistura dos ácidos inibirem a produção de etanol é menor do que a concentração inibitória de cada ácido individual se eles estão presentes em purê de milho. Além do mais o efeito inibitório desses ácidos em purê de milho é aumentado pela temperatura elevada (GRAVES et al., 2006, 2007).

## 2.4 Bactérias contaminantes do processo fermentativo

Uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas tem sido isolada da fermentação de etanol combustível, incluindo espécies de *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Clostridium* (LUSHIA; HEIST, 2005; SKINNER; LEATHERS, 2004). No entanto a maioria dos micróbios ofensivos são espécies de *Lactobacillus*, cujo rápido crescimento e tolerância a álcool e baixo pH permite-lhes competir eficazmente com as leveduras (MAKANJUOLA; SPRINGHAM, 1984; SKINNER; LEATHERS, 2004).

No Brasil, atualmente o segundo maior produtor mundial de etanol, Gallo (1989) trabalhou baseado na taxonomia numérica, em um extenso levantamento da microbiota predominante de amostras de todo o ambiente fermentativo. Os resultados obtidos revelaram que 98,52% das bactérias isoladas eram pertencentes ao grupo das Gram positivas. O gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (59,75%) entre eles: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. animalis*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, *L. vitulinus*, *L. viridences*, *L. amylophilus*, *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii*, *L. murinus*, *L. coryniformis*, *L. sake*. Entre os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, que representaram 26,58% do total de isolados foram isolados: *B.coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus* e *B. pasteurii*.

Em um estudo de uma planta de etanol industrial na Coreia, onde tapioca era utilizada como substrato foi observado que *Lactobacillus* foram os únicos contaminantes a sobreviver no final da fermentação, após o processamento da tapioca, alcançando níveis de  $10^8$  unidades formadoras de colônias por mililitro (CFU ml<sup>-1</sup>) (CHANG et al.,1995). Em outro estudo Skinner e Leathers (2004) monitoraram três fermentações a base de milho. Em uma delas, o nível de contaminação bacteriana alcançou  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> com 44-60% da população total constituída por *Lactobacillus* sp. predominando *L. delbrueckii*.

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, foram retiradas amostras de quatro destilarias na safra 2007 e 2008 e um total de 489 bactérias láticas (LAB) foram obtidas. A abundância de LAB nos tanques de fermentação variou entre  $6,0 \times 10^5$  e  $8,9 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>. As análises das técnicas moleculares ARDRA e o sequenciamento dos genes *pheS* e 16S indicaram que a maioria dos LAB isolados pertenceram ao gênero *Lactobacillus*. A análise da dinâmica populacional bacteriana sugere que algumas bactérias surgem no processo, contudo não conseguem se manter, como por exemplo, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus ferintoshensis* e *Lactobacillus brevis*. Outras, contudo surgem e se mantêm, ainda que

modificando a sua frequência, como *Lactobacillus vini* e *Lactobacillus fermentum*. Essas últimas detectadas em meio com etanol acima de 10%. A detecção da presença da bactéria *Lactobacillus vini* em alta proporção no processo representa um dado muito relevante, já que este é o primeiro trabalho que relata essa bactéria em processos fermentativos para produção de álcool combustível no Brasil (LUCENA et al., 2010).

## 2.5 A contaminante *Lactobacillus vini*

A espécie *Lactobacillus vini* foi descrita há poucos anos, e constitui o grupo de bactérias Gram-positivas, móveis, facultativamente anaeróbias, que não exibem atividade catalase e têm habilidade de utilizar açúcares pentose (ribose e/ou L-arabinose), embora elas sejam homofermentativas para produção exclusiva de ácido lático como produto final. O crescimento ocorre de 25–45°C, mas não a 15°C ou menos. Ácidos cítrico e málico são utilizados, além disso, assimilam L-arabinose, D-glicose, D-frutose, D-manose, N-acetilglicosamina, amigdalina, salicina, celobiose, maltose, sacarose, trealose e  $\beta$ -gentiobiose. Porém não assimilam glicerol, eritritol, D-arabinose, D-xilose, L-xilose, D-adonitol, L-sorbose, dulcitol, inositol, manitol, metil- $\beta$ -D-xilosideo, metil  $\alpha$ -D-glicosideo, lactose, melibiose, inulina, melezitose, D-rafinose, amido, glicogênio, xilitol, D-turanose, D-lixose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2- Ketogluconato ou 5-Ketogluconato (RODAS et al., 2006).

Essa bactéria tem sido isolada de várias usinas produtoras de etanol na Suécia e Brasil. Portanto existe uma demanda para entender sua interação com as leveduras (LUCENA et al., 2010; PASSOTH et al., 2007). As usinas de etanol envolvidas fermentaram em modo contínuo, com reciclo celular, com limitação de açúcar e concentrações de etanol acima de 100 g/L. Nas usinas da Suécia baixo pH (3.6) e temperatura de 36°C tem sido documentado (PASSOTH et al., 2007). Na maioria dos casos *L. vini* está associada com *Dekkera bruxellensis*. A *D. bruxellensis* é uma levedura não convencional que compete com a *S. cerevisiae* em diversas usinas produtoras de etanol (LUCENA et al., 2010; PASSOTH et al., 2007).

Tiukova e colaboradores (2014) investigaram o impacto de *L. vini* sobre o crescimento de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* por cocultivação. Em ambas coculturas com *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* o número de CFU de *L. vini* alcançou o mesmo nível de  $7.1 \times 10^7 \pm 2 \times 10^6$  cfu/mL, que foi apenas 70 % do número de células correspondente à cultura pura. A produção de lactato foi significativamente reduzida em 10% – 20% em ambas coculturas, assim como o

número de células viáveis de *D. bruxellensis* foi maior que o de *S. cerevisiae* ( $5 \times 10^7$  cfu/mL contra  $4.5 \times 10^7$  cfu/mL). Contudo, a concentração final de etanol em nas coculturas de *L. vini* e *D. bruxellensis* foi menor ( $5.3 \text{ g/L} \pm 0.2$ ) que nas coculturas de *L. vini* e *S. cerevisiae* ( $6.0 \text{ g/L} \pm 0.2$ ). Nesse estudo também foi observado que as células de *L. vini* apresentaram floculação nos meios testados proporcional ao aumento da concentração de etanol. Possivelmente, a formação de flocos pode reduzir a exposição da superfície celular ao etanol e assim ajudar a bactéria a sobreviver em condições estressantes de etanol. Interessantemente *L. vini* formou agregado celular com as leveduras quando cultivada em cocultura. Tendo sido observado uma maior interação entre *L. vini-S. cerevisiae* que em *L. vini-D. bruxellensis* no teste com manose (TIUKOVA et al., 2014). A anexação de LAB a células de leveduras é atribuída a proteínas de manose das bactérias (FURUKAWA et al., 2011). Assim a frequente coocorrência de *D. bruxellensis* pode ser devido ao fato de que *D. bruxellensis* é menos envolvida na floculação e assim menos impactada pela *L. vini*. (TIUKOVA et al., 2014). Contudo os autores afirmaram que os resultados não providenciaram uma explicação óbvia para coexistência entre *L. vini-D. bruxellensis*. Além disso, ainda não existe prova sobre se e como *L. vini* influencia a competição entre *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae*.

## 2.6 Leveduras selvagens contaminantes do processo fermentativo

Leveduras selvagens, com exceção de *S. cerevisiae*, que não são intencionalmente adicionadas no fermentador podem causar problemas para o processo de fermentação (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007; HEIST, 2009). Essas leveduras tem sido um problema constante em fermentações de bebidas ao longo da história para os cervejeiros e produtores de vinho em particular (CAMPBELL, 1987). Tradicionalmente elas têm sido difíceis de distinguir de culturas de leveduras baseadas na morfologia e fisiologia, mas avanços recentes em técnicas moleculares tem tornado possível detectar e distinguir a maioria das potenciais leveduras selvagens (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2005, 2007; GUILLAMÓN et al., 1998; HIERRO et al., 2004). As leveduras selvagens podem ser divididas em não-*Sacharomyces* e leveduras selvagens de *Sacharomyces* (BACK, 1987). No primeiro grupo encontram-se gêneros como *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Hanseniospora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Rhodotorula* e *Torulopsis* (CAMPBELL, 1987).

Apesar da importância econômica do bioetanol há poucos trabalhos que descrevem a comunidade de leveduras associadas à cana-de-açúcar. Na fermentação para produção de

etanol combustível a definição de um microrganismo contaminante leva em conta principalmente seu efeito sobre a produtividade e rendimento em etanol (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Sherata (1960) foi o primeiro a reportar a identificação de 14 espécies de leveduras na cana-de-açúcar e seu caldo, pertencente aos gêneros *Candida*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces*, *Kloeckera* e *Torulopsis*. Mais tarde, espécies de *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram também reportados para esse substrato (DE AZEREDO et al., 1998). Nos últimos anos, outras espécies de leveduras pertencentes a diversos gêneros, tais como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* e *Pichia* têm sido isoladas nesses substratos (GUERRA et al., 2001; SCHWAN et al., 2001; GOMES et al., 2002; OLASUPO et al., 2003). Estes organismos são mais propensos a causar problemas em plantas de etanol que utilizam o processo contínuo, mas eles também têm sido isolados de processo em batelada (HEIST, 2009). Basílio et al (2008) descreveram o isolamento e identificação de 24 espécies de leveduras coletadas de destilarias de bioetanol no Nordeste do Brasil que utilizava caldo ou melaço de cana para fermentação de etanol. Eles relataram que *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformes*, e linhagens de *C. intermedia* estavam associadas com contaminações aguda nos fermentadores. Com especial atenção para *D. bruxellensis* identificada como a principal contaminante das destilarias de álcool do Nordeste do Brasil (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007), assim como uma das principais contaminantes nos processos de fermentação nos USA e Canadá (ABBOTT et al., 2005) e na Europa (DE MINIAC, 1989; CIANNI et al., 2003).

Ao contrário do que ocorre com a contaminação bacteriana durante a fermentação, que pode ser controlada pelo tratamento com antibiótico ou ácido sulfúrico, não existe atualmente tratamento com antibiótico para inibir as leveduras selvagens. O tratamento envolve a completa mudança da população de leveduras do fermentador. O dano econômico causado pela contaminação com leveduras pode somente ser superado pela rápida detecção da contaminação, seguida da injeção das leveduras desejadas (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2005, 2007).

## **2.7 A levedura contaminante *Dekkera bruxellensis***

A levedura *Dekkera bruxellensis* (anamorfo *Brettanomyces bruxellensis*) pertence à família Saccharomycetacea e é considerado um parente distante de *Saccharomyces cerevisiae*, ambos os gêneros fazendo parte do grupo dos hemiascomicetos e que divergiram há cerca de

200 milhões de anos. Os primeiros relatos desta levedura estão associados a sua presença em cervejarias inglesas sendo a elas atribuídas certas características aromáticas resultantes da fermentação secundária (CLAUSSEN, 1904). Em 1940, o gênero *Brettanomyces* foi estabelecido e mais tarde, em 1964, foi criado o gênero *Dekkera* após a observação de formação de ascósporos em algumas linhagens de *Brettanomyces* (VAN DER WALT, 1964). A levedura *D. bruxellensis* é capaz de assimilar uma grande variedade de fontes de carbono como os monossacarídeos glicose, frutose e galactose, e dissacarídeos, como sacarose, maltose, celobiose e trealose (CONTERNO et al., 2006). A capacidade de assimilar outras fontes de carbono como a lactose, arabinose e rafinose parece ser uma característica linhagem específica e não atribuída a espécie como um todo (LEITE, 2012). Galafassi e colaboradores (2011) analisaram cerca de 50 linhagens pertencentes ao gênero *Dekkera/ Brettanomyces* quanto ao seu potencial fermentativo relativo a fontes de carbono, e encontraram linhagens de *D. bruxellensis* capazes de assimilar celobiose e amido, mas não xilose e arabinose.

Isolados dessa levedura foram descritos como responsáveis por eventos de contaminação em destilarias do nordeste do Brasil (BASÍLIO et al., 2008), em especial a linhagem GDB248 (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007). Esta linhagem tem sido utilizada como linhagem-padrão da fermentação alcoólica industrial, para análises genéticas e fisiológicas em função de sua adaptabilidade ao processo industrial.

Apesar de *D. bruxellensis* estar relacionada como contaminante dos processos fermentativos de etanol combustível (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2008), os dados tem mostrado rendimento de etanol próximos a *S. cerevisiae* (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007; DE BARROS PITA et al., 2011) tendo sido proposto um possível consórcio entre *D. bruxellensis* e *L. vini* para produção de etanol (PASSOTH et al., 2007). No entanto, essa levedura possui uma fermentação mais lenta que *S. cerevisiae*, e dependendo do processo pode acarretar atraso na produção industrial (DE SOUZA-LIBERAL et al., 2007).

À parte de sua capacidade de produzir etanol, a *D. bruxellensis* partilha várias características com *S. cerevisiae*. Dentre estas, ambas são tolerantes a etanol, são microrganismos anaeróbicos facultativos, são classificados como *Crabtree* positivas que diz respeito à preferência ao metabolismo fermentativo em altas concentrações de glicose em presença de oxigênio (WOOLFIT et al., 2007). Além do mais são *petite* positiva, ou seja, podem se propagar sem o DNA mitocondrial (ROZPEDOWSKA et al., 2011). Ainda em relação a *S. cerevisiae*, a *D. bruxellensis* tem mostrado maior adaptação ao ambiente industrial e isto pode estar ligado a algum fator limitante de crescimento em competição com

células de *S. cerevisiae*. Se a *D. bruxellensis* é capaz de assimilar ou metabolizar um nutriente mais eficientemente que *S. cerevisiae*, sua taxa de crescimento pode ser maior nessa condição (PITA, 2009). Outra possibilidade pode estar ligada a maior tolerância a pH baixo e elevada resistência a etanol (ROZPEDOWSKA et al., 2011).

Outra característica marcante de *D. bruxellensis* é a capacidade de produzir ácido acético em aerobiose. Em leveduras o ácido acético pode ser produzido a partir da oxidação do acetaldeído, gerado pela descarboxilação do piruvato (POSTMA et al., 1989; FREER, 2002; BLOMQVIST et al., 2010). Este ácido poderia inibir a *S. cerevisiae*, em meio fermentativo, porém não se observa sua produção em condições limitantes de oxigênio em ensaios em frasco (PEREIRA et al., 2011), e na indústria (PHOWCHINDA et al., 1995; ABBOTT et al., 2005; BLOMQVIST et al., 2010).

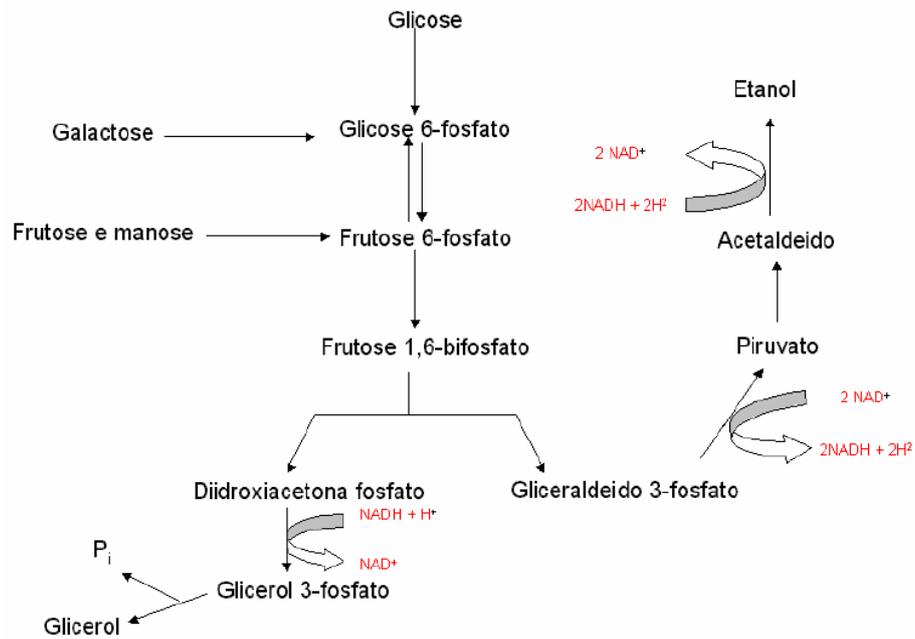
## **2.8 A linhagem de início *Saccharomyces cerevisiae***

Desde a Antiguidade, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada em processos fermentativos diversos, como na panificação, cervejaria e fabricação de vinho e, seu uso foi possível desde então, devido a sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico. É também muito importante como organismo modelo para estudos biológicos (OSTERGARD et al., 2000), quer em estudos fisiológicos (efeitos de diversos tipos de stresse – osmótico, oxidativo, etanol, e ácidos fracos), quer na área de Biologia Celular e Molecular, sendo o microrganismo eucariótico mais estudado e aquele cujo genoma eucarioto foi o primeiro a ser sequenciado (WILLIAMS, 1996).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* pertence ao Super Reino Eukaryota, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (ALEXOPOULOS, 1996). A família Saccharomycetaceae inclui leveduras que são predominantemente unicelulares e podem produzir pseudomicélio, possuem reprodução assexuada primariamente por brotamento multilateral e produzem ascósporos livres a partir de ascos que se originam tanto de um zigoto como partenogeneticamente de uma célula somática (ALEXOPOULOS, 1996). O asco é um tipo especial de esporângio no qual se desenvolvem os produtos da meiose, os ascósporos (WALKER et al., 1998). Esta é umas das poucas espécies de leveduras que podem crescer sob condições anaeróbias estritas. Contudo requer oxigênio para síntese de ergosterol e ácido

Em relação ao metabolismo de açúcar, dois tipos de metabolismo podem ser identificados em *S. cerevisiae*: a respiração e a fermentação alcoólica. O ambiente da levedura determina o balanço entre esses dois modos, e o oxigênio tem um papel importante. Outros parâmetros também têm relevância no balanço entre os dois modos como a concentração de açúcar, a proporção de crescimento específico e a linhagem da levedura. Como mencionado anteriormente à alta concentração de glicose em presença de oxigênio leva ao metabolismo fermentativo (Efeito *Crabtree*). E mesmo sob completa condição aeróbica, um metabolismo misto (respirofermentativo) pode ser observado quando a concentração de glicose é maior que um certo limiar (1mM) (POSTMA et al., 1989; VERDUYN et al., 1984; JANSEN, 2004). A glicose é a fonte preferida de carbono e energia de *S. cerevisiae*, mas outros açúcares podem ser assimilados como os monossacarídeos frutose, manose e galactose, assim como os dissacarídeos maltose e sacarose (JANSEN, 2004).

A formação de etanol em *Saccharomyces* e em outras leveduras ocorre a partir da via Embden-Meyerhorf-Parnas, ou via glicolítica. O carboidrato é oxidado a gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato o qual é descarboxilado a acetaldeído. Na reação subsequente o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase à custa de  $\text{NADH}^+$ . Os dois  $\text{NAD}^+$  formados são utilizados na oxidação de outra molécula de carboidrato, mantendo-se assim o equilíbrio redox (redução-oxidação) na célula (WALKER, 1998). A diidroxiacetona pode ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato e posteriormente a etanol, ou alternativamente, reduzida a glicerol (Figura 3).



**Figura 3:** Mapa do metabolismo central mostrando a produção de etanol e de glicerol a partir dos carboidratos em *S.cerevisiae* (Fonte: WALKER, 1998.)

No processo completamente anaeróbio 1 g de glicose renderia teoricamente 0,51 g de etanol e 0,49 g de  $\text{CO}_2$ . Entretanto devido a produção de biomassa, o rendimento de 0,46 g de etanol e de 0,44 g de  $\text{CO}_2$  a partir de 1 g de glicose é mais realístico.

Devido sua capacidade em metabolizar sacarose, tanto por meio da sua hidrólise extracelular como intracelular (BADOTTI et al., 2006, 2008), a *S. cerevisiae* tem sido utilizada como cepa de início nas destilarias de álcool no Brasil, uma vez que esse açúcar é o principal constituinte do caldo e melaço de cana-de-açúcar. Em algumas dessas destilarias a dinâmica das leveduras durante a fermentação industrial tem sido monitorada com base em técnicas moleculares, como a cariotipagem e PCR-fingerprint. Em um desses monitoramentos Da Silva e colaboradores (2005b) observaram que cepas indígenas de *S. cerevisiae* (contaminantes) foram capazes de substituir as cepas comerciais de *S. cerevisiae* durante o processo de reciclo. Usando o PCR-fingerprint associado a análises fisiológicas foi possível isolar a cepa indígena (JP1) para ser utilizada como cepa de início para as destilarias no Nordeste. Esta cepa é altamente dominante, com alto rendimento etanólico (> 90%) além de exibir tolerância a um pH ácido, altos níveis de etanol e altas temperaturas (DA SILVA et al., 2005a).

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

Avaliar a fisiologia de *L. vini* e a sua interação ecológica com as leveduras produtoras de etanol *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica industrial.

#### **Objetivos Específicos**

1. Avaliar o efeito dos metabólitos das leveduras sobre *L. vini* assim como a influência de *L. vini* sobre a velocidade específica de crescimento em *S.cerevisiae* e *D.bruxellensis* e observar o perfil de tolerância dos microrganismos em variadas concentrações de ácidos orgânicos ou etanol.
2. Avaliar o requerimento nutricional de *L. vini* em caldo e melão de cana-de-açúcar e em diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

## 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. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.66, p. 641– 647, 2005.
- ABBOTT, D.A.; INGLEDEW, W.M. Buffering capacity of whole corn mash alters concentrations of organic acids required to inhibit growth of *Saccharomyces cerevisiae* and ethanol production. **Biotechnol Lett**, v.26, p.1313-6, 2004.
- ALEXOPOULOS,C.J.; MIMS,C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Micology**. 3ed.New York: John Wiley & Sons, p.272-285, 1996.
- ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. In: Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; LOPES, M.L. **Evolution of ethanol production in Brazil, in Distiled Spirits – Tradition and Innovation**. In: ed. Bryce, J.H. e Stewart, G;G.,Nottingham Univ. Press (UK), v. 1, n. 1, p. 143-148, 2004.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C and STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol –Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, v 109, p 195-200, 2007.
- ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R.; Steckelberg, C, STUPIELLO, E.N.A. Bioethanol – 30 years after Proalcool. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 195-200, 2002.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG C.; ANDRIETTA, S.R. Bioetanol-Brasil 30 anos de vanguarda. **MultiCiência:Construindo a história de produtos naturais**,7, 2006.
- ANTONI, D.; ZVERLOV, V.V.; SCHWARZ, W.H. Biofuel from microbes. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 77, p. 23-35, 2007.
- ANTONIE VAN VERDUYN, C.; ZORMERDIJK, T.P.L.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 19, p. 181-185, 1984.
- BACK, W. Nachweis und identifizierung von fremdhefen in der brauerei. **Brauwelt**, v. 127, p.735-7, 1987.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.S.; STAMBUK, B.U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. Arch. Biol. Technol**, v.49, p. 115-123, 2006.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ALVES, S.; CORDIOLI, M.; MILLETI,L.; DE ARAÚJO, P.; STAMBUK, B. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v.7, p. 2-11, 2008.

- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O.Z. Progress in bioethanol processing. **Prog. Energ. Combust.**, v. 34, p. 551–57, 2008.
- BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O.F.; DA SILVA-FILHO, E.A.; MORAIS Jr M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol**, v.56,n.4, p. 322-326, 2008.
- BASÍLIO, A.C.M.; ARAÚJO, P.R.L.; MORAIS, J.O.F.; DA SILVA-FILHO, E.A.; MORAIS Jr M.A.; SIMÕES, D.A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Curr Microbiol**, v.56,n.4, p. 322-326, 2008.
- BASSO, L.C.; BASSO, T.O.; ROCHA, S.N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. In: ed. Bernardes MAS, Biofuel production—recent developments and prospects, p. 85–100, 2011.
- BECKNER, M.; IVEY, M.L.; PHISTER, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. **Lett Appl Microbiol**, v. 53, p.387-394, 2011.
- BLOMQUIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010.
- CAMPBELL, I. **Wild yeasts in brewing and distilling**. In: ed. Priest FG, Campbell I, Brewing microbiology. New York, N.Y: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 187-205, 1987.
- CHANG, I., KIM, B.H., SHIM, P.K. and LEE, W. (1995) Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. *J Microbiol Biotechnol* 5, 309–314.
- CIANI, M.; MACCARELLI, F.; FATICHENTI, F. Growth and fermentation behaviour of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts under different conditions of aerobiosis. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 19, p. 419–422, 2003.
- CLAUSSEN, N. H. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 10, p. 308-331, 1904.
- CONNOLLY, C. **Bacterial contaminants and their effects on alcohol production**. In: ed. Jacques K, Lyons TP, Kelsall DR. The alcohol textbook. Nottingham University Press, p. 317-34, 1999.
- CONTERNO, L.; JOSEPH, C.; ARVIK, T. J.; HENICK-KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American journal of enology and viticulture**, v. 57, n. 2, p. 139, 2006.
- DA SILVA, E.A.; DE MELO, W.F.; ANTUNES, D.F.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.D.; SIMOES, D.A.; MORAIS Jr, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanolfermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, p.481-486, 2005a.

DA SILVA, E.A.; DOS SANTOS, S.K.B.; RESENDE, A.D.; DE MORAIS, J.O.F.; MORAIS Jr, M.A.; SIMOES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 88, p.13-23, 2005b.

DE AZEREDO, L.A.; GOMES, E.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; HAGLER, A.N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **Int Microbiol**, v. 1, p. 205–208, 1998.

DE BARROS PITA, W.; LEITE, F. C. B.; DE SOUZA LIBERAL, A. T.; SIMOES, D. A.; DE MORAIS, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *Saccharomyces cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p. 1-9, 2011.

DE MINIAC, M. Contamination des fermentations alcooliques industrielles par les levures du genre *Brettanomyces*. **Ind Aliment Agric**, v. 106, p. 559–563, 1989.

DE SOUZA LIBERA, A.T.; BASÍLIO, 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**, v.102, p. 538–547, 2007.

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

DE SOUZA LIBERAL, A.T.; DA SILVA-FILHO, E.A., DE MORAIS, J.O.F.; SIMOES, D.A.; DE MORAIS, M.A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Lett Appl Microbiol**, v.40, p. 19-23, 2005.

DE SOUZA, R.B.; DOS SANTOS, B.M.; DE SOUZA, R.F.S.; DA SILVA, P.K.; LUCENA, B.T.; MORAIS Jr, M.A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol**, n.39, p. 1645–1650, 2012.

DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, v. 88, p. 17-28, 2011.

DIEN, B.; COTTA, M.; JEFFRIES, T. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 63, p. 258-66, 2003.

EMBRAPA. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_105\\_2212200654841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_105_2212200654841.html)>. Acesso em: 01 de outubro de 2010.

FREER, S. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 271-275, 2002.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPADI, J. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 2-12, 2009.

FURUKAWA, S., NOJIMA, N., YOSHIDA, K., HIRAYAMA, S., OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 75, p. 1430–1434, 2011.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica** (Doutorado). Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP, 1989.

GOMES, F.C.; PATARO, C.; GUERRA, J.B.; NEVES, M.J., CORREA, S.R., MOREIRA, E.S.; ROSA, C.A. Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Can J Microbiol**, v. 48, p.399–406, 2002.

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. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 469-74, 2006.

GRAVES, T.; NARENDRANATH, N.V.; DAWSON, K.; POWER, R. Interaction effects of lactic acid and acetic acid at different temperatures on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 73, p. 1190-6, 2007.

GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Lett Appl Microbiol**, v. 33, p. 106–111, 2001.

GUILLAMÓN, J.M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E.; CANO, J., QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Arch Microbiol**, v.169, P.387-92, 1998.

HEIST, P. Identifying, controlling the most common microbial contaminants. Ethanol Producer Magazine, <[http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article\\_id¼5464](http://www.ethanolproducer.com/article.jsp?article_id¼5464)>; 2009 [accessed 16.07.2010].

HIERRO, N.; GONZALES, A.; MAS, A.; GUILLAMON, J.M. New PCR-based methods for yeast identification. **J Appl Microbiol**, v. 97, p. 792-801, 2004.

IBRAHIM, N.; KAMARUDIN, S.K.; MINGGU, L.J. Biofuel from biomass via photo-electrochemical reactions: An overview. **J Power Source**, v. 259, p. 33-42, 2014.

JANSEN, M.L.A. **Maltose versus Glucose Metabolism in Saccharomyces Cerevisiae: Short- and Long-term Phenomena**. The M.C. Escher Company B.V.-Baarn – Holland, 2004.

LAGUNAS, R. Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 2, p.221-228, 1986.

LEITE, F.C.B. **Fisiologia molecular da levedura *Dekkera bruxellensis*** (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 2012.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. **Produção de etanol, in Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos.** ed. Lima, U.A.; Aquarone, E., Borzani, W. e Schmidell, W. Edgard Blucher, São Paulo, v.3, p.1-43, 2001.

LUCENA, B. T.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A., THOMPSON, F. L.; MORAIS Jr, M. A. **BMC Microbiol**, v.10, p. 298, 2010.

LUCENA, B.T.L. **Diversidade de bactérias lácticas presentes em destilarias de álcool combustível** (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 2010.

LUSHIA, W., HEIST, P. 2005. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. *Ethanol Producer Mag* May, p. 80–82, 2005.

MAKANJOULA, D.B.; SPRINGHAM, D.G. Identification of lactic acid bacteria isolated from different stages of malt and whisky distillery fermentations. **J Inst Brew**, v. 90, p. 1319, 1984.

MAKANJOULA, D.B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D.G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. **Enzyme Microb Technol**, v. 14, p.350-7, 1992.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Prog Energy Combustion Sci**, v. 37, p.351–370, 2011.

MUTTON, M.J.R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. **Workshop sobre: “Produção de etanol: qualidade de matéria-prima”**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil, 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. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 171-7, 2001.

NGANG, J.J.E.; LETOURNEAU, F.; WOLNIEWICZ, E.; VILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 490-3, 1990.

OLASUPO, N.A., BAKRE, S., TENIOLA, O.D. and JAMES, S.A. Identification of yeasts isolated from Nigerian sugar cane peels. **J Basic Microbiol**, v. 43, p. 530–533, 2003.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 64, p. 34-50, 2000.

- PASSOTH, V., BLOMQVIST, J., SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p.4354–4356, 2007.
- PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNÜRER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 4354–4356, 2007.
- PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P. G.; AVANSINI, S. H.; NETO, A. G. B.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; CECCATO-ANTONINI, S. R.; DE MORAIS, 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**, v. 101, n. 3, p. 529 - 539, 2011.
- PEREIRA, L.F.; BASSI, A.P.G.; AVANSINI, S.H.; BARBOSA-NETO, A.G.; Brasileiro, B.T.R.V.; CECCATO-ANTONINI, S.R.; DE 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**, v.101, n.3, p.529-539, 2011.
- PHOWCHINDA, O.; DELIA-DUPUY, M.; STREHAIANO, P. Effects of acetic acid on growth and fermentative activity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology letters**, v. 17, n. 2, p. 237- 242, 1995.
- PITA, W. D. B. **Análise da expressão dos genes relacionados à assimilação do nitrato na levedura *Dekkera Bruxellensis*** (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 2009.
- POSTMA, E.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. 1989. Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 55, p.468-477, 1989.
- RFA (2011). Renewable Fuels Association. **In: Statistics**. Access Feb 17th 2011. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>
- RODAS, A.M.E.; CHENOLL, M. C.; MACIÁN, S.; FERRER, I.; PARDO, R. Aznar. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 56, p. 513-517, 2006.
- 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. **Nat Commun**, v. 2, p.302, 2011.
- SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks, **Bioresour. Technol**, v.99,p. 5270–5295, 2008.
- SCHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F.; LUMPKIN, R.E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresour Technol**, v. 98, p.2942-8, 2007.

SCHWAN, R.F., MENDONÇA, A.T., DA SILVA, J.J. Jr.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of Cachaca (Aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 89–96, 2001.

SHERATA, A.M. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. **Appl Microbiol**, v. 8, p. 73–75, 1960.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 31, p.401–408, 2004.

STUPIELLO, M. G. **Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente a bactérias Gram (+) isoladas da fermentação alcoólica** (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, Departamento de Tecnologia Agroindustrial, 1993.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **J Appl Microbiol**, v. 90, p. 819-28, 2001.

THOMAS, K.C.; HYNES, S.H.; INGLEDEW, W.M. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Appl Environ Microbiol**, v.68, p.1616-23, 2002.

TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 61, n.1, p. 40-4, 2014.

VAN DER WALT, J. *Dekkera*, a new genus of the Saccharomycetaceae. **Leeuwenhoek**, v. 30, n. 1, p. 273-280, 1964.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Wiley, 1998.

WHEALS AE, BASSO LC, ALVES DMG, AMORIM HV. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology** v. 17, n. 12, p. 482-487, 1999.

WILKIE,A.C.; RIEDESEL,K.J.; OWEND, J.M. Stilage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feed stocks, **Biomass Bioenergy** v. 19, p. 63–102, 2000.

WILLIAMS N. Genome Projects: Yeast Genome Sequence Ferments New Research. **Science**, v. 272, p. 481, 1996.

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

ZHANG, Z. Batch fermentation and fermentor design. In *The Alcohol Text Book* (5<sup>th</sup> edition), Ingledew, WM, Kelsall, DR, Austin, GD and Kluhspies, C (ed.), Nottingham University Press, Nottingham, 541p, 2009.

## 4 ARTIGO 1

### Relação ecológica entre a *Sacharomyces cerevisiae* e dois microrganismos contaminantes *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus vini*

André Ribas de Miranda<sup>1</sup>, Paula Katharina Nogueira da Silva<sup>1</sup>, Raquel de Fátima Rodrigues de Souza<sup>4</sup>, Brígida Thais Luckwu Lucena<sup>1,3</sup> e Marcos Antônio de Moraes Jr<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa Interdepartamental em Engenharia Metabólica e <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.50670-901, Recife, Brasil.

<sup>3</sup>Centro para Biologia e Ciências Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba. 58071-160, João Pessoa, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Bioprocessos, Centro de Pesquisa para Tecnologias Estratégicas do Nordeste do Brasil/CETENE, 50740-540, Recife, Brasil.

#### Resumo

O presente trabalho avaliou a possível relação ecológica entre a *Saccharomyces cerevisiae* e dois microrganismos frequentemente presentes na indústria alcooleira – a levedura *Dekkera bruxellensis* e a bactéria *Lactobacillus vini*. Para analisar essa relação, as leveduras foram cultivadas em meios industriais e de laboratório. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para diluir o meio MRS concentrado. As células bacterianas foram então cultivadas neste meio misto. Uma experiência semelhante foi realizada com sobrenadante bacteriano num meio de levedura. Os resultados mostraram que a quantidade de etanol nos sobrenadantes das culturas das leveduras afetou o crescimento bacteriano. Contudo uma vez que *D.bruxellensis* produziu metade da concentração de etanol produzido por *S.cerevisiae*, a *L.vini* obteve uma maior velocidade específica de crescimento no sobrenadante de *D.bruxellensis*. Adicionalmente, os ácidos orgânicos produzidos pelas células bacterianas quando crescidas por 24h inibiram o crescimento de *D.bruxellensis* e diminuiu o crescimento específico de *S.cerevisiae*, quando o pH do meio ao qual as leveduras foram submetidas foi 4. No teste de tolerância das leveduras a ácido láctico, a *S.cerevisiae* apresentou menor fase lag em relação a *D.bruxellensis* num pH inicial de 4. A partir destes resultados, concluímos que a diminuição do etanol que pode ocorrer nas dornas de fermentação devido ao aumento da população de *D. bruxellensis*, pode acarretar o crescimento das células bacterianas, que por sua vez inibe o crescimento da *D.bruxellensis* pela produção de ácidos e pela diminuição do pH do meio. Assim, que a população de *D. bruxellensis* é reduzida a levedura *S. cerevisiae* pode retomar o crescimento, controlando a população bacteriana devido ao etanol produzido. Esta interação pode ser um dos principais fatores ecológicos na relação entre leveduras e bactérias e é de enorme significado para o processo de produção de etanol.

**Palavras-chave:** Ácido acético, contaminação bacteriana, bioetanol, ácido láctico, cana-de-açúcar.

## Introdução

A indústria brasileira de etanol usa caldo de cana e/ou melaço de açúcar como substratos para a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, e este processo é realizado sob sepsia para todo o período da safra, isso faz com que a contaminação microbiana seja um problema constante na fermentação do etanol (Skinner; Leathers 2004; Lucena et al., 2010; Beckner et al., 2011; De Souza et al., 2012). O processo de fermentação para produção de etanol é suscetível à contaminação por bactérias lácticas (LAB) que florescem neste ambiente devido à sua elevada tolerância ao etanol e pH baixo, pelo menos, quando comparado com outras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Tem sido mostrado que a bactéria *Lactobacillus fermentum* heterofermentativa é prejudicial para *S. cerevisiae*, porque ela produz ácido láctico (Thomas et al., 2001). Para além de qualquer efeito nocivo que as células bacterianas podem ter sobre a levedura de fermentação, a instalação de uma estirpe bacteriana particular também poderia contribuir para instalação de linhagens de leveduras selvagens, como *Dekkera bruxellensis*. Passoth e colaboradores (2007) relataram a primeira associação de *D. bruxellensis* e *Lactobacillus vini* numa planta produtora de etanol na Suécia. Num estudo paralelo, mostramos que *D. bruxellensis* é a principal levedura contaminante nas destilarias no Nordeste do Brasil (De Souza Liberal et al., 2007; Basílio et al., 2008).

A associação entre esses dois microrganismos surgiu novamente quando foi observado que destilarias suscetíveis à contaminação com *D. bruxellensis* também tiveram altas contagens de *L. vini* durante a temporada de colheita (Lucena et al., 2010). Recentemente, Tiukova e colaboradores (2014) mostraram que a interação célula-a-célula envolvendo resíduos de manose na superfície celular entre *D. bruxellensis* e *L. vini*, é observada em co-culturas, o que pode ter implicações significativas para a dinâmica da população microbiana durante o processo. Assim, isso levanta a questão de uma possível simbiose entre estes microrganismos no ambiente industrial. Experimentos com fermentações mistas de levedura-bactérias foram realizadas para explorar a interação entre *L. vini* e *D. bruxellensis* (De Souza et al., 2012). Os resultados mostraram que sob condições de fermentação com alta densidade celular e elevado teor de açúcar e quase nenhum oxigênio a presença de *L. vini* não afetou a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* (De Souza et al. 2012).

*Lactobacillus vini* foi classificada primeiramente como homofermentativa devido à produção única de DL- ácido láctico a partir de pentoses (Rhodas et al., 2006), que em princípio, está em conformidade com o trabalho de Basso e colaboradores (2014) e poderia explicar os resultados de culturas mistas (De Souza et al. 2012) uma vez que a produção de

um único ácido orgânico não causa efeito sinérgico como na presença de dois ácidos orgânicos, o que poderia levar a uma queda na produção de etanol pelas leveduras (Graves et al., 2006, 2007). No entanto, duas questões que permanecem sem solução necessitam ser abordadas para uma melhor compreensão desta interação de levedura-bactéria. Em primeiro lugar, a condição homo ou heterofermentativa de *L. vini* não parece ser ainda bem definida; os fatores ecológicos que explicam em parte o coincidente aparecimento/desaparecimento de *L. vini* e *D. bruxellensis* no processo industrial não estão claros. A competição por nutrientes essenciais é pensado levar o efeito das bactérias lácticas sobre a levedura, mas há alguns metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas que são conhecidos por inibir o crescimento das leveduras diminuindo a produção de etanol tais como ácido acético, ácido láctico, diacetil, reuterina e ácidos graxos (Bayrock e Ingledew 2004; Beckner et al., 2011).

O presente estudo avaliou o efeito dos metabólitos produzidos durante o crescimento ou a fermentação de *D. bruxellensis* e *S. cerevisiae* sobre a velocidade específica de crescimento de *L. vini* assim como os metabólitos produzidos pelo crescimento de *L. vini* na velocidade específica de crescimento das leveduras. Os resultados mostraram que os ácidos orgânicos e o etanol são elementos chave da interação ecológica entre estes microrganismos já que atuam em sinergia com as mudanças nas condições físico-químicas do processo, tais como variação no pH. Assim, poderia ser estabelecida uma alternância cíclica na população microbiana, dependendo das propriedades físico-químicas do processo industrial.

## **Materiais e Métodos**

A linhagem industrial bacteriana *L. vini* JP789 (Lucena et al., 2010) e as leveduras industriais *S. cerevisiae* JP1 e *D. bruxellensis* GDB248 foram usadas para o experimento (De Souza et al., 2011; Pereira et al., 2011). As células de bactérias e leveduras foram mantidas em meio MRS e YPD, respectivamente, contendo 20 g/L de agar. Meio sintético (SM) foi composta de YNB completo (Difco) a 6,7 g/L suplementado com glicose a 20 g/L quando usado para o crescimento celular (GSM) ou a 120 g/L, quando utilizado para a fermentação de células (SMF). O caldo de cana, fornecido pela destilaria Miriri Agroindustrial (Santa Rita, PB), foi centrifugado a 5000 rpm por cinco minutos para remover a suspensão de sólidos, diluído com água destilada a concentração de açúcares totais para 20 g/L para os experimentos de crescimento celular (SCJ - L) ou 100 g/L para os experimentos de fermentação (SCJ - F). As células de leveduras foram cultivadas em frascos de 100 mL contendo 20 mL de meio SMG durante 24 h a 32°C com agitação a 120 rpm. As células

bacterianas foram cultivadas crescidas em frascos de 100 mL contendo 20 mL de meio MRS por 24 horas a 32°C com agitação a 120 rpm..

### **Experimentos de Crescimento**

Três diferentes condições de cultivo foram utilizadas para avaliar a influência dos metabolitos da levedura no crescimento bacteriano, como descrito a seguir.

- i) limitação de oxigênio (0 rpm) e baixa concentração de glicose: as células de levedura foram inoculadas em meio SMG ou SCJ - G para concentração inicial de D.O. (600 nm) de 0.1 e cultivadas a 32°C por 18 h (*S. cerevisiae*) ou 24 h (*D. bruxellensis*) sem agitação;
- ii) crescimento aerado em baixa concentração de glicose: as culturas como acima foram incubadas sob agitação orbital a 120 rpm;
- iii) limitação de oxigênio e alta concentração de glicose (fermentação): as células de leveduras foram inoculadas em meio SMF ou SCJ -F para uma concentração de D.O. (600 nm) de 10 e cultivadas a 32°C por 8 h (*S. cerevisiae*) ou 16 h (*D. bruxellensis*) sem agitação.

Ao fim de todas os cultivos, as culturas de leveduras foram centrifugadas a 5000 rpm durante cinco minutos à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram recolhidos, esterilizados em filtro 0,22 µm e armazenados até à sua utilização. Alíquotas foram retiradas para medições de metabólitos. O MRS concentrado duas vezes diluiu-se com o sobrenadante esterilizado por filtração das culturas das leveduras. As células bacterianas foram utilizadas para inocular em meio misto a uma concentração de D.O (600nm) de 0,1 e cultivada a 32°C na presença (120 rpm) ou ausência (0 rpm) de agitação. As amostras foram coletadas periodicamente para medições de absorção e as taxas de crescimento específico ( $\mu$ ) foram calculadas a partir da inclinação da fase de crescimento exponencial. Os resultados representam a média de três repetições ( $\pm$  Desvio Padrão). Na avaliação da influência de metabólitos bacterianos sobre o crescimento da levedura, as células de *L. vini* foram utilizadas para serem inoculadas em meio MRS e cultivadas a 32°C na presença (120 rpm) ou na ausência (0 rpm) de agitação durante 24 h . No final dos cultivos, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram recolhidos, esterilizados em filtros de 0,22 µm e armazenado até à sua utilização. Alíquotas foram retiradas para medições de metabólitos. O meio SMG dez vezes concentrado, diluiu-se co o sobrenadante esterilizado por filtração de culturas bacterianas. A glicose foi ajustada a 20 g/L. As células de levedura foram utilizadas para inocular em meio misto para uma concentração inicial de D.O. 0,1 e cultivada a 30°C sob agitação orbital a 120 rpm. As amostras foram coletadas periodicamente

para medidas de absorvância e a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada a partir da inclinação da fase de crescimento exponencial. Os resultados representam a média de três repetições ( $\pm$  Desvio Padrão).

### **Crescimento microbiano na presença de metabólitos inibitórios**

Experimentos de crescimento de bactérias ou leveduras foram realizados em meio MRS ou SMG, respectivamente, na presença de diferentes concentrações de etanol, ácido láctico e/ ou ácido acético adicionado ao meio. Sempre que necessário, o pH do meio foi ajustado com ácido sulfúrico para valores indicados nas Figuras. As células microbianas na fase de crescimento exponencial foram diluídas em MRS fresco ou meio SMG (com ou sem estresse) para concentração inicial de D.O. (600nm) de 0.1 em placas de microtitulação estéreis, para um volume final de 200  $\mu$ L cultivado em aparelho Synergy HT microincubator (BioTek, Swissland) a 30°C. As leituras de absorvância foram tomadas a cada dez minutos. As taxas específicas de crescimento ( $\mu$ ) foram calculadas com acima e mostrados como valores absolutos ou como uma porcentagem de inibição do crescimento microbiano: [ $\mu$  ( $h^{-1}$ ) na presença de inibidor /  $\mu$  ( $h^{-1}$ ) na ausência de inibidor]x100.

### **Análise dos metabólitos**

Açúcares, etanol, glicerol, ácido láctico e ácido acético foram determinados por HPLC (Waters Co., USA) acoplado com uma coluna de troca iônica HPX-87H (Biorad, EUA) aquecida a 60 ° C. O ácido sulfúrico a 5 mM foi usado como a fase móvel a 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

### **Resultados**

O efeito de metabólitos das leveduras sobre o crescimento de *L. vini* foi avaliado através da mistura dos sobrenadantes de culturas da levedura com meio MRS. Foram utilizados dois tipos de culturas de levedura. O primeiro consistiu no crescimento das leveduras em baixa densidade celular em meio sintético ou caldo de cana contendo baixos teores de sacarose e incubadas durante 18 h a *S.cerevisiae* e 24 h *D.bruxellensis* com ou sem agitação (Tabela 1).

Os rendimentos de etanol em culturas de crescimento de *S. cerevisiae* estavam na faixa de 0,41 g/g ( $\pm$  0,02), em ambos os meios. Por outro lado, os resultados da cultura de

crescimento de *D. bruxellensis* variou de 0,1 g/g ( $\pm 0,02$ ) no caldo de cana para 0,04 g/g de etanol ( $\pm 0,008$ ) em meio sintético de glicose, independentemente da agitação. O segundo tipo de cultura envolveu a alta densidade celular das leveduras em alto teor de açúcar em caldo e no meio sintético sob condições estáticas (Tabela 1). Nesta condição, o rendimento de etanol foi de 0,42 g/g ( $\pm 0,02$ ) para *S. cerevisiae* e 0,22 g/g ( $\pm 0,02$ ) para *D. bruxellensis*. O glicerol foi produzido apenas por *S. cerevisiae*, geralmente sob condições de fermentação (Tabela 1). Nenhum ácido acético foi detectado em todos os meios testados, e apenas uma pequena quantidade foi produzida por *D. bruxellensis* cultivada em caldo de cana, sob agitação. O pH do meio manteve-se acima de 5,0 em todas as condições testadas (Tabela 1). Com estas características, o sobrenadante das culturas de levedura foi misturado com meio MRS e utilizado para o crescimento bacteriano (Tabela 1).

Com estas características, o sobrenadante das culturas de leveduras foi misturado com meio MRS e usado para crescimento bacteriano (tabela 1). A taxa de crescimento bacteriano foi calculada como  $0,44 \text{ h}^{-1}$  ( $\pm 0,02$ ), quando MRS foi misturado com o sobrenadante de *S. cerevisiae* cultivadas em SMG, enquanto este valor foi reduzido para  $0,38 \text{ h}^{-1}$  ( $\pm 0,01$ ), com sobrenadante de cultivos caldo de cana. Esta redução foi menor para o sobrenadante *D. bruxellensis* em ambos os meios de crescimento e de fermentação. O etanol foi o metabolito mais significativo com atividade biocida produzido por *S. cerevisiae* quando comparado com *D. bruxellensis* e pode ser responsável pelo crescimento bacteriano reduzido (Tabela 1). Assim, testou-se a influência da sua adição exógena ao meio sobre o crescimento bacteriano (Figura 1). Praticamente nenhum efeito sobre a cinética do crescimento bacteriano foi observado quando o etanol foi adicionado na gama encontrada no sobrenadante de *D. bruxellensis* (Tabela 1; Figura 1). A taxa de crescimento de bactérias foi reduzida em 50 % quando a concentração de etanol no meio foi de 6 % (v/v) (Figura 1) na gama encontrada no sobrenadante de *S. cerevisiae* (Tabela 1) ou em processos industriais (De Souza Barros et al., 2012; . Pereira et al., 2012).

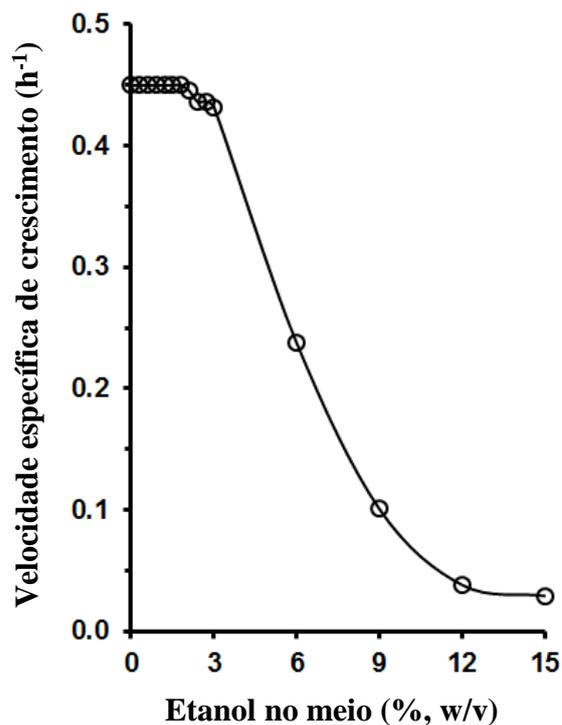
**Tabela 1.** Efeito dos metabólitos produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis* sobre o crescimento da bactéria *Lactobacillus vini*.

Leveduras	Parâmetros de cultivo das leveduras			Metabólitos no sobrenadante da cultura de levedura (g/L)						Crescimento de <i>L. vini</i> (h <sup>-1</sup> ) no meio misturado <sup>b</sup>		
	Condição	Agitação	Méio <sup>a</sup>	Sacarose	Glicose	Frutose	Etanol	Glicerol	Ác. Acético	pH	0 rpm	120 rpm
<i>S. cerevisiae</i>	Crescimento	0 rpm	SMG	0.00	0.00	0.00	8.00	1.3	0.00	5.71	0.47 ±0.033	
			SCJ	0.00	1.45	4.00	8.00	0.5	0.00	5.70	0.42 ±0.014	
	Fermentação	120 rpm	SMG	0.00	0.00	0.00	7.50	1.1	0.00	5.67	n.d. <sup>c</sup>	0.44 ±0.021
			SCJ	1.85	2.50	4.50	5.00	0.5	0.00	5.67		0.39 ±0.000
		0 rpm	SMF	0.00	1.50	0.00	48.7	2.8	0.00	5.48	0.42 ±0.014	0.40 ±0.006
			SCJ	1.00	0.60	10.0	44.0	2.4	0.00	5.55	0.39 ±0.014	0.37 ±0.016
<i>D. bruxellensis</i>	Crescimento	0 rpm	SMG	0.00	7.45	0.00	0.60	0.0	0.00	5.77	0.48 ±0.014	
			SCJ	1.00	4.80	8.90	1.25	0.0	0.00	5.77	0.44 ±0.006	
	Fermentação	120 rpm	SMG	0.00	3.70	0.00	0.60	0.0	0.00	5.75	n.d.	0.46 ±0.014
			SCJ	7.50	4.00	4.50	1.35	0.0	0.25	5.58	n.d.	0.42 ±0.001
		0 rpm	SMF	0.00	36.90	1.60	20.7	0.1	0.00	5.44	0.44 ±0.014	0.42 ±0.010
			SCJ	20.6	6.00	2.60	21.6	0.1	0.00	5.50	0.42 ±0.000	0.39 ±0.018

<sup>a</sup> SMG: meio sintético para crescimento da levedura; SMF: meio sintético para fermentação da levedura; SCJ: caldo da cana-de-açúcar

<sup>b</sup> 2x estéril MRS com filtro estéril de 0.22 µm foi diluído a 1x com sobrenadante das culturas das leveduras.

<sup>c</sup> não determinado



**Figura 1.** Efeito de diferentes concentrações de etanol adicionado ao meio MRS sobre crescimento de *Lactobacillus vini*.

Além disso, testou-se o efeito dos metabolitos produzidos por *L. vini* sobre o crescimento das leveduras. O sobrenadante dos diferentes períodos de crescimento bacteriano foi misturado com meio SMG concentrado e estes substratos mistos foram utilizados para o crescimento da levedura (Tabela 2). Quase nenhum efeito foi observado no crescimento da levedura, mesmo quando a quantidade de ácido orgânico obtido a partir do crescimento bacteriano excedeu 12 g/L nos meios mistos (Tabela 2). No entanto, a taxa de crescimento de *S. cerevisiae* foi reduzida em 46% e o crescimento de *D. bruxellensis* foi inibido quando esta alta concentração de ácido orgânico coincidiu com a queda no pH do meio a 4 (Tabela 2). Este problema foi superado com o ajuste do pH do meio para cinco com KOH, o que permitiu taxas normais de crescimento para ambas as leveduras ser re-estabelecido (Tabela 2). Uma vez que os valores de pKa para ácidos láctico e acético são 3,86 e 4,76, respectivamente, o efeito de diferentes concentrações de cada ácido orgânico foi testado ao ajustar o meio SMG para pH 4. Assim, tornaram-se protonado e prejudiciais. O ácido acético adicionado a concentrações acima 0,5 g/L inibiu completamente o crescimento tanto de

*S. cerevisiae* quanto de *D. bruxellensis* (Figura 2a). As leveduras foram mais tolerantes ao ácido láctico com concentrações de 0,7 e 1,0 g/L que reduziu o crescimento de *S. cerevisiae* e de *D. bruxellensis* para 80% e 50%, respectivamente. No entanto, o seu crescimento foi completamente inibido quando ácido láctico foi adicionado a 1,5 g/L (Figura 2b).

**Tabela 2.** Efeito dos metabolitos produzidos por *Lactobacillus vini* cultivada em meio MRS sobre o crescimento das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Dekkera bruxellensis*

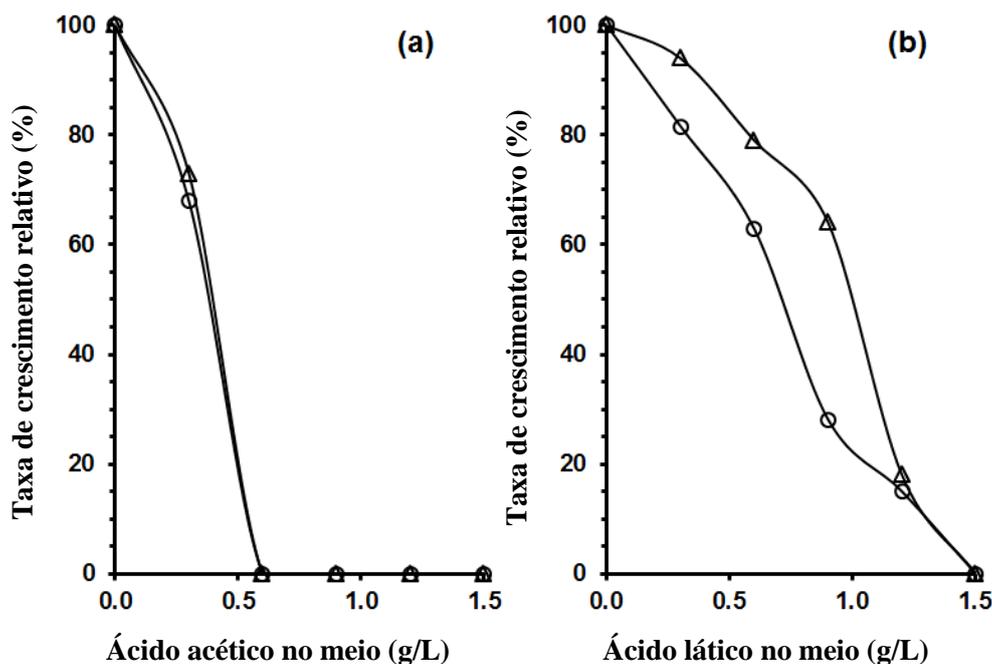
Crescimento de <i>L. vini</i> em MRS		Composição do sobrenadante da cultura bacteriana (g/L)			Crescimento da levedura em SM <sup>a</sup>		
Agitação (rpm)	Tempo da amostra (h)	Glicose	Ácido láctico	Ácido Acético <sup>b</sup>	pH	<i>S. cerevisiae</i> $\mu$ (h <sup>-1</sup> )	<i>D. bruxellensis</i> $\mu$ (h <sup>-1</sup> )
0	0	19.50	0.00	5.60	5.96	0.32 ±0.00	0.12 ±0.00
	6	15.56	5.40	7.00	5.25	0.33 ±0.02	0.13 ±0.01
	24	22.06 <sup>d</sup>	17.92	7.88	4.00	0.18 ±0.02	0.00
	24 <sup>c</sup>	20.20 <sup>d</sup>	19.20	7.70	5.40	0.30 ±0.01	0.13 ±0.00
120	0	19.60	0.00	5.40	5.96	0.38 ±0.00	0.12 ±0.00
	6	10.30	3.92	5.71	5.50	0.36 ±0.00	0.16 ±0.00
	24	21.30 <sup>d</sup>	15.25	6.60	4.00	0.28 ±0.01	0.00
	24 <sup>c</sup>	21.00 <sup>d</sup>	16.42	7.00	5.45	0.33 ±0.00	0.16 ±0.00

<sup>a</sup> O meio SM 10x estéril foi diluído a 1x com o sobrenadante das culturas de *L. vini* filtrados em membrana de 0.22  $\mu$ m.

<sup>b</sup> Concentração inicial de acetato em meio MRS foi de 5 g/L.

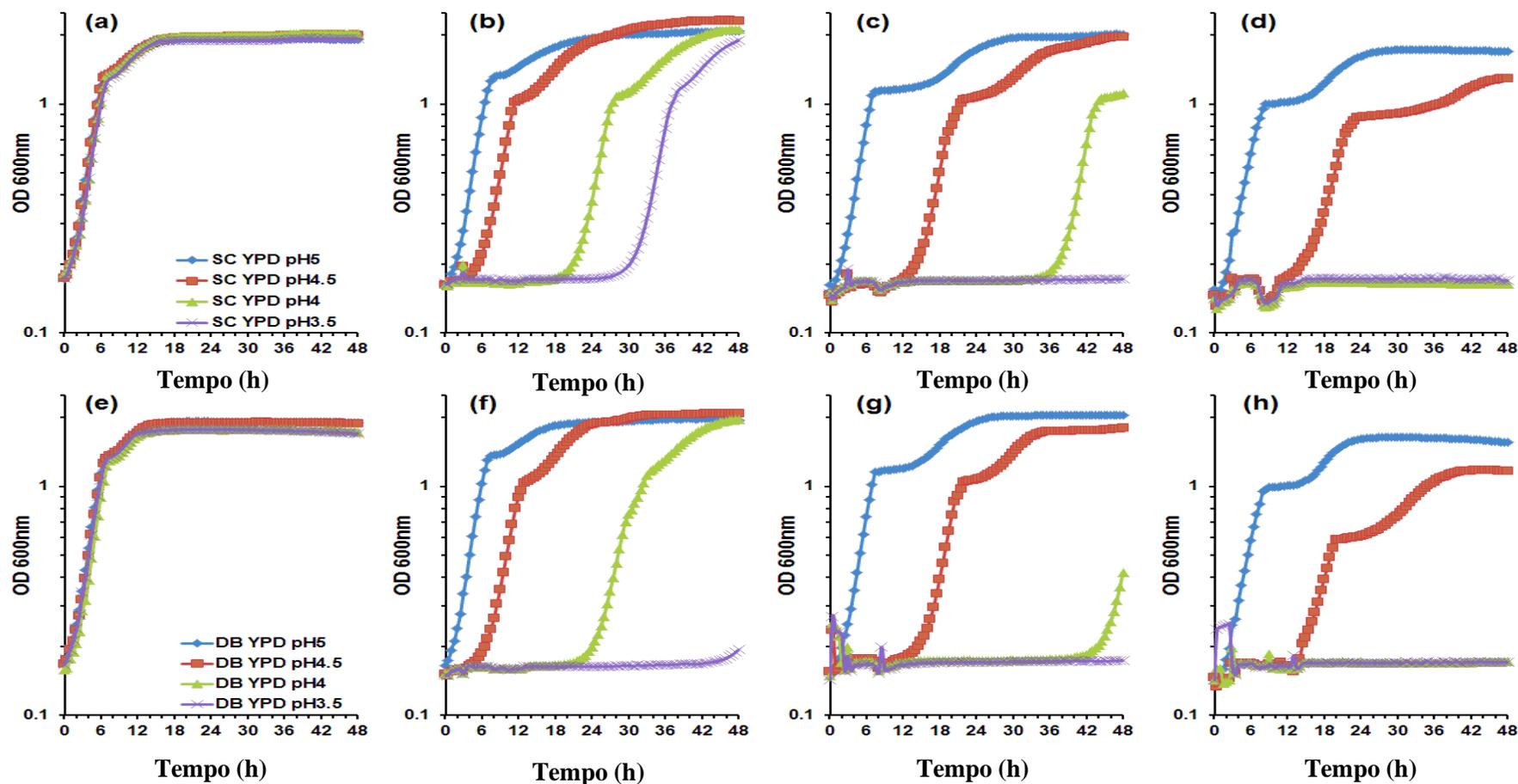
<sup>c</sup> o pH do sobrenadante foi elevado a 5.5 com KOH e esterilizado com filtro.

<sup>d</sup> sobrenadante do crescimento de *L. vini* (24 h) adicionado de 20 g/L de glicose.



**Figura 2.** Efeito das diferentes concentrações de a) ácido acético e b) ácido láctico adicionado ao meio com glicose sobre o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (o) e *Dekkera bruxellensis*(Δ) em meio com pH 4.

Em seguida, a influência do pH no meio sobre a cinética de crescimento das leveduras foi determinado utilizando uma concentração de ácido láctico e ácido acético com um efeito de morte (Figura 3). O pH do meio foi ajustado com ácido sulfúrico que é semelhante ao que é utilizado pelas destilarias. Inicialmente não houve diferença na taxa de crescimento entre o meio ajustado a pH 5 (0,01 mM H<sup>+</sup>) e pH 3,5 (1 mM de H<sup>+</sup>), assim a possibilidade de interferência no crescimento da levedura através da presença de ácido sulfúrico no meio foi rejeitada (Figura 3a e 3e). Em meio de pH 4, a presença de ácido láctico estendeu a fase lag da cultura de leveduras para mais de 18h, o que sugere que, mesmo a este pH, o teor de ácido láctico protonado é suficiente para inibir o crescimento de células transitoriamente (Figura 3b e 3f). Diminuindo o pH do meio abaixo do pKa ampliou ainda mais a fase de latência de *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* inibiu o crescimento (Figura 3b e 3f). Um quadro semelhante foi observado quando ácido acético foi adicionado ao pH do meio ajustado para 4,5, ligeiramente abaixo do seu pKa de 4,76, e estendido a fase de retardamento de mais de 12 h (Figura 3c e 3g). No meio de pH 4, as células de leveduras levaram um longo tempo para se adaptar e retomar o crescimento (Figura 3c e 3g). Por fim, o crescimento da levedura foi completamente inibida quando ambos os ácidos estavam presentes no meio ajustado a um pH 4,0 (Figura 3d e 3h), como foi observado no sobrenadante de culturas bacterianas (Tabela 2).



**Figura 3.** Cinética do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (painéis superiores) e *Dekkera bruxellensis* (painéis inferiores) em meio YPD contendo 2% (w/v) de ácido láctico (painéis b e f), 0,8 % (w/v) ácido acético (painéis c e g) e uma mistura de ambos ácidos (painéis d e h). O pH do meio foi ajustado com ácido sulfúrico para diferentes valores iniciais. Os símbolos foram coloridos de acordo e discriminados nos painéis (a) e (d).

## Discussão

Neste trabalho nós mostramos que a taxa de crescimento *L. vini* em meio MRS foi reduzida em 50% quando o etanol foi acrescentado ao meio na concentração de 6% (v/v). Esta é a concentração média de etanol observada nos processos industriais no Brasil, quando o caldo de cana é utilizado como um substrato (Pereira et al., 2012). Em vários processos, quando bem operados, pode chegar a 8% (v/v) ou até raramente a 10% (v/v) nos processos de fermentação para alto teor alcoólico. Existem alguns relatos que fornecem provas que bactérias láticas são tolerantes e podem crescer na presença de etanol a 16% (Gold et al., 1992). Na descrição do genoma *L. vini* foi reportado que esta bactéria pode tolerar até 10% (v/v) de etanol (Lucena et al., 2012). O termo tolerância é geralmente usado para definir se deve ou não um microrganismo crescer ou permanecer viável na presença de um agente físico ou químico. No caso deste trabalho, que têm demonstrado que, apesar da tolerância das células bacterianas para o inibidor, a taxa de crescimento caiu e isso pode afetar a capacidade das bactérias em competir com *S. cerevisiae* no ambiente industrial.

As células bacterianas restantes podem crescer novamente uma vez que há um declínio na concentração de etanol. O que é que leva a diminuição de etanol no processo? As médias de rendimentos industriais são frequentemente calculadas como 0,45 g/g (89% de eficiência máxima) e podem ser reduzidas para 0,39 g/g quando a população de *D. bruxellensis* supera e iguala a de *S. cerevisiae* (De Souza et al., 2012). Assumindo uma média de 120 g de sacarose/L no caldo de cana diluído, isto representa uma queda de 5,5% para 4,6%, em termos do conteúdo em etanol e trabalho em favor do crescimento bacteriano se a população de *D. bruxellensis* aumenta ainda mais ou permanece a um nível elevado por um longo tempo. Na concentração de 4,6% de etanol apenas o crescimento bacteriano apresentou alguma inibição, reduzido em 20% em relação ao meio sem etanol (Figura 1). Pode ser visto a partir dos dados da Tabela 1 que o crescimento bacteriano não foi afetado pelo sobrenadante de *D. bruxellensis* tal qual observado quando se utilizou o sobrenadante de *S. cerevisiae*. Assim, o aumento na contagem de células *L. vini* no processo industrial no Brasil descrito por Lucena e colaboradores (2010) e alta contagem desta bactéria encontrada em uma destilaria na

Suécia (Passoth et al., 2007; Tiukova et al., 2014). Poderia ser o resultado de uma queda na concentração de etanol no mosto causado por um aumento na população de *D. bruxellensis*.

Uma vez que a população de células *L. vini* é deixada a crescer e ainda dominar a população bacteriana no processo industrial (Lucena et al., 2010) como resultado de uma redução na quantidade de etanol, este microrganismo pode ter um efeito adverso sobre o crescimento e fisiologia das leveduras. O ácido láctico, e ácido acético a um menor grau, é o principal produto do metabolismo de espécies de bactérias lácticas (Beckner et al., 2011). Tem sido demonstrado que os ácidos acético e láctico inibem o crescimento de *S. cerevisiae*, mas esta inibição é uma função do pH do meio, a capacidade de tamponamento do meio e a quantidade total de ácido orgânico adicionado (Thomas et al., 2002). Os valores de pKa dos ácidos láctico e acético são 3,86 e 4,76, respectivamente, o que significa que abaixo destes valores de pH, os ácidos tornam-se protonados e podem entrar nas células de levedura por difusão (Neelekantam et al., 2005). Assim, grande parte das moléculas de ácido acético e uma parte de ácido láctico são protonados no pH 4. Uma vez no interior das células, e em um pH de 6,8 citosólico, os ácidos se dissociam e os prótons são expulsos por bombas H<sup>+</sup> e os ânions são removidos por bombas de extrusão como Pdr12p (Schnurer e Magnusson 2005; Beckner et al., 2011). Ambos os mecanismos necessitam de energia e aumentar a exigência de ATP para manutenção, deixando menos ATP para o crescimento celular (Pampulha e Loureiro-Dias, 2000).

Além disso, a acidificação citoplasmática poderia ter outros efeitos deletérios sobre os sistemas biológicos (Holyoak et al., 1996; Pampulha e Loureiro-Dias, 2000). Assim, a magnitude de inibição do crescimento de *S. cerevisiae* é uma função da concentração total dos ácidos orgânicos na forma protonada no meio (Thomas et al., 2002).

Inicialmente, mostrou-se que o uso de ácido sulfúrico para ajustar o pH do meio não afetou o crescimento de leveduras, uma vez que ambas as estirpes cresceram a pH 3.5 (semelhante ao pH 5) se nenhum ácido orgânico fraco estava presente (Figura 3ae). Melo e colaboradores (2010) mostraram que a linhagem *S. cerevisiae* JP1 pode crescer com interferência mínima no meio YPD ajustada para pH 2 com ácido sulfúrico.

Existe também uma indicação de que *D. bruxellensis* é tolerante a ambientes ácidos (Skinner e Leathers, 2004).

O ácido láctico começa a produzir efeito inibidor do crescimento das leveduras quando o pH do meio atinge o valor 4 (Figura 3b e 3f), que é um pouco maior do que seu valor pKa de 3,86. Isto sugere que, mesmo neste pH, a quantidade de ácido láctico protonada é suficiente para inibir o crescimento de células transientemente. Este fenômeno tem sido observado por outros autores (Abbott et al., 2004; Graves et al., 2006; Narendranath et al., 2001a; Pampulha e Loureiro-Dias, 2000; Thomas et al., 2001). Reduzir o pH do meio abaixo do pKa ampliou ainda mais a fase de latência de *S. cerevisiae* inibiu o crescimento de *D. bruxellensis* (Figura 3bf). Thomas e colaboradores (2002) relataram a estimulação do crescimento de *S. cerevisiae* na presença de ácido láctico a um pH 4,5, enquanto Abbot e colaboradores (2004) mostraram que *S. cerevisiae* cresce melhor do que *D. bruxellensis* em purê de milho contendo ácido láctico, bem como sob o estresse de ácido acético. Nós confirmamos esse resultado, mostrando que *S. cerevisiae* ainda pode crescer a pH 3,5, mas não *D. bruxellensis* em 2% de ácido láctico no meio YPD (Figura 3bf) o qual também tem um efeito tamponante devido ao extrato de levedura similar ao liquor de milho (Thomas et al., 2001).

Uma redução significativa no crescimento das leveduras foi observada se o ácido acético foi adicionado ao meio previamente ajustado para pH 4,5 (Figura 3c e 3g), ligeiramente inferior ao seu pKa de 4,76 como relatado anteriormente (Abbott et al., 2004; Graves et al., 2006; Narendranath et al., 2001a; Pampulha e Loureiro - Dias de 2000; Thomas et al., 2001). E não foi observado qualquer crescimento para ambas as leveduras do pH de 3.5 na presença de ácido acético (Figura 3c e 3g). Finalmente, o efeito sinérgico dos ácidos acético e láctico foi avaliado, uma vez que podem ser produzidos pelo metabolismo de fermentação de *L. vini* (Tabela 2) e também por *D. bruxellensis* (De Souza Barros et al., 2012; Leite et al., 2012; Pereira et al., 2014). A presença de ambos os ácidos orgânicos foram reportados reduzir a concentração de células viáveis de leveduras na fermentação em batelada de caldo de cana, enquanto as células remanescentes iniciaram o crescimento novamente após a remoção dos inibidores (Pereira et al., 2012). O crescimento das leveduras foi completamente inibido quando ambos os ácidos estavam presentes no meio o qual tinha um pH ajustado para

4,0 (Figura 3d e 3h), da mesma maneira como foi observado no sobrenadante de 24 h da cultura bacteriana para *D. bruxellensis* (Tabela 2). Assim, a alta contagem da população bacteriana no processo, acarretará maior produção de seus ácidos orgânicos atuando nas células de levedura.

Durante o processo de fermentação, o pH no mosto diminui para 3,5 quando o caldo de cana é utilizado como um substrato, mas se mantém acima de 4,5 em melão devido as propriedades tamponante dos seus componentes (Pereira et al., 2014). Em vista disso, a atividade inibidora dos ácidos orgânicos produzidos por *L. vini* é mais significativo na indústria com caldo de cana. Sabe-se que as taxas de produção de etanol específico caem como resultado da ação do ácido acético sobre as linhagens de leveduras industriais (Garay -Arroyo et al., 2004). O ácido láctico e acético atuando sinergicamente reduzem a síntese de etanol e a quantidade final de etanol produzido por *S. cerevisiae*, e este efeito inibitório pode ser desencadeado pelo aumento na temperatura (Graves et al., 2007). Os resultados deste trabalho sugerem que os ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias presentes no processo de fermentação pode afetar o crescimento da *S. cerevisiae*. Ao mesmo tempo, a produção desses ácidos deve manter o crescimento da população de *D. bruxellensis* sob controle. Este pressuposto está de acordo com o recente artigo que mostra que as bactérias heterofermentativas são mais prejudiciais as leveduras do que células homofermentativas (Basso et al., 2014). Apesar de *L. vini* ser considerada homofermentativa (Rodas et al 2006) foi observada uma pequena produção de ácido acético quando as culturas atingiram alta densidade celular (tabela 2). Se o efeito destes ácidos orgânicos é diminuído, por exemplo, aumentando-se o pH do meio, a população de *S. cerevisiae* vai aumentar a produção de etanol suficiente para manter a população de *L. vini* sob controle. Esta dependência do pH do meio pode explicar a falta de influência negativa de *L. vini* sobre a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* que relataram anteriormente (De Souza et al. 2012). Por outro lado, se qualquer alteração no processo de fermentação permite o crescimento de *D. bruxellensis*, poderia levar a uma queda na produção de etanol reduzindo a pressão seletiva sobre as células de *L. vini*, e levar a um aumento da sua população e a associação observada destes dois microrganismos (Lucena et al., 2010). Isto resulta na

produção de ácido láctico e ácido acético, o que irá inicialmente afetar *D. bruxellensis* e depois de *S. cerevisiae*, e assim, reiniciar o ciclo ecológico.

Assim, embora a explicação para a interação ecológica entre os microrganismos não seja simples, e não pode ser reduzida de forma simplista a dois ou três componentes do ambiente industrial, os resultados deste trabalho, pelo menos, mostra uma característica relevante desta interação. Os experimentos que devem levar em conta outras variáveis, e assim, proporcionar uma visão completa da ecologia microbiana no processo de etanol combustível industrial.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi patrocinado pela Rede de Pesquisa em Bioetanol do Estado de Pernambuco (CNPq-FACEPE/ Programa PRONEM (CNPq - FACEPE/ programa PRONEM , No. APQ - 1452-2,01/ 10) a partir da agência de financiamento FACEPE. Os autores também gostariam de expressar seus agradecimentos para as agências FACEPE e CNPq pelo apoio a bolsa de estudos fornecida.

### **Conflito de interesse**

Nenhum conflito de interesse.

### **Referências**

Abbott DA, Hynes SH, Ingledew WM (2004) Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 66: 641–647

De Barros Pita W, Leite FCB, Liberal ATD, Simões DA, de Morais Jr MA (2011) The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *Saccharomyces cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek* 100: 99–107

De Souza Barros R, Dos Santos BM, De Souza RFS, Da Silva PK, Lucena BT, de Morais Jr MA (2012) The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis*

as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 1645–1650

Basílio ACM, Araújo PRL, Morais JOF, Silva Filho EA, de Morais Jr MA, Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol* 56: 322–326

Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, De Amorim HV, Eggleston G, Basso LC (2014) Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 169–177

Bayrock DP, Ingledew WM (2004) Inhibition of 405 yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *J Ind Microbiol Biot* 31: 362–368

Beckner M, Ivey ML, Phister TG (2011) Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* 53: 387–394

Blomqvist J, Eberhard T, Schnürer J, Passoth V (2010) Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 1487–1497

Galafassi S, Merico A, Pizza F, Hellborg L, Molinari F, Piškur J, Compagno C (2011) *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol* 38:1079–1088

Garay-Arroyo A, Covarrubias AA, Clark I, Nino I, Gossett G, Martinez A (2004) Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 63: 734–741

Gold RS, Meagher MM, Hutkins RW, Conway T (1992) Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. *J. Ind. Microbiol* 10: 45–54

Graves T, Narendranath NV, Dawson K, Power R (2006) Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 469–74

Graves T, Narendranath N, Dawson K, Power R (2007) Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33: 469–474

Leite FCB, Basso TO, De Barros Pita W, Gombert AK, Simões DA, de Morais Jr MA (2013) Quantitative aerobic physiology of the yeast *Dekkera bruxellensis*, a major contaminant in bioethanol production plants. *FEMS Yeast Res* 13: 34–43

Lucena BT, Dos Santos BM, Moreira JL, Moreira AP, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi, A, Thompson FL, de Morais Jr MA (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the

bioethanol process. *BMC Microbiology* 10: 298

Lucena BTL, Silva GGZ, Dos Santos, BM, Dias GM, Amaral GRS, Moreira APB, de Morais Jr MA, Dutilh BE, Edwards RA, Balbino V, Thompson CC, Thompson FL. 2012. Genome Sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. *J Bacteriol* 194: 3018

De Melo HF, Bonini BM, Thevelein J, 437 Simões DA, de Morais Jr MA (2010) Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *J Appl Microbiol* 109: 116–127

Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J Ind Microbiol Biotechnol* 26:171–177

Neelakantam V, Narendranath NV, Power R (2005) Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl Environ Microbiol* 71: 2239–2243

Pampulha ME, Loureiro-Dias MC (2000) Energetics of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 184: 69–72

Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* 73: 4354–4356

Pereira LF, Bassi APG, Avansini SH, Barbosa-Neto AG, Brasileiro BTRV, Ceccato-Antonini SR, de Morais Jr MA (2012) 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* 101: 529-39

Pereira LF, Lucatti E, Basso LC, de Morais Jr MA (2014) The fermentation of sugarcane molasses by *Dekkera bruxellensis* and the mobilization of reserve carbohydrates. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105: 481-489

Rodas AM, Chenoll E, Macián MC, Ferrer S, Pardo I, Aznar R (2006) *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 513-517

Schnürer J, Magnusson J (2005) Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci Technol* 16: 70–78

Skinner KA, Leathers TD (2004) Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:401–408

Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM (2001) 468 Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Appl Environ Microbiol* 90: 819–828

Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM (2002) Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol* 68: 1616–1623

Tiukova I, Eberhard T, Passoth V (2014) Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* 61: 40-44

Uscanga MGA, Delia ML, Strehaiano P (2003) *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 61:157–162

## 5 ARTIGO 2

### Influência da suplementação do caldo e melão no crescimento de *L.vini*

André Ribas de Miranda<sup>1</sup>, Paula Katharina Nogueira da Silva<sup>1</sup> Marcos Antônio de Morais Jr<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Grupo de Pesquisa Interdepartamental em Engenharia Metabólica e <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.50670-901, Recife, Brasil.

#### Resumo

A contaminação microbiana é um problema em qualquer sistema de fermentação alcoólica industrial. Esses contaminantes podem reduzir a produtividade etanólica da fermentadora *Saccharomyces cerevisiae* levando a prejuízos na indústria. Nas destilarias de etanol no Brasil e Suécia tem se observado a prevalência de uma bactéria láctica resistindo a níveis altos de etanol, recentemente descrita como *Lactobacillus vini*. Esclarecer a prevalência dessa bactéria nas dornas de fermentação pode auxiliar a um controle maior do processo. Nas dornas de fermentação além dos aspectos físicos envolvidos como pH e temperatura, o aspecto nutricional é importante para o crescimento populacional da microbiota. Neste trabalho avaliamos o crescimento de *L. vini* nos meios industriais de caldo e melão de cana-de-açúcar com e sem suplementação nutricional. Inicialmente foi observado que esta bactéria apresenta maior produção de biomassa em caldo do que em melão. Houve um aumento na biomassa bacteriana quando estes meios foram suplementados com peptona (10 g/L), indicando a deficiência em nitrogênio destes meios. Aumento ainda maior foi observado quando foi utilizado extrato de levedura (5 g/L), indicando a carência de vitaminas nestes meios.. Em função deste último resultado, adicionamos o lisado celular de *S. cerevisiae* ao caldo de cana e ao melão. Isto possibilitou o aumento na população de *L. vini* nos meios industriais aos níveis observados quando se utilizou a suplementação com extrato de levedura comercial. Estes resultados indicam que a morte das células de levedura durante os ciclos do processo fermentativo industrial pode contribuir para o aumento populacional de *L. vini* naquele ambiente.

**palavras chave:** *Lactobacillus vini*, caldo de cana-de-açúcar, melão de cana-de-açúcar, contaminação microbiana.

## Introdução

O etanol combustível é produzido no Brasil a partir dos açúcares provenientes da cana-de-açúcar, diretamente a partir da fermentação do caldo ou a partir do melaço que é o subproduto da produção de açúcar comercial. Apesar da utilização cada vez mais frequente de linhagens comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, o processo apresenta muitos microrganismos contaminantes, principalmente bactérias lácticas, que podem competir por nutrientes essenciais e produzir ácidos orgânicos prejudicando o rendimento e produtividade etanólica de *S. cerevisiae* (Beckner et al., 2011; Lucena et al., 2010; Skinner e Leathers, 2004). Dentre as bactérias lácticas, a espécie *Lactobacillus vini* tem sido encontrada em processos industriais tanto no Brasil, por vezes em episódios associados com o aparecimento da levedura contaminante *Dekkera bruxellensis* (Passoth et al 2007; Lucena et al 2010). A relação entre esses microrganismos ainda não está bem estabelecida, mas existem evidências de que a presença de *L. vini* não parece afetar a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* (De Barros Souza et al 2012). Por outro lado, dados recentes de nossos estudos revelam que a produção de ácidos orgânicos por *L. vini* afeta o crescimento das leveduras de *S. cerevisiae* (dados não publicados). Isto sim prejudicaria o processo industrial na medida em que a presença de *L. vini* poderia inibir a reposição da população de *S. cerevisiae* ao longo dos ciclos industriais. Fatores físico-químicos e nutricionais influenciam a dinâmica populacional dos microrganismos nas destilarias de etanol, dos quais destacam-se temperatura, pH do meio, presença de compostos inibitórios, potencial redox gerado por moléculas oxidante ou redutoras e a , macro e micronutrientes e a disponibilidade de fatores de crescimento (Hayek e Ibrahim, 2013). Caldo e melaço de cana apresentam em sua constituição um alto teor de açúcar, principalmente a sacarose, que corresponde de 70 a 91% das substâncias sólidas solúveis. O caldo conserva todos os nutrientes da cana, porém apresenta algumas deficiências nutricionais como o baixo nível proteico e de fatores de crescimento, mas contém quantidades de minerais (3% a

5% como cinzas) tais como ferro, cálcio, zinco, manganês, cobre, potássio, fósforo e magnésio, adequados ao crescimento microbiano, além de ceras e graxas (0,05 a 0,015%). O melão ainda apresenta esses minerais em excesso e compostos orgânicos que podem inibir o crescimento microbiano como furfurais. É nesse cenário nutricional que os microrganismos devem se desenvolver e por vezes se suplantarem nas contagens celulares, o que suscita a capacidade de crescimento nas limitações apresentadas.

Em geral, as bactérias lácticas são consideradas microrganismos fastidiosos, pois requerem que diferentes substratos estejam disponíveis no meio de cultura para seu desenvolvimento. E a despeito do fato de que *L. vini* pode atingir altas concentrações celulares no ambiente da fermentação alcoólica industrial (Passoth et al 2007; Lucena et al 2010), nossos resultados recentes mostram a sua baixa capacidade de crescimento nos meios industriais (dados não publicados). Contudo, o crescimento celular foi restaurado quando o caldo de cana foi diluído para sua concentração de uso na indústria com meio de cultura comercial MRS (dados não publicados). Este meio contém diferentes fontes de nitrogênio fornecidas pela peptona e pelos extrato de carne e extrato de levedura que pode chegar a 22 g/L, além de polisorbato 80 que serve para produção de ácido oleico, conhecido como estimulante do crescimento de bactérias lácticas (Zacharof et al., 2009; Li et al., 2011), minerais que tem um efeito especial para atividade enzimática (Foucad et al., 1997) e vitaminas, principalmente do complexo B, presentes no extrato de levedura, entre elas ácido pantotênico, riboflavina e a niacina que são essenciais para maioria das cepas das bactérias lácticas (Letort e Juillard, 2001; Foucad et al., 1997). Com base nos dados industriais e de laboratório descritos, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação dos meios industriais sobre a taxa específica de crescimento de *Lactobacillus vini* afin de identificar os fatores que promovem esse crescimento celular no meio industrial e a sua relação ecológica com *D.bruxellensis* e *S.cerevisiae*.

## **Materiais e Métodos**

### **Linhagem e meio utilizado**

A linhagem industrial bacteriana *L. vini* JP 789 (Lucena et al., 2010) foi utilizada para o experimento e mantida em meio MRS contendo 20 g l<sup>-1</sup> de agar. O caldo e melaço de cana foram fornecidos pela Destilaria Miriri Agroindustrial (Santa Rita, PB). O caldo foi centrifugado a 5000 rpm por cinco minutos para remover a suspensão de sólidos, diluída com água destilada até o açúcar total de 100 g/L para o crescimento celular ou para a fermentação. A suplementação do caldo ou melaço foi realizada com peptona 10 g l<sup>-1</sup>, extrato de levedura 5 g l<sup>-1</sup>, extrato de carne 10 g l<sup>-1</sup>, polisorbato 80 10 g l<sup>-1</sup>, citrato de amônia 5 g l<sup>-1</sup> ou um mistura de vitaminas (D-biotina 0,05 g l<sup>-1</sup>, ác.pantotênico 1 g l<sup>-1</sup>, ác.nicotínico 1 g l<sup>-1</sup>, mio-inositol 25g l<sup>-1</sup>, Tiamina hidrocloreto 1g l<sup>-1</sup>, Piridoxal hidrocloreto 1g l<sup>-1</sup>, ác. p-aminobenzóico 0,20g l<sup>-1</sup>). Alternativamente, o extrato celular da biomassa de *S. cerevisiae* foi utilizado para suplementar o caldo ou melaço de cana. Para isso, as células de levedura da linhagem JP1 foram cultivadas em meio YPD até a fase estacionária e coletadas por centrifugação. A biomassa úmida foi lisada pela adição de nitrogênio líquido e pérolas de vidro (475-600 µm de diâmetro) seguido de agitação em vórtex. O lisado foi misturado com um pouco do meio industrial, a mistura filtrada em membrana de 0.22 µm, e em seguida adicionado ao restante do meio industrial previamente esterilizado. A adição do lisado celular foi feito de forma que mimetizasse a mistura de células intactas de levedurs ao meio industrial para a concentração de 5 g l<sup>-1</sup>.

### **Crescimento de *L. vini***

As células de *L. vini* foram cultivadas em meio MRS por 16 h e usadas para inocular os meios industriais de caldo de cana ou melaço, com e sem a adição dos suplementos, para a D.O. (600nm) inicial de 0,1 no volume total de 1 ml. Os cultivos de *L. vini* foram realizados em placas do tipo FlowerPlates seladas com filme permeável em equipamento Biolector NA® (m2p-labs, Alemanha) a 32°C com umidade constante de 85% e velocidade de 800 rpm (equivalente a 250 rpm de incubadoras tipo shaker orbital). Os cultivos foram realizados em anaerobiose com injeção de nitrogênio a 0,5 vvm. As leituras em laser de variação de sólidos em suspensão foram realizadas a cada 20 minutos e os valores de dispersão da luz foram transformados em densidade óptica a partir do fator de calibração definido no laboratório para suspensão de células de *L. vini*.

## Resultados e Discussão

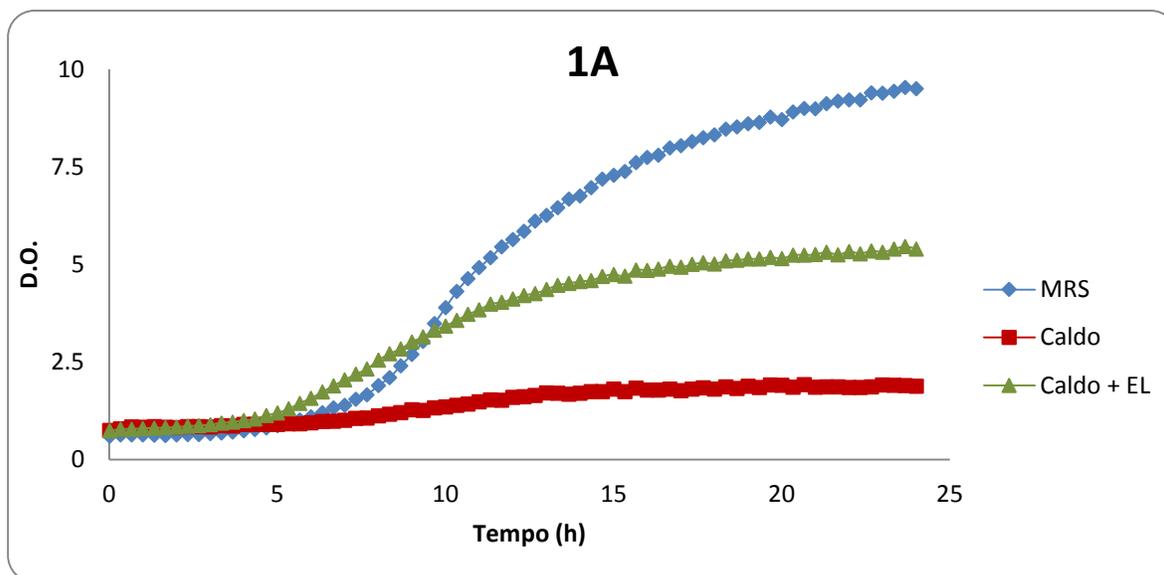
O perfil do crescimento de *L. vini* foi analisado medindo a variação da densidade óptica em diferentes meios de caldo e melão de cana-de-açúcar com e sem suplemento nutricional, comparando-o com o crescimento obtido no meio MRS. Nos meios industriais o crescimento celular foi muito pequeno no caso do caldo de cana (Figura 1A) ou nenhum como no caso do melão (Figura 1B). O pH inicial do caldo de cana e do melão foram determinados como 5.25 e 5.20, respectivamente, o que mostra que esta ausência de crescimento de *L. vini* não se deveu a acidez do meio. As bactérias lácticas são conhecidas como bactérias fastidiosas por não crescerem em meio mineral simples (Hebert et al., 2004). Isto indica que, apesar de ricos em fontes de carbono e minerais (De Souza Barros et al., 2014), esses meios são desprovidos de nutrientes requeridos por essas bactérias. A concentração de nitrogênio assimilável varia entre amostras de caldo de cana de diferentes origens ou dependendo do período no qual a cana foi colhida (De Souza Barros et al 2014), o que limita o crescimento microbiano. Sabe-se que as bactérias lácticas têm capacidade limitada de sintetizar aminoácidos a partir de recursos de nitrogênio inorgânico (Whright e Axelsson, 2011). Além disso, peptídeos parecem ser essenciais para a estimulação do crescimento dessas bactérias (Letort e Julliard 2001; Tiukova et al., 2014). Desse modo, tanto o caldo como o melão foram suplementados com peptona. Esta suplementação promoveu crescimento celular nos dois meios, porém na metade da velocidade específica de crescimento ( $0.12 \text{ h}^{-1}$ ) daquela observada para o meio MRS ( $0.24 \text{ h}^{-1}$ ). A biomassa final alcançada com a suplementação também foi metade daquela obtida com o meio MRS (Figura 2A e 2B). Isto mostra que *L. vini* também requer fontes orgânicas de nitrogênio para crescimento. Resultados similares também foram alcançados com o uso de extrato de levedura comercial, utilizado como fonte de vitaminas e outros fatores de crescimento (Figura 1A e 1B). A suplementação apenas com extrato de carne só foi capaz de induzir o crescimento bacteriano no meio de caldo de cana (Figura 4A e 4B). A mesma D.O. final de crescimento bacteriano foi observado quando o pH do caldo ou melão

suplementados foi ajustado para 6.7, na faixa daquele observado para o meio MRS (pH 6.4).

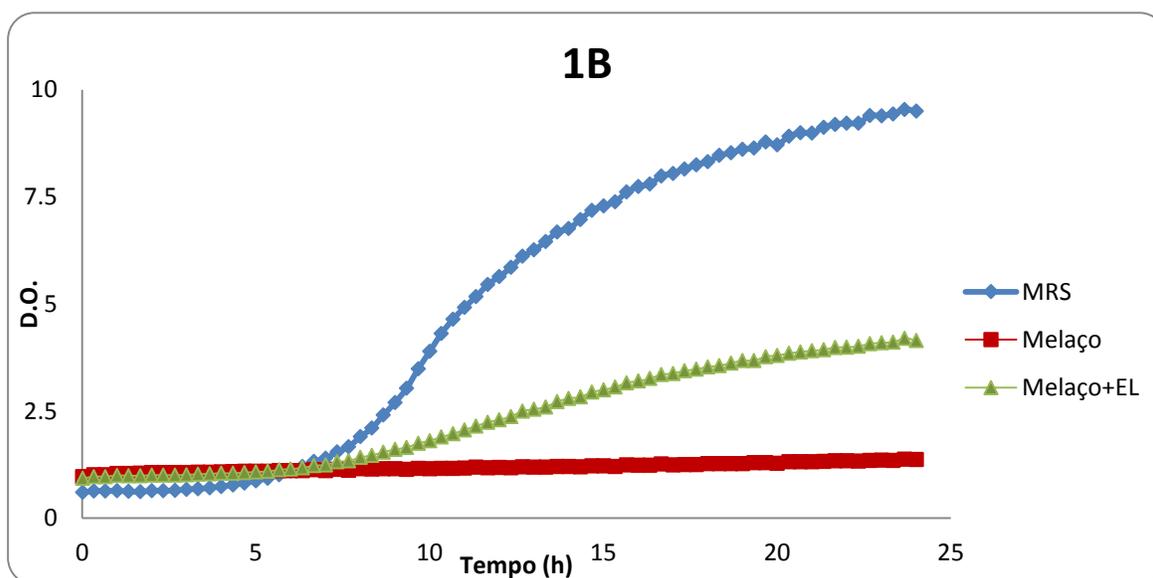
A mistura da fonte suplementar de nitrogênio na forma de peptona e da fonte de vitaminas suplementar, tanto na forma de extrato de levedura como na forma de uma mistura polivitamínica, não gerou efeito sinérgico em relação ao crescimento celular em meios com apenas um dos suplementos (Figura 2A e 2B). A mistura de extrato de carne com peptona gerou menor biomassa de *L. vini* em relação à mistura de extrato de levedura com peptona, tanto em caldo quanto em melaço (Figura 4A e 4B). A importância do extrato de levedura para o crescimento de Lactobacilos tem sido relatada na literatura. A substituição de metade da quantidade de extrato de levedura por extrato de malte ou de carne levou redução na produção da biomassa de *L. sakei* em relação ao meio contendo apenas extrato de levedura (Aasen et al., 2000); já a mistura de extrato de carne com caseína ou glúten não foi tão eficiente para o crescimento de *L. fermentum* como o extrato de levedura sozinho (Calderon et al., 2001). É possível que essas fontes de nitrogênio ainda não representem uma composição balanceada de aminoácidos que é requerida para propiciar crescimento bacteriano adequado (Lechiancole et al., 2002). No meio de melaço a suplementação com peptona e extrato de levedura foi mais eficaz que peptona e a solução polivitamínica (Figura 2B). Portanto, outros requerimentos nutricionais são necessários.

Tiukova et al (2014) mostraram que o extrato de levedura poderia ser substituído por uma mistura de ergosterol e Tween 80. Tween 80 (polisorbato) é incorporado pelas células para produção de ácido oleico que é incorporado à membrana celular, aumentando a fluidez da membrana e protegendo as células de fatores de estresse ambiental como variação de pH e temperatura e presença de oxigênio (Li et al., 2011). Neste trabalho o extrato de levedura foi substituído pela suplementação nutricional que incluía peptona, Tween 80 e solução polivitamínica, mas ainda assim a presença de extrato de levedura se mostrou mais importante para o crescimento tanto em caldo como em melaço (Figura 3A e 3B). A adição de todos os suplementos nutricionais no caldo ou no melaço não foi capaz de elevar o crescimento celular ao nível daquele observado no meio MRS.

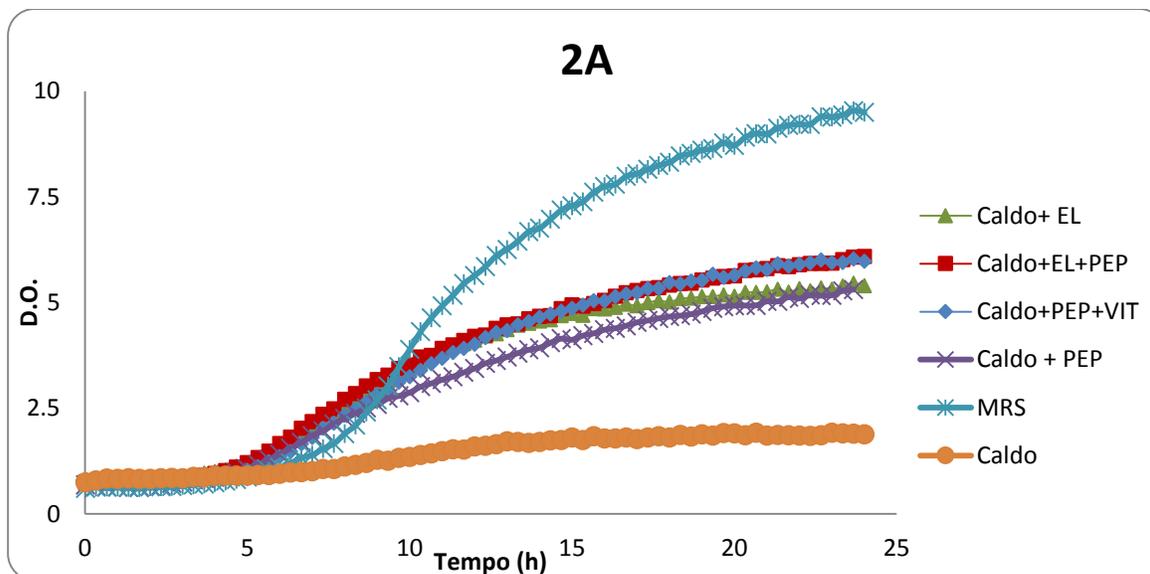
Embora não tenha havido complementação do crescimento celular no nível observado para o meio de cultura MRS, a presença de apenas extrato de levedura foi capaz de aumentar a produção de biomassa em mais de duas vezes em relação ao caldo de cana. Isto significa que a morte das células de leveduras e a liberação do conteúdo intracelular no meio industrial poderia induzir o crescimento microbiano, contribuindo para a instalação dos episódios de contaminação bacteriana do processo de fermentação nas destilarias de etanol. A biomassa de *S. cerevisiae* nas destilarias de etanol no Brasil é mantida em torno de 100 g de células/L, com recuperação de 90 a 95% das células durante os reciclos (Lima et al., 2001; Basso et al., 2011). Além disso, a morte celular de *S. cerevisiae* que pode ser ocasionada pela competição por nutrientes ou a presença de ácidos orgânicos pode levar a morte e lise celular. Para testar essa hipótese, o caldo de cana foi suplementado com o lisado de *S. cerevisiae* de forma a representar o conteúdo intracelular de 5% da biomassa inicial que é adicionado nas dornas de fermentação. Com isso, foi observada que a cultura de *L. vini* cresceu com este lisado celular (Figura 5) . Por outro lado, o crescimento celular foi muito menor ou quase nenhum em melão (Figura 5), mesmo na presença do lisado ou do extrato comercial de levedura. Isto poderia explicar o fato de *L. vini* não ter sido detectado em destilarias de álcool que utilizam esse substrato de fermentação (Lucena et al., 2010). A partir desses dados o presente trabalho pode contribuir para o entendimento das bases do crescimento celular e da instalação de episódios de contaminação dos processos industriais de produção de etanol por *L. vini* e possivelmente por outras bactérias lácticas.



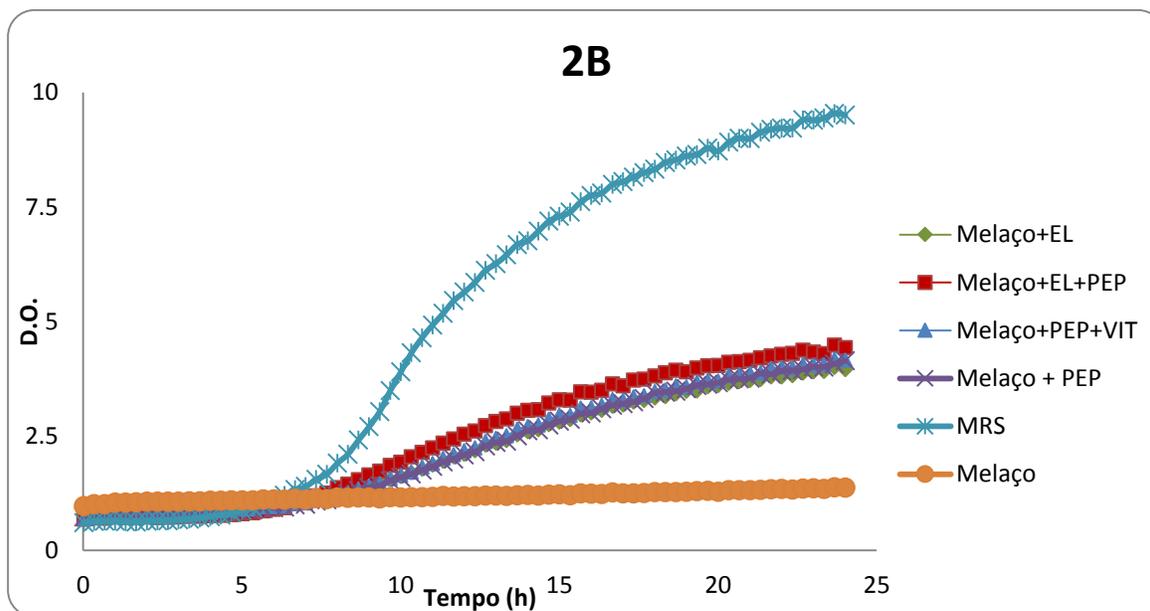
**Figura 1A.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul), caldo de cana (curva vermelha) e caldo de cana suplementado com extrato de levedura (curva verde).



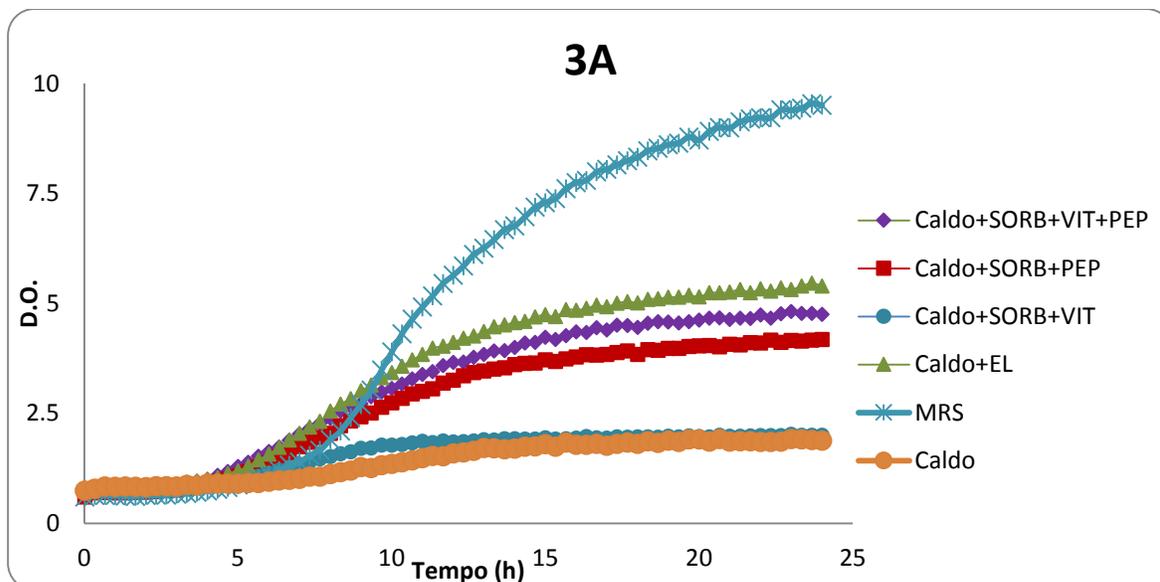
**Figura 1B.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul), melação (curva vermelha) e melação suplementada com extrato de levedura (curva verde).



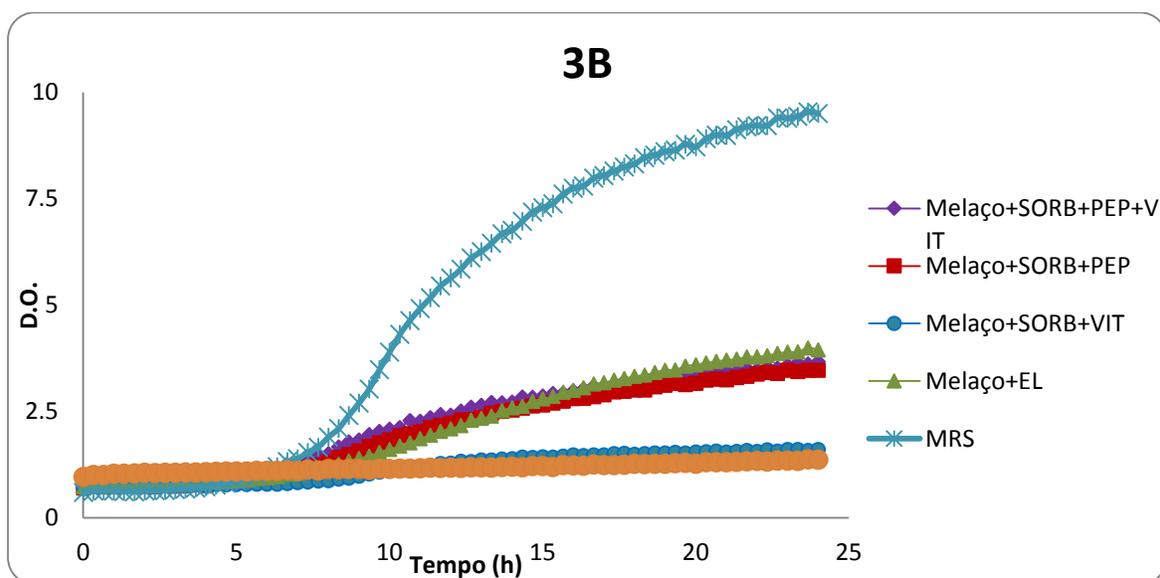
**Figura 2A.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), caldo de cana (curva laranja) e caldo de cana suplementado com extrato de levedura (curva verde), peptona (curva roxa), peptona e vitaminas (curva azul escuro) e extrato de levedura e peptona (curva vermelha).



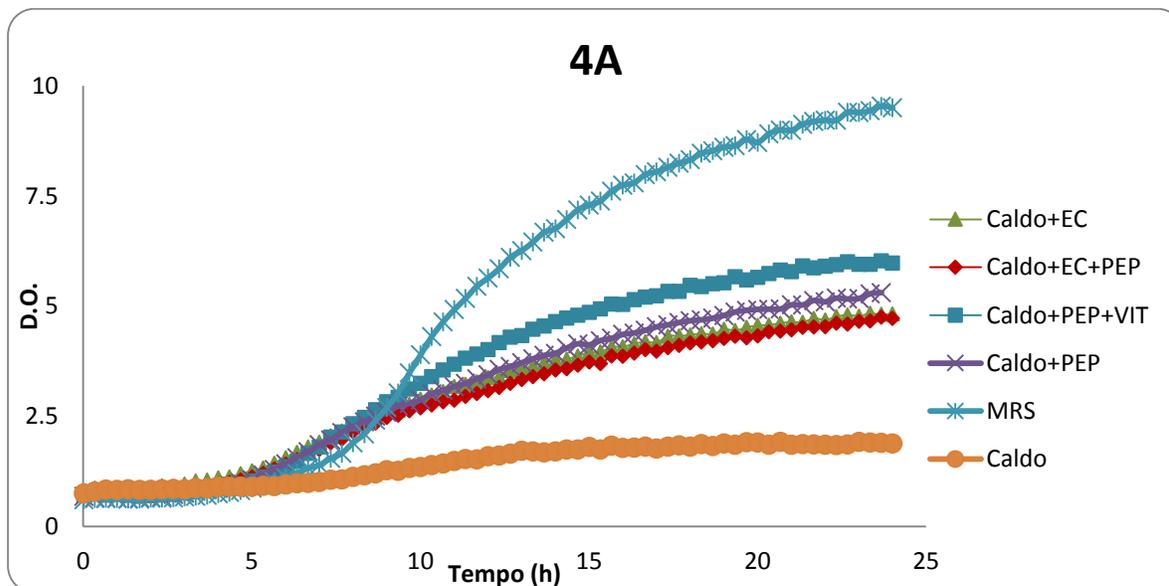
**Figura 2B.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), melaço (curva laranja) e melaço com extrato de levedura (curva verde), com extrato de levedura e peptona (curva vermelha), com peptona e vitamina (curva azul escuro) e com peptona (curva roxa).



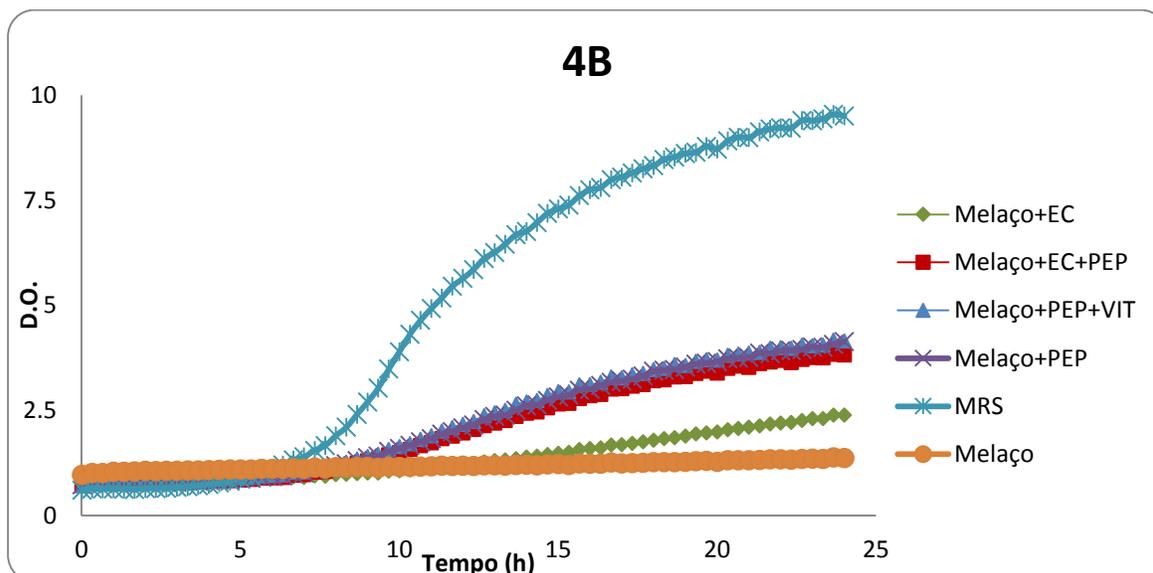
**Figura 3A.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), caldo de cana (curva laranja) e caldo com polisorbato, vitamina e peptona (curva roxa), polisorbato e peptona (curva vermelha), polisorbato e vitamina (curva azul petróleo) e extrato de levedura (curva verde).



**Figura 3B.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), melaço (laranja) e melaço com polisorbato, peptona e vitamina (curva roxa), polisorbato e peptona (curva vermelha), polisorbato e vitamina (curva azul) e extrato de levedura (curva verde).

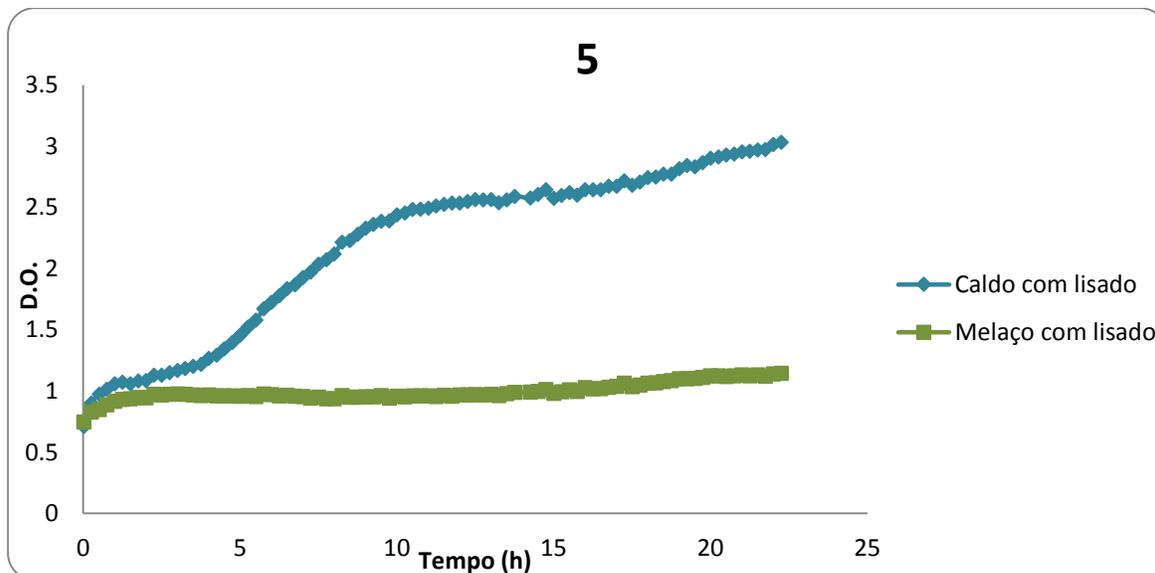


**Figura 4A.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), caldo de cana (curva laranja) e caldo de cana com extrato de carne (curva verde), extrato de carne e peptona (curva vermelha), peptona e vitamina (2x) (curva azul petróleo) e peptona (curva roxa).



**Figura 4B.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* nos meios MRS (curva azul claro), melaço (curva laranja) e melaço com extrato de carne (curva verde), extrato de

carne e peptona (curva vermelha), peptona e vitamina (curva azul escuro) e peptona (curva roxa).



**Figura 5.** Curvas de crescimento de *Lactobacillus vini* em caldo de cana ou melação suplementados com lisado de *Saccharomyces cerevisiae*.

## Referências

Aasen, I.M.; Moretro, T.; Katla, T.; Axelsson, L.; Storro, I. (2000) Influence of Complex Nutrients, Temperature and pH on Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687, Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, n. 2, p. 159-166.

Basso, L.C.; Basso, T.O.; Rocha, S.N. (2011) Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: ed. Bernardes MAS, Biofuel production—recent developments and prospects, p. 85–100.

Beckner, M.; Ivey, M.L.; Phister, T.G. (2011) Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. Lett Appl Microbiol v.53, p. 387–394.

Calderon, M.; Loiseau, G.; Guyot, J.P. (2001) Nutritional Requirements and Simplified Cultivation Medium to Study Growth and Energetics of a Sourdough Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 During Heterolactic Fermentation of Starch, Journal of Applied Microbiology v. 90, n. 4, p. 508-516.

De Souza, R. B., De Menezes, J. A. S., de Souza, R. D. F. R., Dutra, E. D., De Morais Jr, M. A. (2014). Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(1), 209-222.

De Souza Liberal, A.T.; Basílio, A.C.M.; Do Monte Resende, A.; Brasileiro, B.T.V.; Da Silva-Filho, E.A.; De Morais, J.O.F; Simoes, D.A.; Morais Jr, M.A. (2007). Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 538–547.

Foucaud, C.; Francois, A.; Richard, J. (1997) Development of a Chemically Defined Medium for the Growth of *Leuconostoc mesenteroides*, *Applied and Environmental Microbiology* v.63, p. 301-304.

Hayek, S.A.; Ibrahim, S.A. (2013) Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and nutrition Sciences*, v.4, p. 73-87.

Hébert, E.M.; Raya, R.R.; Giori, G.S. (2004) Nutritional Requirements of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* in a Chemically Defined Medium, *Current Microbiology*, v. 49, n. 5, p.341-345.

Lechiancole, T.; Ricciardi, A.; Parente, E. (2002) Optimization of Media and Fermentation Conditions for the Growth of *Lactobacillus sakei*, *Annals of Microbiology* v. 52, p. 257-274.

Letort, C.; Juillard, V. (2001) Development of a Minimal Chemically Defined Medium for the Exponential Growth of *Streptococcus thermophilus*, *Journal of Applied Microbiology* v. 91, n. 6, p. 1023-1029.

Li, J.Y.; Zhang, L.W.; Du, M.; Han, X.; Yi, H.X.; Guo, C.F.; Zhang, Y.C.; Luo, X.; Zhang, Y.H.; Shan, Y.J.; Hou, A.J. (2011) Effect of Tween Series on Growth and *cis*-9, *trans*-11 Conjugated Linoleic Acid Production of *Lactobacillus acidophilus* F0221 in the Presence of Bile Salts, *International Journal of Molecular Science* v. 12, n. 12, p. 9138-9154.

Lima, U.A.; Basso, L.C.; Amorim, H.V. (2001) Produção de etanol, in *Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. ed. Lima, U.A.; Aquarone, E., Borzani, W. e Schmidell, W. Edgard Blucher, São Paulo, v.3, p.1-43.

Lucena, B. T.; Dos Santos, B. M.; Moreira, J. L.; Moreira, A. P.; Nunes, A. C.; Azevedo, V.; Miyoshi, A.; Thompson, F. L.; de Morais, M. A. Jr. (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology* v. 10, p. 298.

Passoth, V., Blomqvist, J., Schnürer, J. (2007) *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl Environ Microbiol* v. 73, p. 4354–4356.

Skinner, K.A.; Leathers, T.D. (2004) Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* v.31, p.401–408

Tiukova, I.; Eberhard, T.; Passoth, V.(2014) Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Biochem* v.61,n.1, p. 40-4.

Von Wright, A.; Axelsson, L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction, In: S. Lahtinne, S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, Eds., *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, CRC Press, London, 1-17.

Zacharof, M.; Lovitt, R.; Ratanapongleka, K. (2009) Optimization of Growth Conditions for Intensive Propagation, Growth Development and Lactic Acid Production of Selected Strains of Lactobacilli, *Engineering Our Future: Are We up to the Challenge?* Burswood Entertainment Complex 27-30, 1830-1839.

## 6 Artigo 3

**Avaliação do potencial de assimilação açúcares da bactéria *Lactobacillus vini* a partir meios de cultivo sintéticos.**

Paula Kathanina Nogueira da Silva<sup>1</sup>, André Ribas de Miranda<sup>1</sup>, Michaela Kosová<sup>4</sup>, Šárka Horáčková<sup>4</sup>, Milada Plocková<sup>4</sup>, Brigida Thaís Luckwu de Lucena<sup>3</sup> & Marcos Antonio de Moraes Junior<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Grupo Interdepartamental de Pesquisa em Engenharia Metabólica e <sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, PE, Brasil. <sup>3</sup> Centro de Ciências Biológicas e Sociais Aplicadas, Universidade Estadual da Paraíba.

<sup>4</sup>Department of Dairy and Fat Technology, Institute of Chemical Technology in Prague.

## Resumo

A produção de etanol combustível em destilarias do nordeste brasileiro apresenta constantemente o seu rendimento em etanol comprometido pela presença de bactérias, como a *Lactobacillus vini*. Esta espécie foi recentemente identificada na produção de vinho e etanol. Este trabalho teve como objetivo avaliar a assimilação de diversos açúcares presentes nos diferentes substratos industriais nos quais esta bactéria está presente. A linhagem industrial *L. vini* JP 7.8.9, isolada de destilarias do Nordeste brasileiro, foi utilizada como modelo de estudo. Os ensaios de assimilação foram realizados utilizando o kit API 50 CHL, o que resultou em um perfil de assimilação de açúcares muito semelhante ao da linhagem tipo. Entretanto, a variabilidade fenotípica intraespecífica observada não permitiu a identificação de fatores que sugerissem adaptação a quaisquer dos tipos de substratos industriais, mas sugere a possibilidade de que estas variações sejam produto de uma diversidade genômica causada pela presença de elementos móveis identificados recentemente no sequenciamento de seu genoma. Ensaio de crescimento em anaerobiose em que houve variação das fontes de carbono e de nitrogênio mostraram que celobiose é um dissacarídeo facilmente metabolizado por esta espécie, fato que deve estar associado à presença de vários genes que codificam a enzima  $\beta$ -glicosidase e de transportadores do tipo PTS-celobiose em seu genoma. O presente estudo abre, portanto, importante perspectiva para o início da elucidação das características bioquímicas desta bactéria, ainda pouco conhecido, o que permite compreender como este microrganismo consegue se manter no processo de produção de etanol como contaminante, bem como, abre a perspectiva do emprego de *L. vini* na produção de metabólitos de alto valor agregado, como o ácido láctico, possibilitando ainda o melhoramento de suas habilidades industriais.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus vini*, assimilação de açúcar, metabolismo, celobiose, citrato, fermentação, lactato

## Introdução

No Brasil, a cana-de-açúcar é processada na grande maioria das destilarias de etanol sem prévio tratamento (Andrietta *et al.*, 2007). Estas condições assépticas dos substratos do processo (caldo de cana e/ou melaço) possibilitam uma série de contaminações por microrganismos indesejáveis, podendo ameaçar a estabilidade da população de *Saccharomyces cerevisiae* do processo e interferir no rendimento e produtividade da fermentação, gerando significativas quedas na produção de etanol (Skinner e Leathers 2004; Andrietta *et al.*, 2007; Lucena *et al.*, 2010; Beckner *et al.*, 2011). As bactérias lácticas (LAB) são os contaminantes bacterianos mais comumente encontrados na de produção de etanol (Beckner *et al.*, 2011). Dentre estas, o gênero *Lactobacillus sp.* geralmente é predominante (Lucena *et al.*, 2010; Beckner *et al.*, 2011), e isso se deve por estarem bem adaptados para a sobrevivência sob alta tolerância a etanol, baixo pH e condições de baixa concentração de oxigênio, encontrados durante a fermentação industrial (Beckner *et al.*, 2011).

Dentre a população de bactérias consideradas contaminantes do processo industrial, a espécie *Lactobacillus vini* tem sido frequentemente encontrada nas usinas do nordeste brasileiro (Lucena *et al.*, 2010). Essa espécie foi descrita recentemente, tendo sido encontrada em vinícolas da Espanha (Rodas *et al.*, 2005) e em destilarias de produção de etanol na Suécia (Passoth *et al.*, 2007). Esta é uma bactéria gram-positiva e de acordo com a linhagem descrita é homofermentativa para pentoses e tem a capacidade de fermentar diversos açúcares como: L-arabinose, D-glicose, D-frutose, D-manose, Celobiose, Sacarose, Maltose, Trealose e outros (Rodas *et al.*, 2006). As linhagens *Lactobacillus vini* LMG 23202 (Rodas *et al.* 2006) e a JP7.8.9 (Lucena *et al.*, 2010) foram sequenciadas e as análises genéticas identificaram a presença de genes envolvidos no metabolismo da celobiose, genes que codificam para a  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) (Lucena *et al.*, 2012). Isto abre uma importante perspectiva para o uso industrial desta bactéria que já está plenamente adaptada àquele ambiente.

Portanto, compreender a fisiologia, pouco conhecida de *L. vini* JP7.8.9, permite a elucidação das características bioquímicas deste microrganismo. Esse estudo abre a perspectiva do emprego de *L. vini* na produção de metabólitos de alto valor agregado, como o ácido láctico, investigando quais os nutrientes são preferivelmente assimilados.

## **Material e Métodos**

## **Microrganismos e condições de crescimento**

As linhagens industriais *Lactobacillus plantarum* 6A, isolada da destilaria Miriri, Santa Rita, PB (dados não publicados) e *L. vini* JP7.8.9 isolada da destilaria Japungú, Santa Rita, PB (Lucena *et al.*, 2010) foram cultivadas em meio MRS líquido (10 g/l peptona, 10g/l extrato de carne, 10 g/l extrato de levedura, 20 g/l glicose, 5 g/l acetato de sódio, 1 g/l Tween 80, 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2g/l Citrato de amônio, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.05 g/l MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O e pH ajustado para 6.2 a 25 °C), da Himedia Laboratórios (Mumbai, India) e mantidas a 37 °C por 24 horas, em condições estáticas (De Souza *et al.*, 2012).

## **Teste API 50 CHL**

A capacidade de assimilação dos carboidratos foi determinada utilizando o teste API 50 CHL, um sistema normalizado composto por 50 testes bioquímicos para o estudo do metabolismo de carboidratos por microrganismos (Bio Merieux, França), que contém meios específicos para a identificação de espécies de *Lactobacillus* e gêneros relacionados. O teste foi preparado de acordo com as instruções do fabricante (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). O sistema foi então incubado a uma temperatura de 37°C durante 48h em anaerobiose e as amostras foram analisadas com relação à assimilação dos carboidratos de acordo com a mudança de cor, gerada pela diferença do pH do meio. As espécies foram identificadas através da avaliação com software de identificação apiweb™.

## **Análise de assimilação dos açúcares e diferentes fontes de carbono e nitrogênio, e velocidade de crescimento celular**

Para os ensaios de variação de fonte de carbono e nitrogênio, o meio MRS foi reproduzido em laboratório a partir de seus componentes, segundo o fabricante (Himedia Laboratories),

alterando-se os tipos de açúcar a serem testados (glicose, frutose, sacarose, celobiose, maltose e lactose) na concentração de 20 g L<sup>-1</sup>. Três fontes de nitrogênio foram testados na composição, além do citrato de amônio, que já faz parte da composição do meio comercial: sulfato de amônio, nitrato de sódio e glutamato de sódio na concentração de 2 g L<sup>-1</sup>. Para os ensaios de assimilação e cinética de crescimento celular, as células pré-cultivadas em meio MRS e utilizadas para inocular os meios MRS-específicos para concentração inicial de D.O.(600nm) de 0,1 em volume total de 1 mL em placas do tipo FlowerPlates (mp2Lab, Alemanha). As placas foram seladas com filme permeável e as células foram cultivadas em microfermentador Biolector NA® (m2p-labs, Alemanha) a 37°C com umidade constante de 85% e velocidade de 800 rpm (equivalente a 250 rpm de incubadoras tipo shaker orbital). Os cultivos foram realizados em anaerobiose com injeção de nitrogênio ultrapuro a 0,5 vvm. As leituras em laser de variação de sólidos em suspensão foram realizadas a cada 20 minutos e os valores de *light scattering* foram transformados em densidade óptica a partir do fator de calibração definido no laboratório para suspensão de células de *L. vini*.

### **Ensaio de fermentação**

As células de bactérias cultivadas em meio MRS foram coletadas e re-suspensas para concentração celular inicial de 10% (m/v) nos diferentes meios MRS contendo glicose ou sacarose. As fermentações foram conduzidas em sistema de batelada simples sem agitação durante 8 horas à 33°C (De Barros Pita *et al.*, 2011, Pereira *et al.*, 2011, De Souza *et al.*, 2012). As amostras coletadas foram centrifugadas e o sobrenadante reservado para análise de consumo dos açúcares e produção de metabólitos conforme protocolo descrito abaixo. Todas as fermentações foram realizadas em triplicatas, e os resultados obtidos foram representados como médias simples ( $\pm$  desvio padrão).

### **Análise metabólica**

As amostras coletadas ao longo das incubações foram centrifugadas para coleta do sobrenadante para determinação da concentração do açúcar residual e dos metabólitos produzidos, por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamento Agilent

Technologies 1200 Series com a coluna modelo HPX87H (BioRad) em fase móvel de ácido sulfúrico a 5 mM, a 45°C. A identificação dos metabólitos foi feita por comparação dos tempos de retenção com soluções-padrão e a concentração de cada metabólito foi determinada por integração de picos do cromatograma e relação da área de cada pico com o fator de calibração de cada solução-padrão, através da metodologia de Zhao *et al* (2009) adaptada por De Souza *et al.*, 2012.

## Resultados e Discussões

### Teste API 50 CHL

O teste API 50 CHL (bioMérieux) é fundamentalmente utilizado para identificação de espécies de bactérias lácticas a partir de um painel com 49 diferentes fontes de carboidratos. Esse teste foi realizado sob as condições de 37°C durante 48 horas gerando um perfil de assimilação de carbonos pela linhagem industrial *L. vini* JP7.8.9 (Tabela 1).

O perfil dos açúcares fermentáveis pela linhagem de *L. vini* JP7.8.9, gerado através do teste API 50 CHL (Tabela 1), apresentou diferenças em cerca de 22% das 49 fontes de carbono testadas, em comparação com a linhagem tipo, Mont<sup>4</sup> (Rodas *et al.*, 2006). Essas diferenças foram encontradas na assimilação por *L. vini* JP7.8.9 de galactose, dulcitol, inositol, manitol,  $\alpha$ -metil manosido, arbutina, melibiose, melezitose, D-rafinoose, turanose e gluconato. Comparando outras linhagens de *L. vini* também é possível observar diferenças no perfil de assimilação. Por exemplo, a galactose e o manosido que não são assimilados pela linhagem Mont<sup>4</sup> são assimilados pela linhagem 116, enquanto a linhagem 154 é capaz de assimilar o manosido. A arbutina é assimilada tanto pela linhagem industrial (JP7.8.9) quanto pela linhagem 154, enquanto que ribose é assimilada pelas linhagens JP7.8.9 e Mont<sup>4</sup> e as linhagens 116 e 154 não são capazes de assimilar (Rodas *et al.*, 2006). A linhagem industrial *Lactobacillus plantarum* 6A também foi submetida ao API 50 CHL (Tabela 1). Essa linhagem, assim como a *L. vini* JP7.8.9, foi isolada em uma destilaria de álcool carburante no nordeste brasileiro. Em comparação com a linhagem tipo de *L. plantarum* foi observado apenas uma diferença na assimilação de sorbitol, na qual a linhagem industrial se mostrou capaz de assimilar enquanto a

linhagem tipo não assimila este composto.

Essas diferenças observadas no resultado do API 50 CHL entre linhagens de uma mesma espécie podem ser explicadas pela grande heterogeneidade existente no grupo dos *Lactobacillus*, que engloba espécies com grande variedade fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas (Axelsson, 2004). Esta heterogeneidade é refletida, por exemplo, na variedade do conteúdo GC, que pode apresentar variações entre 32 e 35 mol%, duas vezes mais do que o normalmente aceitável para um único gênero (Schleifer e Stackebrandt, 1983). A adaptação ao ambiente também pode explicar estas diferenças. Estudos que compararam os genomas de linhagens de *L. lactis* provenientes de dois ambientes que diferem bastante em sua composição química, a indústria de laticínios e brotos de feijão, demonstraram que a linhagem proveniente do ambiente vegetal apresenta muitas características adicionais relacionadas com a adaptação de crescimento para substratos derivados da parede celular das plantas, possuindo um maior número de genes envolvidos no transporte e metabolismo de carboidratos, o que resultou em um aumento na capacidade de assimilação de diversos açúcares (Siezen *et al.*, 2008). No caso de *L. vini*, nota-se a grande variedade existente entre as três linhagens comparadas, a linhagem de etanol combustível e as duas linhagens de vinho. Mesmo entre as duas linhagens isoladas de vinho é possível notar essa variabilidade fenotípica. Entretanto, os dados de assimilação pelo teste API50 CHL não revelaram traços específicos para os dois substratos, mostrando que há um componente gerador de variabilidade que é independente do substrato. É possível que isto esteja relacionado à presença de elementos móveis, tais como integrons, transposons ou fagos. Neste sentido, verifica-se a presença de elementos pro-fagos no genoma de *L. vini* (Lucena *et al.* 2012). A inserção e excisão desses elementos poderia gerar a variabilidade genética que se reflete na variabilidade fenotípica observada.

**Tabela 1.** Comparação fenotípica entre espécies de *Lactobacillus* com relação a assimilação de diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	Linhagem de <i>Lactobacillus</i>					
	<i>L. vini</i> JP 7.8.9	<i>L. vini</i> Mont 4†*	<i>L. vini</i> 116*	<i>L. vini</i> 154*	<i>L. plantarum</i> †**	<i>L. plantarum</i> 6A
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
Ribose	+	+	-	-	+	+
D-Xilose	-	-	-	-	-	-
L-Xilose	-	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Metil Xilosido	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	-	+	-	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Frutose	+	+	+	+	+	+
D-Manose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-

Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	+	-	-	-	-	-
Inositol	+	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	-	-	-	+	+
D-Sorbitol	-	-	-	-	+	-
$\alpha$ -Metil-Manosido	+	-	+	+	+	+
Metil $\alpha$ -D-Glicosido	-	-	-	-	-	-
N-Acetil Glicosamina	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	-	-	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+
Celobiose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	-	+	+
Melibiose	+	-	-	-	+	+

Sacarose	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
Melezitose	+	-	-	-	+	+
D-Rafinose	+	-	-	-	+	+
Amido	-	-	-	-	-	-
Glicogênio	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	-	-	-	+	+
D-Lixose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	+	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-
D-Arabitól	-	-	-	-	-	-
L-Arabitól	-	-	-	-	-	-

Gluconato	+	-	-	-	+	+
2-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-
5-ceto-gluconato	-	-	-	-	-	-

---

+, a linhagem consegue assimilar; -, a linhagem não foi capaz de assimilar.

† Linhagem tipo

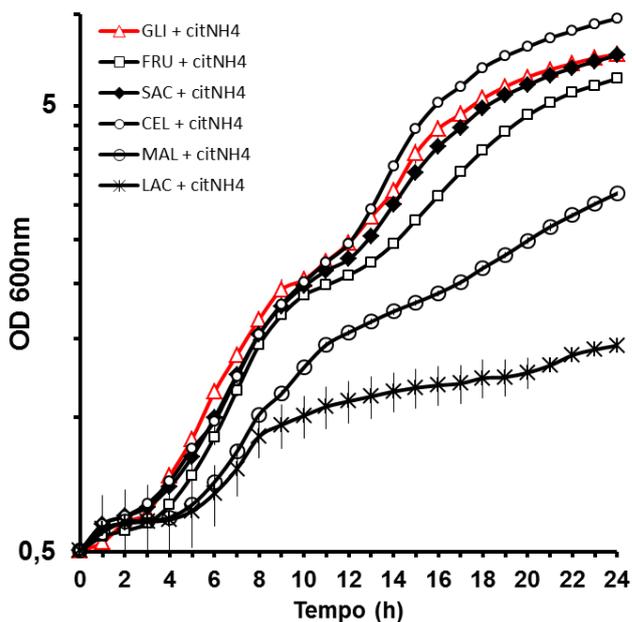
\* Rodas et al 2006

\*\**Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* (ATCC® 14917™) (Manual API Teste 50 CHL, Biomerieux, Marcy l'Etoile, França)

## Crescimento celular em diferentes fontes de carbono

Para a avaliação da cinética de crescimento, as células de *L. vini* JP7.8.9 foram inoculadas em meio MRS reconstituído variando a fonte de carbono. Esses experimentos foram realizados em anaerobiose, já que o crescimento desta bactéria em aerobiose é muito lento (dado não mostrado). Foram avaliados os açúcares presentes no mosto de fermentação de cana de açúcar (sacarose e seus produtos de hidrólise glicose e frutose) e dissacarídeos de importância industrial (celobiose da hidrólise da celulose, lactose dos produtos lácteos e maltose do mosto de cevada). O meio com glicose foi utilizado como referência.

No intervalo de 24 horas foi observado um baixo crescimento da bactéria no meio contendo lactose como fonte de carbono (Figura 1). O resultado mostra uma extensa fase lag de adaptação ao meio seguida de uma curta fase exponencial de crescimento e uma fase de crescimento lento. A lactose é um dissacarídeo formado por uma glicose e uma galactose. Sua metabolização é iniciada com a quebra da ligação  $\beta$ -1,4 pela enzima  $\beta$ -galactosidase. Os monômeros resultantes são degradados, a glicose diretamente pela via glicolítica e a galactose sendo metabolizada pela via da tagaturose 6-fosfato, ou alternativamente pela via de Leloir (Monedero *et al* 2007). Os dados da Tabela 1 mostram que a linhagem JP7.8.9 não apresenta deficiência na assimilação de nenhum desses dois monômeros. Portanto, pode-se presumir que o acúmulo de glicose resultante da hidrólise da lactose deva exercer efeito de repressão catabólica sobre o operon *lac* produzido pela ligação da proteína repressora semelhante a CcpA/P-Ser-HPr como acontece em *L. casei* (Monedero *et al* 2007). A maltose foi capaz de promover o crescimento celular lento, também após uma extensa fase lag de adaptação (Figura 1). Este é um dissacarídeo com duas moléculas de glicose em ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica. Sua hidrólise gera apenas glicose, o que poderia gerar um efeito de repressão catabólica já que o operon *mal* também é reprimido por CcpA/P-Ser-HPr (Monedero *et al* 2007). É possível também que no meio com maltose, esse baixo crescimento, provavelmente, é devido à necessidade do gasto de energia (ATP) para o transporte desse açúcar para o interior da célula permeases dependentes de ATP, como ocorre em *Lactococcus lactis* (Law *et al.*, 1995). Já a sacarose e a celobiose permitiram crescimento celular com a mesma eficiência da glicose e da frutose (Figura 1; tabela 2). Sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose com ligação  $\alpha$ -1,2-frutofuranosídeo, enquanto que celobiose é um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose unidas por ligação  $\beta$ -1,4-glicosídica. Seguindo a lógica acima, é possível sugerir que não há em *L. vini* o mecanismo de repressão catabólica sobre o metabolismo tanto da sacarose como da celobiose.



**Figura 1.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono. Gli: glicose; Fru: frutose; Sac: sacarose; Cel: celobiose; Mal: maltose; Lac: lactose. O meio MRS reconstituído continha citrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Até o momento, a caracterização do transporte de glicose em *L. vini* não foi reportada, mas o transporte de glicose em *Lactococcus lactis*, uma bactéria filogeneticamente relacionada com *L. vini*, foi recentemente elucidado: *L. lactis* possui dois sistemas de transporte do tipo PTS (manose-PTS, PTSMan e celobiose-PTS, PTSCel) e um sistema de transporte ativo secundário (GlcU) (Castro *et al.*, 2009). A bactéria *L. vini* JP7.8.9 contém no seu genoma operons do metabolismo de celobiose e grande quantidade de genes que codificam para  $\beta$ -glicosidases, além de sistemas específicos celobiose-PTS (Lucena *et al.*, 2012), o que deve propiciar o melhor crescimento de *L. vini* JP7.8.9 em meio contendo celobiose. O sistema de transporte PTS é tido como o principal translocador de glicose em muitas bactérias do filo *Firmicutes* ao qual pertence a família *Lactobacillaceae* (Jahreis *et al.*, 2008). Assim sendo, é válido assumir que em *L. vini* a celobiose é transportada e concomitantemente fosforilada pelo sistema celobiose-PTS.

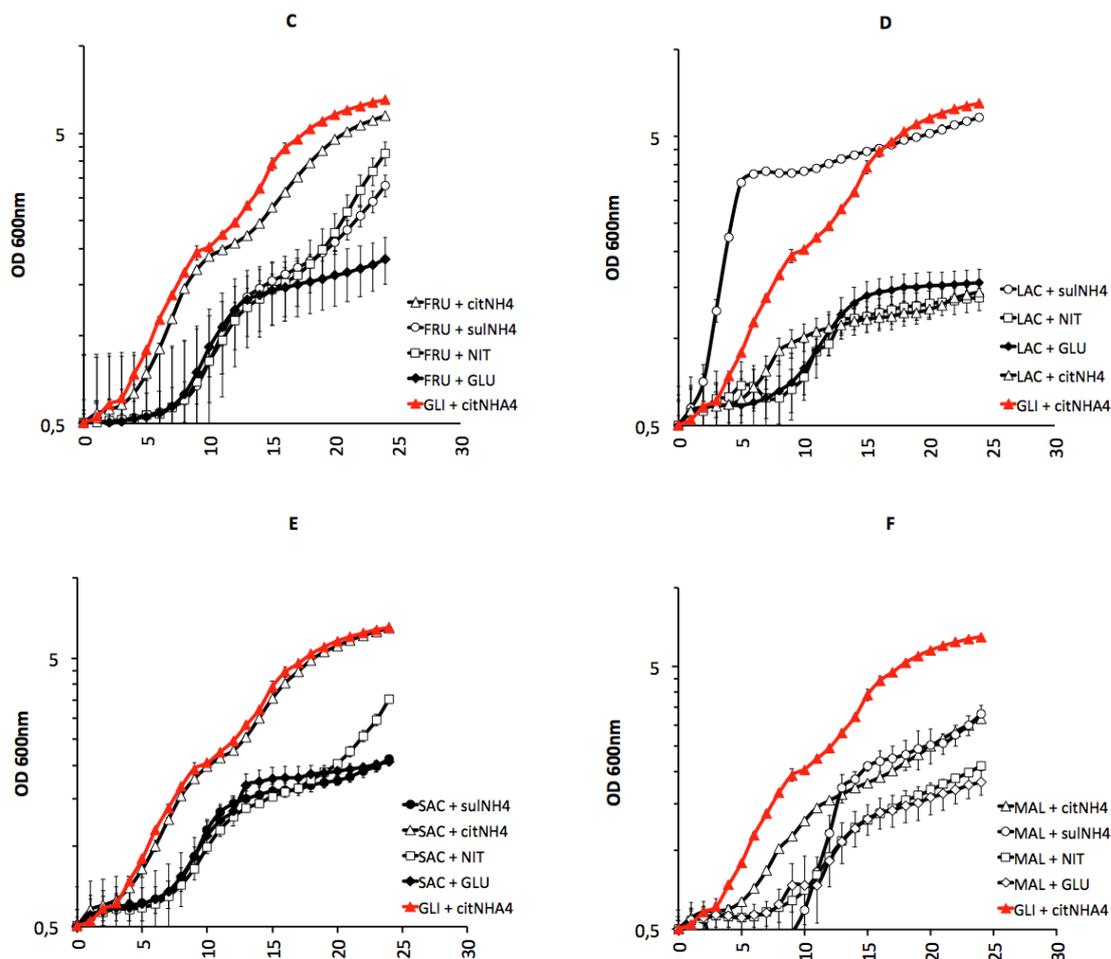
### Crescimento celular em diferentes fontes de nitrogênio

A cinética do crescimento anaeróbio de *L. vini* em diferentes fontes de carbono foi também avaliada em quatro tipos de fontes de nitrogênio: nitrogênio amoniacal suprido na forma dos sais de citrato (forma base do meio MRS comercial) ou de sulfato (forma base da maioria dos meios de cultura mineral de laboratório), nitrato como segunda fonte mineral de nitrogênio encontrado no caldo de cana, e glutamato como fonte orgânica de nitrogênio presente em outros substratos industriais. De forma geral, o crescimento bacteriano foi menor nas três últimas condições (Figura 2) do que foi observado quando o meio continha citrato de amônio (Figura 1). Portanto, há indicação de que o amônio na forma de sal de citrato se constitui numa fonte de nitrogênio mais assimilável pelas células. Isto não tem relação com o possível uso do citrato como fonte secundária de carbono, já que o crescimento celular não é observado quando este é oferecido como fonte primária, em meio contendo o sal, mas sem açúcar (dados não mostrados).

A maior diferença entre o meio contendo citrato de amônio e aqueles com outras fontes de nitrogênio é a menor fase lag apresentada no primeiro meio independente do tipo de açúcar utilizado. Em muitas espécies de LAB, o citrato é metabolizado concomitantemente com os açúcares fermentáveis (Smid e Kleerebezem, 2014). O citrato geralmente é usado como aceptor de elétrons durante o co-metabolismo de açúcares fermentáveis. Entretanto, ele não é precisamente um aceptor direto de elétrons, mas sim o precursor de uma molécula com esse potencial. Por exemplo, esta molécula por sofrer duas reações de descarboxilação para gerar oxalacetato e depois piruvato, e esta última atuar como receptor de elétron na produção de lactato (Zaunmuller *et al.*, 2006). Com isto, o balanço energético é mantido pela reoxidação do NADH gerado durante a assimilação dos açúcares. Em *L. lactis*, a utilização de citrato resulta em uma vantagem de crescimento que é evidente quando o meio possui valores de pH baixos (García-Quintáns *et al.*, 1998; Magni *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2004). Nestas condições, a presença de citrato proporciona uma utilização eficiente de glicose e também auxilia para que as células possam resistir às elevadas concentrações de lactato gerado como um subproduto metabólico. Este efeito de desintoxicação tem sido atribuída à eficiência do sistema antiporte citrato/lactato catalisada por CITP (Magni *et al.*, 1999), o que aumenta a sua atividade durante o co-metabolismo de glicose e de citrato (García-Quintáns *et al.*, 1998; Magni *et al.*, 1999). Isso pode justificar o melhor desempenho de *L. vini* no meio com citrato de amônio, uma vez que *L. lactis* e *L. vini* são filogeneticamente próximas.

Algumas culturas de lactobacilos podem reduzir nitrato a nitrito e nitrito para óxido nítrico em anaerobiose (Wolf & Hammes, 1988), usando-os como fonte de energia ou aceptores de elétrons (Klander & Weiss, 1986). Algumas culturas de *L. plantarum* são hábeis para reduzir nitrato sob condição limitada de glicose no meio e pH com valor igual ou maior que 6,0





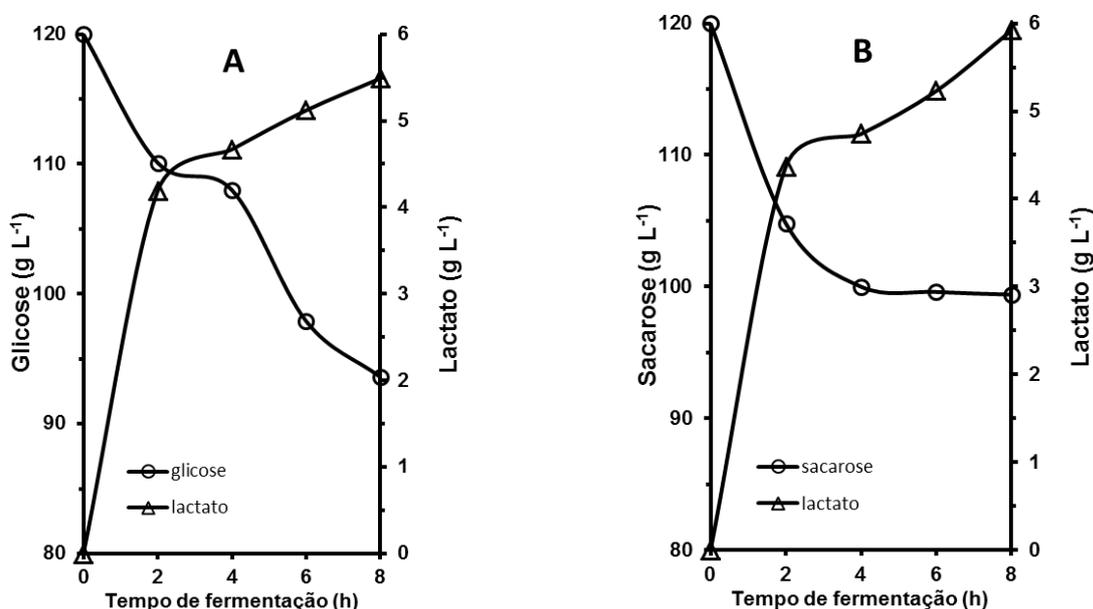
**Figura 2.** Cinética do crescimento anaeróbico a 37°C da bactéria *Lactobacillus vini* JP7.8.9 em meios MRS-específicos com diferentes fontes de carbono Gli: glicose (A); Cel: celobiose (B); Fru: frutose (C); Lac: lactose (D); Sac: sacarose (E); Mal: maltose (F), contendo citrato de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio ou glutamato como fonte de nitrogênio. O meio contendo glicose e citrato de amônio foi usado como referência.

### Ensaio de fermentação

Ensaio de fermentação foram realizados em meios contendo citrato de amônio e glicose ou sacarose na concentração de 12% (m/v) cada (Figura 3). Ao longo de oito horas de fermentação a velocidade média de consumo de glicose ( $-q_S$ ) foi calculada em  $-3,3$  g/L/h que resultou na produção de lactato como único metabólito de fermentação (Figura 3a). De acordo com Sun *et al.* (2004) esta bactéria pode ser classificada como homofermentadora obrigatória para glicose, o que corrobora com a classificação proposta por Rodas *et al.* (2006) que descreveu a espécie

como homofermentadora para pentoses e hexoses, produzindo exclusivamente o lactato como produto final.

Entretanto, a produção de lactato não foi uniforme ao longo do ensaio de fermentação, apresentando uma elevada taxa de produção de  $2,1 \text{ g h}^{-1}$  nas primeiras duas horas. Nesse ponto o rendimento foi calculado em  $0,42 \text{ g g}^{-1}$ . Em seguida observou-se uma fase de produção uma ordem de grandeza mais lenta de  $0,28 \text{ g h}^{-1}$ , com rendimento de conversão de  $0,078 \text{ g g}^{-1}$ . No final do período de fermentação o rendimento de produção de lactato foi calculado em  $0,21 \text{ g g}^{-1}$  na base da glicose consumida. Este rendimento foi semelhante ( $0,29 \text{ g g}^{-1}$ ) àquele observado para o consumo de sacarose como fonte de carbono (Figura 3b).



**Figura 3.** Cinética da fermentação de glicose (A) e de sacarose (B) pelas células de *L. vini* JP7.8.9 em meio MRS reconstituído contendo citrato de amônio.

## Conclusão

A bactéria industrial *Lactobacillus vini* JP7.8.9 apresenta particularidades no perfil de assimilação de açúcares em relação a outras linhagens desta espécie isoladas da fermentação de vinho, embora este perfil não possa ser relacionado ao meio industrial da qual essas linhagens foram isoladas. Uma característica interessante é o fato de esta bactéria ser capaz de assimilar celobiose com muita eficiência em anaerobiose, como se pode observar no perfil de crescimento celular. Isto pode indicar um bom potencial desta bactéria de produzir produtos de interesse

comercial a partir de hidrolisados de celulose. Como o metabolismo desta espécie foi classificado como homofermentativo, a produção de etanol deve ser descartada. Entretanto, pode-se pensar no aprimoramento da produção de lactato ou mesmo na produção da própria biomassa de células para uso como probióticos. Um fato importante a ser explorado é o efeito do citrato sobre o metabolismo celular, notadamente sobre a eficiência de transporte e assimilação de açúcares, fatores importantes para o aprimoramento do uso deste microrganismo em processos industriais.

### Referencias Bibliográficas

Andrietta, M.G.S.; Andrietta, S.R.; Steckelberg, C.; Stupiello, E.N.A. Bioethanol – 30 years of Proálcool. *Internacional Sugar Journal*. **2007**, 109 (1299): 195 – 200.

Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In: *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. Ed 3. Salminen, S.; Von Wright, A.; Ouwehand, A.C. (eds) New York: Marcel Dekker. **2004**, p 1 – 66.

Beckner, M.; Ivey, M.L.; Phister, T.G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*. **2011**, 53: 387 – 394.

Castro, R.; Neves, A.R.; Fonseca, L.L.; Pool, W.A.; Kok, J.; Kuipers, O.P.; Santos, H. Characterization of the individual glucose uptake systems of *Lactococcus lactis*:mannose-PTS, cellobiose-PTS and the novel GlcU permease. *Molecular Microbiology*. **2009**, 71: 795–806

De Barros Pita, W.; Leite, F.C.B.; De Souza Liberal, A.T.; Simões, D.A.; De Moraes, M. A. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. Cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **2011**, 100: 99 – 107.

De Souza, R.B.; Santos, B.M.; De Souza, R.F.R.; Da Silva, P.K.N.; Lucena, B.T.L.; Moraes Jr., M. A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the

sugarcane-based ethanol fermentation. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*. **2012**, 39 (11): 1645 – 650 .

García-Quintáns, N.; Magni, C.; de Mendoza, D.; López, P. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*. **1998**, 64: 850 – 857.

Jahreis, K.; Pimentel-Schmitt, E.F.; Brückner, R.; Titgemeyer, F. Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiological Review*. **2008**, 32: 891-907.

Kandler, O.; Weiss, N. *Lactobacillus*. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E.; Holt, J. G. (Eds) Baltimore: Williams and Wilkins, **1986**. 2: 103 – 121

Law, J.; Buist, G.; Haandrikman, A.; Kok, J.; Venema, G.; Leenhouts K. A systems to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targets genes. *Journal of Bacteriology*. **1995**, 177: 7011 – 7018.

Lucena, B.T.L.; Santos, B.M.; Moreira, J.L.S.; Moreira, A.P.B.; Nunes, A.C.; Azevedo V.; Miyoshi, A.; Thompson, F.L.; Morais Jr., M.A. Diversity of Lactic Acid Bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, **2010**. 10: 298.

Lucena, B.T.L.; Silva, G.G.Z.; Santos, B.M.; Dias, G.M.; Amaral, G.R.S.; Moreira, A.P.B. Morais Jr. M. A.; Dutilh, B.E.; Edwards, R.A.; Balbino, V.; Thompson, C.C.; Thompson, F.L. Genome sequences of the Ethanol-Tolerant *Lactobacillus vini* Strains LMG 23202T and JP7.8.9. *Journal of Bacteriology*. **2012**, 194: 3018 – 3018.

Magni, C.; de Mendoza, D.; Konings, W. N.; Lolkema, J. S. Mechanism of citrate metabolism in *Lactococcus lactis*: Resistance against lactate toxicity at low pH. *Journal of Bacteriology*. **1999**, 181: 1451 – 1457.

Martin, M.G.; Sender, P.D.; Peiru, S.; de Mendoza, D.; Magni, C. Acid-inducible transcription of the operon encoding the citrate lyase complex of *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis CRL264. *Journal of Bacteriology*. **2004**, 186: 5649 – 5660.

Monedero, V.; Maze, A.; Boël, G.; Zúñiga, M.; Beaufils, S.; Hartke, A.; Deutscher, J. The Phosphotransferase System of *Lactobacillus casei*: Regulation of Carbon Metabolism and Connection to Cold Shock Response. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **2007**, 12: 20-32.

Passoth, V.; Blomqvist, J.; Schunürer, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* Form a Stable Ethanol-Producing Consortium in a Commercial Alcohol Production Process. *Applied Environmental Microbiology*. **2007**, 73: 4354 – 4356.

Pereira, L.P.; 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*. **2011**, 101(3): 529 – 539.

Rodas, A.M., Ferrer, S., Pardo, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2005**, 55 197 – 207.

Rodas, A.M., Chenoll, E., Macia, M. C., Ferrer, S. Pardo, I. Aznar, R. *Lactobacillus vini* sp. nov., a wine lactic acid bacterium homofermentative for pentoses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **2006**, 56: 513 – 517.

Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E. Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*. **1983**, 37: 143 – 187.

Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. **2004**, 31: 401 – 408.

Siezen, R.J.; Starrenburg, M.J.; Boekhorst, J.; Renckens, B.; Molenaar, D.; van Hylckama Vlieg, J.E. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Applied and Environmental Microbiology*. **2008**, 74 (2): 424 – 436.

Smid, E.J.; Kleerebezem, M. Production of Aroma Compounds in Lactic Fermentations. *Annual Review Food Science Technology*. **2014**, 5: 313 – 26.

Wolf, G.; Hammes, W.P. Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archives of Microbiology*. **1988**, 149: 220 – 224.

Zaunmüller, T.; Eichert, M.; Richter, H., and Uden, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology Biotechnology*. **2006**, 72: 421–429.

Zhao, X. Q.; Xue, C.; Ge, X. M.; Yuan, W. J.; Wang, J. Y.; Bai, F. W. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *Journal of Biotechnology*. **2009**, 139: 55–60.