



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

EFEITO DO 4-ETILFENOL SOBRE O CRESCIMENTO E CAPACIDADE
FERMENTATIVA DA LINHAGEM INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*
PE-2

ELIZABETE APARECIDA COVRE

Araras

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**EFEITO DO 4-ETILFENOL SOBRE O CRESCIMENTO E CAPACIDADE
FERMENTATIVA DA LINHAGEM INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*
PE-2**

ELIZABETE APARECIDA COVRE

ORIENTADOR: PROFa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras

2019

Covre, Elizabete Aparecida

EFEITO DO 4-ETILFENOL SOBRE O CRESCIMENTO E
CAPACIDADE FERMENTATIVA DA LINHAGEM INDUSTRIAL DE
Saccharomyces cerevisiae PE-2 / Elizabete Aparecida Covre. -- 2019.
67 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

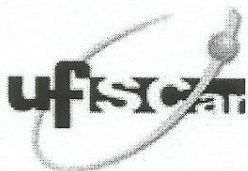
Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
Banca examinadora: Sandra Regina Ceccato Antonini, Renato Nallin
Montagnolli, Marcos Antonio de Moraes Junior
Bibliografia

1. Saccharomyces cerevisiae. 2. Etanol. 3. 4-Etilfenol. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Elizabete Aparecida Covre, realizada em 26/02/2019:

Sandra Regina Ceccato Antonini

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCar

R. N. Montagnoli

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnoli
UFSCar

Sandra Regina Ceccato Antonini

pl Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
UFPE

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Marcos Antonio de Moraes Junior e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Sandra Regina Ceccato Antonini

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela fé e coragem para seguir e alcançar meus sonhos e por ser meu refúgio nos momentos de aflição.

À professora, orientadora e amiga Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini por ter sido companheira na orientação deste trabalho, pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, amizade e carinho que partilhamos durante todo o período de convívio e pela confiança em mim depositada para a realização desse projeto.

Em especial agradeço aos meus pais Leonardo e Aparecida pela sabedoria em educar e por todo amor demonstrado nos momentos mais difíceis. Por abdicarem de seus sonhos para que este e muitos outros pudessem se tornar realidade.

Ao meu irmão Leonardo que sempre me incentivou desde o início da minha caminhada em busca dos meus objetivos.

Ao meu namorado Jean pela paciência, companheirismo, amor e apoio em todos os momentos dessa maravilhosa jornada.

À Prof.^a Dra. Silvana Perissatto Meneghin por confiar e acreditar na minha capacidade, pela amizade e por sua alegria de vida contagiante.

Aos meus queridos amigos Isabella, Ariane, Ligianne e José Neto por toda ajuda, companheirismo e risadas que compartilhamos. Desejo muito sucesso à vocês.

À Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, à técnica do LAMAM (UFSCar) Lúcia T. Picollo e Aline S. Réco pela colaboração, convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos e sua equipe, que muito colaboraram com o planejamento e execução desse projeto.

Aos professores e funcionários do PPG-PVBA, e ao Centro de Ciências Agrárias – UFSCar - *campus* de Araras, pelo acolhimento e suporte para o desenvolvimento desse projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio a pesquisa (processo número 2016/20680-4).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro (código de financiamento 001).

Agradeço a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 Fermentação etanólica.....	04
3.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	07
3.3 <i>Dekkera bruxellensis</i> e produção de fenóis voláteis.....	10
3.4 Compostos fenólicos e fatores que afetam a fermentação.....	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Microrganismo.....	18
4.2 Efeito do 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose sobre a velocidade específica de crescimento máxima da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	18
4.2.1 Preparo do inóculo.....	18
4.2.2 Planejamento experimental.....	19
4.2.3 Condução do experimento.....	21
4.3 Efeito do 4-etilfenol sobre a capacidade fermentativa da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	22
4.3.1 Preparo do inóculo.....	22
4.3.2 Condução do experimento.....	23
4.3.3 Análises das amostras.....	23
4.3.4 Análise estatística.....	25
4.4 Meios e soluções utilizados.....	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 Efeito do 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose sobre a velocidade específica de crescimento máxima da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	28
5.2 Efeito do 4-etilfenol sobre a capacidade fermentativa da	42

	levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	
6	CONCLUSÕES.....	54
7	LITERATURA CITADA.....	56

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no DCCR para a avaliação da velocidade específica de crescimento máxima da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	19
Tabela 2. Matriz do DCCR com valores codificados e originais das variáveis em estudo	20
Tabela 3. Volumes e concentrações das soluções de 4-etilfenol utilizados no experimento de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 realizado na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200	26
Tabela 4. Valores codificados e nominais utilizados no DCCR para as quatro variáveis estudadas (4-etilfenol, pH, etanol e sacarose) e resposta obtida (velocidade específica de crescimento máxima)	29
Tabela 5. Coeficientes de regressão para a variável velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) de PE-2	32
Tabela 6. Análise da variância dos resultados do número de leveduras (células vivas/mL) em 12h de fermentação.....	42
Tabela 7. Média e desvio-padrão dos números de leveduras (células vivas/mL) em 12h de fermentação.....	43
Tabela 8. Análise da variância dos resultados de viabilidade celular (%) em 12h de fermentação.....	44
Tabela 9. Média e desvio padrão dos valores de viabilidade celular (%) em 12h de fermentação.....	44
Tabela 10. Análise da variância dos valores de teor alcoólico (g/L) em 12h de fermentação.....	45
Tabela 11. Média e desvio-padrão do teor alcoólico (g/L) em 12h de fermentação.....	46
Tabela 12. Análise da variância dos valores de pH em 12h de fermentação....	47
Tabela 13. Média e desvio-padrão dos valores de pH em 12h de fermentação.....	47
Tabela 14. Análise da variância dos valores de açúcar redutor total (ART; g/L) em 12h de fermentação.....	48
Tabela 15. Média e desvio-padrão dos valores de açúcar redutor total (ART, g/L) residual em 12h de fermentação.....	49

Tabela 16. Análise da variância dos valores de eficiência fermentativa (%) em 12h de fermentação.....	50
Tabela 17. Média e desvio-padrão dos valores de eficiência fermentativa (%) em 12h de fermentação.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema simplificado de um processo de fermentação em batelada alimentada com a reciclagem das células de levedura (Traduzido de LOPES et al., 2016)	6
Figura 2. Formação de etilfenóis a partir dos precursores hidroxicinâmicos (SUÁREZ et al., 2007)	12
Figura 3. Leitora de microplacas Tecan Infinite® M200 (A) e microplaca utilizada nos experimentos (B).....	22
Figura 4. Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) da linhagem <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	31
Figura 5. Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta.....	33
Figura 6. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) em função do pH e concentração de etanol.....	34
Figura 7. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) função do pH e concentração de sacarose.....	36
Figura 8. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) função do pH e concentração de 4-etilfenol.....	37
Figura 9. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) função da concentração de etanol e concentração de 4-etilfenol.....	39
Figura 10. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h ⁻¹) função do concentração sacarose e concentração de 4-etilfenol.....	41
Figura 11. Número de leveduras (células vivas/mL) durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. <i>Legenda:</i> T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.....	43
Figura 12. Viabilidade celular (%) das leveduras durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. <i>Legenda:</i> T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.....	45

- Figura 13. Teor alcoólico (g/L) do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h..... 46
- Figura 14. pH do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h..... 48
- Figura 15. ART residual (g/L) do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h..... 49

EFEITO DO 4-ETILFENOL SOBRE O CRESCIMENTO E CAPACIDADE FERMENTATIVA DA LINHAGEM INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

Autor: ELIZABETE APARECIDA COVRE

Orientador: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

RESUMO

Uma das principais leveduras contaminantes da produção de etanol do Brasil é a espécie *Dekkera bruxellensis*. Sabe-se que esta levedura é capaz de produzir compostos fenólicos voláteis como 4-vinilfenol e 4-etilfenol a partir de ácidos hidroxicinâmicos presentes nas uvas do vinho por meio da ação das enzimas hidroxicinamato descarboxilase e vinilfenol redutase. Os ácidos hidroxicinâmicos também estão presentes no caldo de cana e no melaço e, assim, fenóis voláteis podem ser sintetizados durante a fermentação etanólica. Os efeitos da presença de 4-etilfenol e a interação com os fatores relacionados com a produção de etanol e suas implicações sobre *Saccharomyces cerevisiae* ainda não estão bem estabelecidos. Este trabalho avaliou os efeitos da adição de 4-etilfenol sobre o crescimento de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* (PE-2) sob a influência do pH, concentração de etanol e sacarose, e sobre a sua capacidade fermentativa. Utilizando-se o delineamento composto central rotacional (DCCR), foi verificado o efeito das variáveis 4-etilfenol, pH, concentração de etanol e de sacarose sobre a velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae*, em experimentos em microplacas em meio YPS (*yeast extract-peptone-sucrose*), a 30°C. Em seguida, realizou-se fermentação em ciclo único de 12h em meio YPS, pH 4,5, 17% sacarose, a 30°C, com a adição de 10 e 20 mg/L de 4-etilfenol no início ou após 4h de fermentação. Valores de 15 mg/L, 6%, 17% e 4,0 para 4-etilfenol, etanol, sacarose e pH, respectivamente, influenciaram negativamente a velocidade específica de crescimento máxima de *S. cerevisiae*. Observou-se que o efeito da concentração de 4-etilfenol esteve relacionado à concentração de etanol no meio e que o 4-etilfenol é capaz de influenciar o crescimento de *S. cerevisiae* quando as concentrações dos demais parâmetros não são favoráveis para a viabilidade da levedura. Quanto à fermentação, verificou-se que a adição de 4-etilfenol provocou efeito significativo sobre o número de leveduras, pH e teor alcoólico do meio de fermentação, resultando em queda na eficiência fermentativa. Conclui-se, portanto, que o crescimento e a capacidade fermentativa da levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 são afetados pela presença de 4-etilfenol, metabólito produzido por *D. bruxellensis*, o que pode contribuir para explicar o impacto dessa levedura na produção de bioetanol industrial.

Palavras Chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Etanol; 4-Etilfenol; Fermentação

EFFECT OF THE 4-ETHYLPHENOL ON THE GROWTH AND FERMENTATIVE CAPACITY OF THE INDUSTRIAL STRAIN OF *Saccharomyces cerevisiae* PE-2

Author: ELIZABETE APARECIDA COVRE

Adviser: Prof Dr SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

ABSTRACT

One of the main contaminating yeasts of ethanol production in Brazil is the species *Dekkera bruxellensis*. It is able to produce volatile phenolic compounds such as 4-vinylphenol and 4-ethylphenol from hydroxycinnamic acids present in wine grapes due to the action of the enzymes hydroxycinnamate decarboxylase and vinyl phenol reductase. Hydroxycinnamic acids are also present in sugarcane juice and molasses and thus volatile phenols could be synthesized during ethanolic fermentation. The effects of the presence of 4-ethylphenol and the interaction with factors related to the ethanol production and its implications on *Saccharomyces cerevisiae* are not yet well established. This work evaluated the effects of the addition of 4-ethylphenol on the growth of an industrial strain of *S. cerevisiae* (PE-2) under the influence of pH, ethanol and sucrose concentration, and on its fermentative capacity. By using the central compound rotational design (CCRD), the effect of the variables 4-ethylphenol, pH, ethanol and sucrose concentration on the maximum specific growth rate of *S. cerevisiae* was evaluated in microplate experiments in YPS medium (*yeast extract-peptone-sucrose*), at 30°C. Following, single-cycle fermentations lasting 12h in YPS medium, pH 4.5, 17% sucrose, at 30°C, with 4-ethylphenol in concentrations of 10 and 20 mg/L being added at the start or after 4h of fermentation, were carried out. Values of 15 mg/L, 6%, 17% and 4.0 for 4-ethylphenol, ethanol, sucrose and pH, respectively, negatively influenced the maximum specific growth rate of *S. cerevisiae*. It was observed that the effect of 4-ethylphenol concentration was linked to the ethanol concentration in the medium and that 4-ethylphenol is capable of influencing *S. cerevisiae* growth when the concentrations of the other parameters are not suitable for the yeast viability. The addition of 4-ethylphenol on fermentation resulted in a significant effect on the number of yeasts, pH and alcohol content of the fermentation medium, resulting in a decrease in the fermentative efficiency. Therefore, it was concluded that the industrial yeast *S. cerevisiae* PE-2 growth and fermentative capacity are affected by the presence of 4-ethylphenol, a metabolite produced by *D. bruxellensis*, which may contribute to explain the impact of this yeast on bioethanol industrial production.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Ethanol; 4-Ethylphenol, Fermentation

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o etanol é produzido principalmente a partir da fermentação de açúcares provenientes da extração da cana-de-açúcar, tendo como agentes de fermentação linhagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Como a produção é realizada utilizando mosto não estéril, a eficiência do processo é reduzida pela ação de microrganismos contaminantes. Estes são os responsáveis por problemas relacionados ao consumo de nutrientes do mosto, queda de viabilidade das células de levedura devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento e queda no rendimento industrial.

A espécie *Dekkera bruxellensis* tem sido relatada como uma das principais leveduras contaminantes, tanto da indústria do vinho quanto da produção de etanol combustível. Possui alta capacidade de adaptação ao substrato, é tolerante ao etanol e em condições aeróbias produz ácido acético, um inibidor do crescimento de *S. cerevisiae*. No que se refere à sua capacidade fermentativa, possui desempenho reduzido nas condições em que o processo é conduzido no Brasil. Dessa forma, destilarias contaminadas com *D. bruxellensis* apresentam queda de produtividade e aumento no tempo de fermentação, o que implica atraso em todo o processo operacional da usina.

D. bruxellensis também é capaz de produzir fenóis voláteis a partir de ácidos hidroxicinâmicos. A origem dos fenóis voláteis está relacionada com a atividade sequencial de duas enzimas que descarboxilam os ácidos hidroxicinâmicos como, por exemplo, ácido ferúlico, p-cumárico e ácido cafeico, produzindo os compostos 4-vinifenol, 4-etilfenol, 4-vinilguaiacol e 4-etilguaiacol. Estes compostos são fonte de preocupação na indústria vinícola, pois ácidos hidroxicinâmicos estão naturalmente presentes no suco de uva, assim, uma vez reduzidos afetam diretamente a qualidade do vinho interferindo nas suas características sensoriais.

Na indústria do etanol pode-se encontrar ácidos hidroxicinâmicos no caldo e melaço da cana-de-açúcar e, portanto, fenóis voláteis podem ser produzidos durante a fermentação etanólica. A presença de compostos fenólicos durante a fermentação pode levar à inibição do crescimento e fermentação de *S. cerevisiae*, pois os mesmos afetam a integridade da membrana celular interferindo assim na sua capacidade de servir como barreira seletiva e matriz enzimática.

Devido à interferência direta provocada pela presença de fenóis voláteis sobre a produção de vinhos, inúmeros são os estudos direcionados à compreensão dos efeitos e formas de controle do contaminante. Estudos demonstraram a produção de 4-etilfenol por *D. bruxellensis* em mostos de cana-de-açúcar, porém há carência de estudos sobre como a presença desse metabólito associado a outros fatores estressantes para *S. cerevisiae* podem interferir no seu metabolismo acarretando prejuízos para a fermentação.

Assim, este trabalho pretende contribuir no sentido de avaliar se o crescimento de *S. cerevisiae* pode ser afetado pela presença de fenóis voláteis como o 4-etilfenol, em variadas concentrações de etanol e sacarose bem como em diferentes valores de pH e se há interferência também na capacidade fermentativa da levedura do processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da adição de 4-etilfenol, metabólito produzido pela levedura contaminante *D. bruxellensis*, sobre o crescimento de uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* sob a influência do pH, concentração de etanol e sacarose, e sobre a sua capacidade fermentativa.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de 4-etilfenol sobre o crescimento de *S. cerevisiae*;
- Avaliar a interação de diferentes valores de pH, concentração de etanol e concentração de sacarose na presença de 4-etilfenol sobre o crescimento de *S. cerevisiae*;
- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de 4-etilfenol sobre a capacidade fermentativa de *S. cerevisiae*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fermentação etanólica

O etanol é o biocombustível de maior importância no Brasil e tem como principal matéria-prima a cana-de-açúcar. Desde o advento do PROÁLCOOL (Programa Nacional do Alcool) na década de 1970, cujo objetivo foi reduzir a dependência do país das importações de petróleo, é que incentivos foram destinados ao aperfeiçoamento do processo produtivo, buscando a maximização da produtividade e do rendimento (LEITE; LEAL, 2007). As contribuições ocorreram tanto no campo, com melhores variedades de cana e práticas agrícolas, quanto na área industrial com melhorias na engenharia do processo, técnicas de assepsia e seleção de linhagens resistentes (BASSO et al., 2008).

Atualmente, a indústria canavieira ainda é um dos setores de maior destaque na agricultura, uma vez que a crescente preocupação em relação à matriz energética global promove a busca por alternativas mais sustentáveis para a produção de biocombustíveis em detrimento à utilização de combustíveis fósseis (KUNDIYANA, 2006).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar sendo o maior produtor e exportador mundial de açúcar e segundo maior produtor de etanol. Juntos, açúcar e

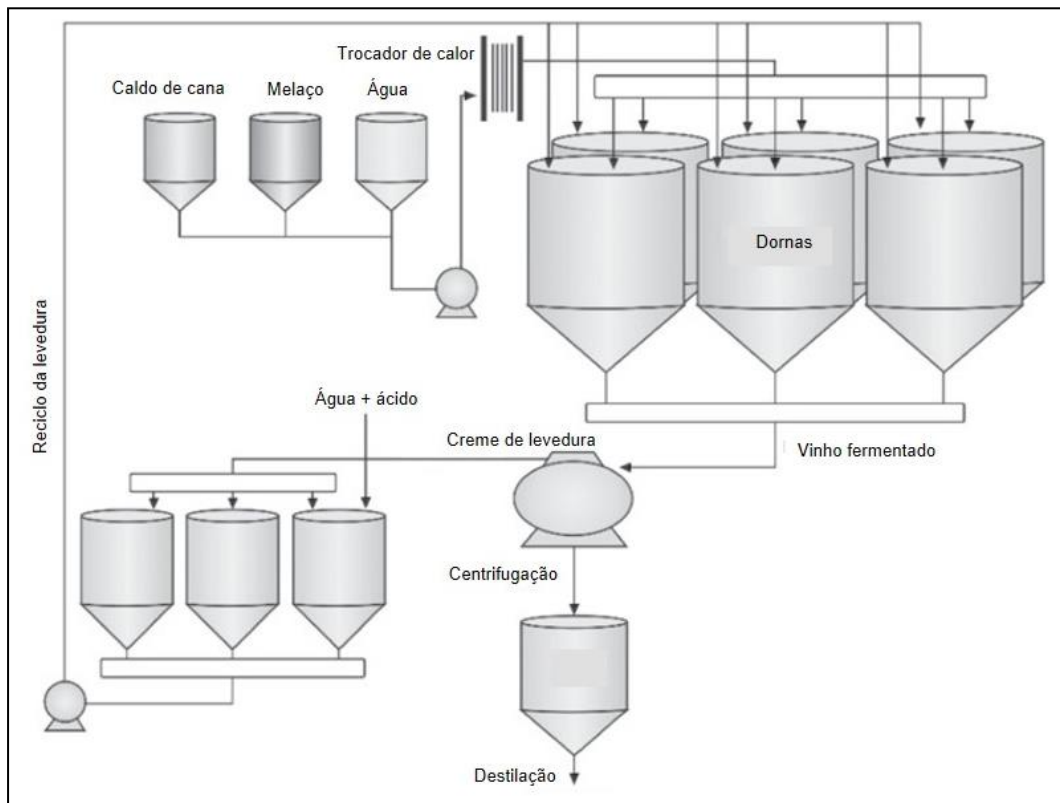
etanol compõem 2% do Produto Interno Bruto (PIB) e geram 2,4 milhões de empregos no país (UNICA, 2018). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), para safra 2018/19 foi estimada uma produção de 32,31 bilhões de litros de etanol, para um processamento de 615,84 milhões de toneladas de cana-de-açúcar.

O país se destaca quanto ao seu pioneirismo em geração em larga escala do etanol, portanto, é possível lapidar as técnicas de fabricação e promover estudos para produzir de forma mais eficiente (BASSO et al., 2011). Conforme Amorim et al. (2011), os principais desafios são desenvolver novas tecnologias para produção de bioetanol de matérias-primas de primeira e segunda geração e atender apropriadamente critérios de sustentabilidade ambiental.

O etanol pode ser produzido por processos químicos ou microbiológicos. No entanto, a principal rota industrial utilizada é o processo microbiológico que ocorre por meio da fermentação. A via fermentativa do etanol é um processo anaeróbio que consiste na transformação de açúcares em etanol e gás carbônico. Este processo se dá pela ação de leveduras que o fazem para a obtenção de energia a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo o etanol um produto desse processo (LIMA et al., 2001; AMORIM et al., 2011).

No Brasil, o etanol é produzido principalmente a partir de caldo de cana-de-açúcar e ou melaço não estéril (RODERO et al., 2016), por meio do processo de fermentação que pode ser conduzido nas formas de batelada ou contínua, todavia a mais utilizada é uma variação da batelada, a chamada batelada alimentada (*fed-batch*), que representa cerca de 83% das destilarias do país (LOPES et al., 2016, Figura 1). Sistemas em batelada apresentam como vantagens maior rendimento na fermentação e maior teor alcoólico no vinho, melhor mensuração do rendimento e causam menos efeitos sobre as leveduras, sendo um sistema mais flexível e possibilitando melhor assepsia das dornas e maior controle de vazões (AMORIM, 2005). Além disso, as indústrias optam por utilizar leveduras já adaptadas ao substrato, por consequência se obtém um aumento na produção de etanol (LOPES et al., 2016).

Figura 1. Esquema simplificado de um processo de fermentação em batelada alimentada com a reciclagem das células de levedura (Traduzido de LOPES et al., 2016).



No início da fermentação o mosto possui de 18 a 22% (m/v) de açúcar redutor total (ART), e teores alcoólicos de 8 a 10% (v/v) podem ser atingidos dentro de 6 a 10 horas de fermentação (BASSO et al., 2008). Após o final de cada ciclo de fermentação, as células de leveduras são separadas do vinho por centrifugação. Esse sistema de reciclo celular é conhecido como *Mélie-Boinot* (LOPES et al., 2016). O vinho de levedurado é encaminhado para a destilação enquanto o fermento é submetido ao tratamento com ácido sulfúrico com pH variando de 2,0-2,5 por aproximadamente 1 a 2 horas, posteriormente a massa celular é enviada para a dorna para um novo ciclo fermentativo (AMORIM et al., 2011).

Oliva-Netto et al. (2013) afirmam que o tratamento ácido é um fator estressante para as células de leveduras, uma vez que quando nessas condições, utilizam os carboidratos de reserva trealose e/ou glicogênio, para suportar o estresse. Dorta (2006) também ressalta que valores baixos de pH podem prejudicar

a viabilidade, o brotamento, a quantidade da biomassa, o rendimento e a produtividade, acarretando sobras de açúcar ao final da fermentação.

Outro fator estressante é a contaminação por outros microrganismos, como bactérias e outras leveduras não *S. cerevisiae*, afetando diretamente o processo, pois levam a competição pelos nutrientes presentes no mosto (BASSO et al., 2008).

De acordo com Sousa e Monteiro (2011), as principais fontes de microrganismos contaminantes são a própria flora epífita da cana-de-açúcar, o solo carregado com os colmos, a poeira e os equipamentos infeccionados e até mesmo os materiais contaminados utilizados no corte e no processo. A população bacteriana, composta principalmente por bactérias do ácido láctico, é normalmente mantida em contagens relativamente baixas com a adição de ácido sulfúrico, e/ou antibióticos quando necessário. No entanto, o mesmo procedimento não é eficaz para controlar a população de leveduras não *S. cerevisiae* (SOUZA-LIBERAL et al., 2007).

Mutton (2008) ressalta que é importante manter uma rotina de controle para diminuir a frequência das contaminações, que pode ser realizada utilizando-se matéria-prima bem conservada, minimização do espaço de tempo entre corte e moagem, utilização de antissépticos dentro das especificações técnicas, emprego de leveduras com alta viabilidade e em quantidade adequada para o processo, monitoramento do grau de contaminação e limpeza de todas as instalações da destilaria.

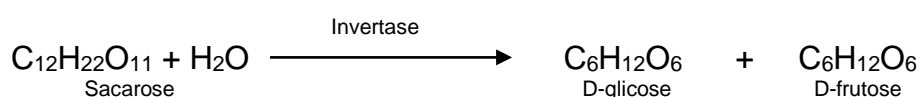
3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae é um microrganismo leveduriforme, unicelular, tipicamente esférico ou oval, não filamentoso, pertencente ao filo Ascomycota. Apresenta estrutura celular eucariótica formada por parede celular, membrana plasmática, citoplasma constituído por organelas membranosas e núcleo (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). Possui reprodução assexuada por brotamento, e reprodução sexuada. Durante o brotamento ocorre a formação de uma protuberância externa na célula-mãe, que se desprende após a migração do núcleo para a formação da célula-filha. Já a reprodução sexuada somente irá ocorrer entre indivíduos de tipos sexuais diferentes (*mating type* α ou a) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Essas leveduras são capazes de crescimento anaeróbico facultativo, ou seja, conseguem obter energia química na forma de ATP na presença ou ausência de oxigênio (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1997). No processo anaeróbico, as leveduras fermentam compostos como glicose e frutose produzindo metabólitos como etanol, gás carbônico e glicerol (ANDRIETTA; STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006). *S. cerevisiae* também apresenta o chamado “Efeito *Crabtree* positivo”, que corresponde à capacidade de utilizar açúcares para produzir etanol mesmo na presença de oxigênio (PRONK et al., 1996; HAGMAN et al., 2014).

S. cerevisiae foi o primeiro organismo eucarionte a ter o seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996), por isso mesmo é considerado um organismo modelo entre os eucariotos (MISSAWA, 2009). É a espécie de levedura mais utilizada na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o etanol, como produção de biocombustíveis ou obtenção de bebidas alcoólicas (ANDRIETTA; STECKELBERG, ANDRIETTA, 2006).

Com a fermentação, a levedura obtém energia química necessária à sua sobrevivência, liberando como produto o etanol. Este é formado a partir de monossacarídeos, sendo necessário decompor a sacarose, ($C_{12}H_{22}O_{11}$), em D-glicose e D-frutose. A levedura produz a enzima invertase, a qual hidrolisa a sacarose, conforme esquematizado na equação:



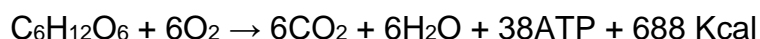
Dois são os ciclos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro é a glicólise, tem a função de “quebrar” a molécula de glicose até ácido pirúvico, por meio de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Na ausência de oxigênio há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. A equação de Gay-Lussac faz um balanço desta etapa. Porém, na presença de oxigênio há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, o qual será oxidado pela ação de enzimas a dióxido de carbono e água (STECKELBERG, 2001).

O balanço global dos dois ciclos pode ser resumido pelas equações:

Equação de Gay-Lussac:



Ciclo de Krebs:



A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e 57 Kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g etanol/g glicose. Na prática, este valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para produção de glicerol e alcoóis superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura.

De acordo com Andrietta et al. (2007), os fatores que consagram esse microrganismo como o mais indicado para a fermentação resulta do fato de reunir a capacidade de apresentar crescimento rápido, alta capacidade de conversão de açúcares, tolerância às altas concentrações de etanol, osmotolerância, tolerância a grandes variações de temperatura e presença de atividade celular mesmo em ambientes ácidos.

Na indústria do etanol as células de levedura estão sujeitas a condições estressantes do processo de fermentação, como a presença de altas concentrações de etanol, elevada pressão osmótica, pH baixo e alta temperatura que são intensificados pela prática do reciclo celular (BASSO et al., 2008; ZHAO; BAI, 2009). Além disso, o fermento torna-se totalmente vulnerável à contaminação microbiana, principalmente por bactérias e leveduras nativas que acompanham a matéria-prima utilizada na produção de etanol (MOREIRA et al., 2013).

Conforme ressalta Basso (2011), o estudo das características fermentativas das linhagens selvagens isoladas de processos industriais permite a seleção de cepas apropriadas à fermentação com reciclo, a fim de se obter linhagens com alto rendimento em etanol, baixa formação de glicerol, não floculante, não formadora de espuma, com alta viabilidade celular e com altos conteúdos celulares de trealose.

De acordo com Lopes et al. (2016), as linhagens industriais de grande importância para a produção de etanol no Brasil são PE-2 (Usina da Pedra), CAT-1

(Usina Catanduva), FT858L e Fermel (Fermentec), BG-1 (Usina Barra Grande) e SA-1 (Usina Santa Adélia). Os mesmos autores ressaltam que a complexidade do genoma das linhagens industriais representa uma nova oportunidade para selecionar variantes com combinações infinitas de genes em diferentes processos de fermentação.

3.3 *Dekkera bruxellensis* e produção de fenóis voláteis

De acordo com Cabrini e Gallo (1999), levedura contaminante é qualquer levedura presente no processo fermentativo que não seja aquela selecionada para a condução da produção, levando a problemas operacionais e aumentando o tempo de fermentação. As leveduras dos gêneros *Dekkera* e *Brettanomyces* são consideradas leveduras contaminantes da fermentação etanólica (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2012; MENEHIN et al., 2013).

O gênero *Brettanomyces* se trata da forma imperfeita do gênero *Dekkera*, portanto não apresenta formação de ascósporos. Possuem como características células esferoidais a elipsoidais, cilíndricas ou alongadas. Na reprodução sexuada, os ascos possuem formato de chapéu ou esférico com uma borda tangencial. Cada asco contém de um a quatro ascósporos. A forma de reprodução assexuada se dá por brotamento multilateral (KREGGER VAN-RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990).

O gênero *Dekkera* tem como principal representante a espécie *Dekkera bruxellensis* (Van der WALT, 1984), que apresenta alta tolerância a etanol e é capaz de realizar fermentação etanólica, porém o faz mais lentamente que *S. cerevisiae*, no entanto consegue assimilar uma maior variedade de fontes de carbono (CONTERNO et al., 2006; WOOLFIT et al., 2007; PEREIRA et al., 2012), além da glicose, frutose, sacarose e etanol que estão presentes no meio. Quanto às fontes de nitrogênio, é capaz de assimilar o nitrato presente no mosto de cana-de-açúcar o que lhe confere vantagem no ambiente industrial uma vez que *S. cerevisiae* não é capaz de assimilá-lo (PITA et al., 2011).

Sabe-se que em sistemas com oxigênio disponível, *D. bruxellensis* é capaz de produzir quantidades significativas de ácido acético (CIANI; FERRARO, 1997; FREER, 2002), que é um inibidor do crescimento de *S. cerevisiae*. Entretanto, em condições industriais o nível de oxigênio é limitado, e dessa forma a produção de

ácido acético é praticamente nula, mas ainda assim a eficiência fermentativa do processo é prejudicada pela presença dessa levedura (BLOMQVIST et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Durante o processo de produção de etanol, principalmente em sistemas contínuos, o desenvolvimento da população de *Dekkera* pode aumentar mais rapidamente que a de *S. cerevisiae*, pois essa possui maior capacidade de adaptação e com maior eficiência ao substrato (SOUZA-LIBERAL et al., 2007).

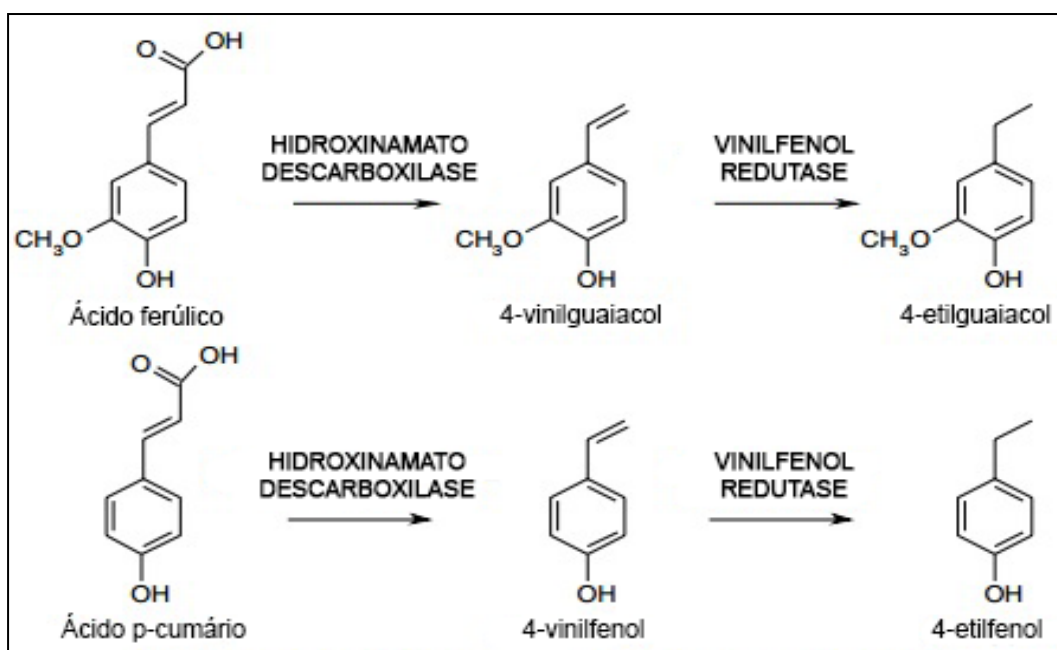
Assim como *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* também apresenta o chamado “Efeito *Crabtree* positivo” (PRONK et al., 1996; HAGMAN et al., 2014). Blomqvist et al. (2010) ressaltam que *D. bruxellensis* possui uma eficiência energética superior a de *S. cerevisiae*, o que leva a uma maior produção de biomassa e menor produção de glicerol. O glicerol é produzido sob condições de limitação de oxigênio, a fim de reoxidar NADH produzido durante o processo de oxidação. Alguns autores afirmam que as leveduras *Dekkera/Brettanomyces* não são capazes de produzir glicerol para restaurar o balanço NAD⁺/NADH e esta incapacidade levaria ao Efeito *Custer*, ou seja, a inibição temporária da fermentação em condições anaeróbias (WIJSMAN et al., 1984). Todavia, estudos mostram que *D. bruxellensis* produz glicerol, entretanto em quantidades bem menores quando comparada a *S. cerevisiae* (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; BLOMQVIST et al., 2010; BLOMQVIST; PASSOTH, 2015), e neste caso, o balanceamento da condição ‘redox’ ocorre na presença de nitrato, resultando em crescimento sob condições anaeróbias melhorando o rendimento fermentativo (GALAFASSI et al., 2013).

Há relatos que algumas estirpes de *Dekkera* conseguem equilibrar suas funções metabólicas por meio da produção de fenóis voláteis, especificamente pela redução de 4-vinilfenol em 4- etilfenol. Os resultados de Silva et al. (2011) sugerem que a conversão de 4-vinilfenol em 4-etilfenol catalisada pela vinilfenol redutase, pode levar à re-oxidação do NADH. Essa redução é uma fonte de NAD⁺ durante o crescimento deste microrganismo, mantendo assim o equilíbrio ‘redox’ das suas células nos vinhos tintos (FULGELSANG; EDWARD, 1997; ŠUĆUR et al., 2016).

O gênero *Dekkera* produz fenóis voláteis a partir de ácidos hidroxicinâmicos (CHATONNET et al., 1992; SUÁREZ et al. 2007) A origem desses compostos envolve a ação sequencial de duas enzimas sobre os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, p-cumárico ou ácido cafeico). Primeiro, a enzima hidroxicinamato descarboxilase (CD) converte o ácido hidroxicinâmico em hidroxiestirenos

(vinilfenóis), os quais são reduzidos a derivados de etil pela enzima vinilfenol redutase (VR), conforme Figura 2. As moléculas mais importantes na classe dos fenóis voláteis são 4-vinilfenol, 4-etilfenol, 4-vinilguaiaicol e 4-etilguaiaicol (CHATONNET et al., 1992; EDLIN et al., 1995).

Figura 2. Formação de etilfenóis a partir dos precursores hidroxicinâmicos (SUÁREZ et al., 2007).



Determinadas concentrações destes compostos em vinhos, onde essas leveduras são também importantes contaminantes, estão associadas a impactos negativos sobre as características sensoriais, principalmente a presença de odores desagradáveis como notas de "couro", "suor de cavalo", "animal" e "medicinal", cuja deterioração ocorre durante o armazenamento do produto (CHATONNET et al., 1995; MILHEIRO et al., 2017). Em vinhos, o limiar de percepção sensorial para fenóis voláteis foram estimados em 0,72 mg/L para 4-VF e 4-VG em vinhos brancos, e em 0,42 mg/L para 4-EF e 4-EG em vinhos tintos (ŠUĆUR et al., 2016).

Godoy et al. (2009), estudando diferentes isolados de *D. bruxellensis*, verificaram que a atividade da CD foi comum a todos os isolados, no entanto, a atividade da VR foi detectada em baixa porcentagem nas linhagens analisadas, o

que evidencia diferenças entre isolados de *D. bruxellensis* quanto à produção dessas enzimas. De acordo com Gerbeaux et al. (2000), a formação destes compostos depende da presença dos precursores e é proporcional ao tamanho da população da levedura.

Os compostos fenólicos são característicos de plantas, pois estão envolvidos no suporte e proteção dos tecidos. Os ácidos ferúlico e p-cumárico existem em gramíneas e realizam ligações cruzadas entre os polímeros de lignina e hemicelulose (PANAGIOTOU et al., 2007).

Estudos relatam a presença de ácidos hidroxicinâmicos em caldo de cana-de-açúcar e melão (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SANTOS, 2014). Silva (2018), avaliando a atividade enzimática das enzimas CD e VR de três linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica, verificou que as mesmas apresentaram atividade enzimática superior às linhagens isoladas do vinho. Comparadas à essas, as *D. bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica possuem uma atividade média de CD 16,5 vezes maior e uma atividade média de VR 2,5 vezes maior. O mesmo autor também encontrou concentrações de 4-etilfenol (4-EF) na ordem de 9,47 mg/L em condições de fermentação com reciclo celular, já a produção de 4-vinilfenol (VF) foi menor ou igual à 6,5 mg/L, 4-vinilguaiacol (VG) menor ou igual a 0,6 mg/L enquanto a produção de 4-etilguaiacol (EG) foi menor que 2,5 mg/L.

3.4 Compostos fenólicos e fatores que afetam a fermentação

Muitos são os fatores que podem afetar as leveduras no processo fermentativo. Conforme Paraluppi (2017), o caldo processado ao longo da safra passa por alterações de seus componentes fazendo assim as células de leveduras passarem por grandes oscilações fisiológicas, devido a sua inconstância na composição nutricional. Outros fatores correspondem à variação de osmolaridade, pH, temperatura, disponibilidade nutricional, densidade e teor de etanol que podem interferir diretamente no metabolismo da células e por consequência no rendimento fermentativo industrial (SOUZA et al., 2015).

Compostos fenólicos também são conhecidos por afetar de forma negativa o metabolismo das leveduras durante a fermentação alcoólica, prejudicando a viabilidade, aumentando o tempo de fermentação, reduzindo o consumo de

açúcares e provocando alterações na composição do destilado (POLAKOVIC et al., 1992; NARENDRANATH et al., 2001; COLOMBI et al., 2017).

Neste contexto, a presença de tais compostos durante o processo de produção do etanol pode levar à inibição do crescimento e fermentação de *S. cerevisiae*, pois afeta diretamente a integridade da membrana celular interferindo, assim, na sua capacidade de servir como barreira seletiva e matriz enzimática (HEIPIEPER et al., 1994). Além disso, a presença de mais de um inibidor de microrganismos no meio pode resultar em um efeito sinérgico ou antagônico a depender da interação dos inibidores presentes (PALMQVIST et al., 1999; KLINKE et al., 2004).

Ding et al. (2011) estudaram o efeito da interação de três inibidores (furfural, fenol e ácido acético) sobre células de *S. cerevisiae* durante a fermentação de etanol. Os autores observaram que os danos provocados pelo ácido acético foram aumentados pela presença de fenol e furfural, o que pode ser devido à perda da integridade da membrana e à inibição do metabolismo.

Martin e Jönsson (2003) compararam a resistência de onze linhagens industriais e laboratoriais de *S. cerevisiae* e duas cepas de *Zygosaccharomyces* a um coquetel inibidor contendo dois ácidos alifáticos (ácido fórmico e acético), dois furaldeídos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) e dois compostos fenólicos (ácido cinâmico e aldeído coniferílico), em diferentes concentrações (100%, 75%, 50%, 25% e 0). Os autores observaram que as cepas mais sensíveis produziram menos etanol quando a concentração do coquetel inibidor era de 25%, e completa inibição da produção quando se utilizou a concentração de 50%. Já a cepa mais resistente apresentou uma redução de 10% no rendimento em comparação ao controle (0) na presença do coquetel inibidor, quando este estava na concentração de 100%. Os autores concluíram que não houve efeito dos inibidores sobre a produtividade volumétrica de etanol, porém o rendimento em etanol e a produção de biomassa foram afetados por todas as concentrações testadas.

No contexto da indústria vinícola, tem sido investigada a influência de vários fatores sobre a produção de 4-etilfenol, como temperatura, teor de etanol, pH e fonte de carbono (DIAS et al., 2003; BARATA et al., 2008). Gerbeaux et al. (2000) relataram que *D. bruxellensis* varia na sua capacidade de produzir fenóis voláteis, todavia essa produção tende a ser maior em temperaturas mais elevadas. Barata et al. (2008) observaram que as temperaturas de incubação de 15, 20 e 25°C

permitiram crescimento celular e produção de 4-etilfenol, porém o aumento de temperatura para 36°C induziu a perda total da viabilidade de 10 cepas estudadas dentro de 12 h.

O efeito inibitório do etanol sobre o crescimento de *D. bruxellensis* e produção de 4-etilfenol foi avaliado por Dias et al. (2003), no qual foram testadas diferentes concentrações (4%, 6%, 8%, 10%, 12% e 13% v/v) de etanol. Como resultado, os autores observaram que o aumento das concentrações de etanol até 10% (v/v) resultou em menores taxas de crescimento, mas a quantidade máxima de 4-etilfenol produzido não foi consideravelmente afetada e que o crescimento e a produção de 4-etilfenol foram significativamente diminuídos a 12% (v/v) de etanol.

Na fermentação etanólica, o pH é um fator relevante dentro do processo, uma vez que o mesmo ocorre numa ampla faixa de valores, sendo adequado entre pH 4 e 5 (LIMA et al., 2001). A tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais, dado que valores muito baixos de pH podem levar à perda de nutrientes, aumentar a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao dióxido de enxofre (SO₂) (GOMES, 1988; BASSI, 2016). Em condições enológicas, *D. bruxellensis* pode ser favorecida durante o envelhecimento do vinho quando as concentrações de SO₂ são baixas, o pH é alto e quando as temperaturas estão acima de 15°C (SUÁREZ et al., 2007). Sob tais condições, elas crescem lenta mas consistentemente, usando etanol e vestígios residuais de açúcar como fontes de carbono (BENITO et al., 2009).

De acordo com Barata et al. (2008), o crescimento dessa levedura na presença de glicose e frutose é bastante semelhante. Nesse estudo, os autores testaram diferentes concentrações de glicose e frutose (0,02 g/L, 0,2 g/L, 1 g/L e 20 g/L) e verificaram que a partir de 0,2 g/L já é possível detectar a produção de 4-etilfenol. Dessa forma, quanto maior a disponibilidade de substrato para consumo, maior a produção de 4-etilfenol.

No que se refere à interação entre *S. cerevisiae* e fenóis voláteis no processo de produção de etanol pela fermentação, são escassos os estudos sobre os efeitos provocados por estes compostos, bem como a interação destes compostos com fatores como pH, concentração de etanol e concentração de açúcar.

Trabalho realizado por Silva (2018), estudando o efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da linhagem industrial de *S. cerevisiae* PE-2, não observou efeito inibitório do ácido p-cumárico, 4-vinilfenol e 4-

etilfenol nas concentrações de 4 a 20 mg/L, 2 a 10 mg/L e de 3 a 15 mg/L, respectivamente, sobre a velocidade específica de crescimento da levedura em meio YPD.

Concomitantemente estudos enológicos que buscam a minimização dos efeitos sensoriais provocados pela presença desses compostos fenólicos em vinhos, demonstram que células de *S. cerevisiae* possuem a capacidade de sorver tais compostos (GUILLOUX-BENATIER et al., 2001; CHASSAGNE et al., 2005). Sorção é um processo físico-químico pelo qual uma substância se liga à outra (FOMINA; GADD, 2009). O termo pode ser utilizado para retratar tanto a absorção como a adsorção de substâncias. A absorção envolve a incorporação de uma substância, em um estado físico, por outra em estado físico diferente; a adsorção caracteriza a aderência física ou ligação de íons e moléculas na superfície de um material necessariamente sólido (GADD, 2009). A sorção pode ser afetada por propriedades físico-químicas, como temperatura e pH, e a natureza da biomassa devido à complexidade do material biológico (GADD, 2009). A composição da parede celular de *S. cerevisiae* é formada por manoproteínas ligadas aos oligopolissacarídeos, quitina e glucanas que permanecem expostas no exterior da célula. As diferentes polaridades e a natureza hidrofílica ou hidrofóbica desses polímeros de parede definem a capacidade da levedura em reter ou adsorver diferentes moléculas (YOUNG, 1987; NOGUEIRA et al., 2008; MORATA et al., 2013)

Pradelles et al. (2008) mostraram que a sorção de 4-etilfenol pela levedura é influenciada pela origem da cepa, meio de cultura e composição da parede celular. Guilloux-Benatier et al. (2001) observaram que conteúdo de fenol volátil em vinho tinto contendo borras de levedura foi 3-5 vezes menor em comparação ao mesmo vinho envelhecido sem borras.

Chassagne et al. (2005) investigou a capacidade de sorção de 4-etilfenol e 4-etilguaiacol por *S. cerevisiae* sob a influência de parâmetros como teor de etanol, temperatura e pH. Os autores observaram que o aumento do pH (3 para 4), temperatura (10 para 15°C) e teor de etanol (10 para 15%) provocam um efeito negativo sobre a sorção. De acordo com os autores, uma explicação para a diminuição da sorção dos fenóis voláteis quando a temperatura e o pH aumentam deve-se à presença de ligações polares, além de interações hidrofóbicas entre os fenóis voláteis e a superfície da levedura. Quanto ao etanol, o aumento da

concentração tende a aumentar a solubilidade volátil na fase líquida (CHASSAGNE et al., 2003), e assim pode contribuir para a diminuição da sorção pela levedura.

Diante do exposto faz-se importante investigar os efeitos dos compostos fenólicos produzidos por *D. bruxellensis* na fermentação etanólica, uma vez que *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* compartilham o mesmo ambiente e são afetadas por diferentes condições de estresse, como pH, concentração de etanol, competição por substrato e produção de metabólitos que podem agir sobre uma e outra levando a diminuição do rendimento e da produtividade da fermentação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizada a linhagem de *S. cerevisiae* PE-2, isolada de um processo fermentativo da Usina da Pedra, Serrana/SP (gentilmente cedida pela Fermentec Piracicaba/SP). Esta linhagem vem sendo mantida em *slants* de YPD a 4°C.

A levedura pertence ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar - *Campus* de Araras.

4.2 Efeito do 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose sobre a velocidade específica de crescimento máxima da levedura *S. cerevisiae* PE-2

4.2.1 Preparo do inóculo

A levedura foi repicada para placas de Petri com meio YPD e incubada a 30°C por 5 dias. Duas alçadas das colônias crescidas foram transferidas para 2 Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio YPD líquido, sob agitação de 160 rpm, a 30°C por 24 h. Após esse tempo, o conteúdo dos Erlenmeyers foi centrifugado a 3600 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram

transferidas para 2 Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio YPD sob agitação de 160 rpm a 30°C por 24 h. Por fim, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 3600 rpm por 5 minutos e as células ressuspendidas em 9 mL de água destilada estéril. A quantidade de células por mL foi obtida por contagem em câmara de Neubauer e padronizada para 10^7 células vivas/mL, após coloração com solução de azul de metileno-citrato de sódio.

4.2.2 Planejamento experimental

Foi utilizado delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliação do efeito das variáveis independentes (4-etilfenol, pH, etanol e sacarose) sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Um conjunto de 28 ensaios foi realizado com as quatro variáveis, 1 ponto central e 4 pontos axiais.

A Tabela 1 apresenta os valores utilizados no planejamento e a Tabela 2 mostra a Matriz do Planejamento Composto Central com valores codificados e originais das variáveis em estudo.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados no DCCR para a avaliação da velocidade específica de crescimento máxima da levedura *S. cerevisiae* PE-2.

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	+1	+2
4-Etilfenol (mg/L)	5	7,5	10	12,5	15
pH	2,0	2,5	3,0	3,5	4
Etanol (%)	0	1,5	3	4,5	6
Sacarose (%)	1	5	9	13	17

Tabela 2. Matriz do DCCR com valores codificados e originais das variáveis em estudo.

Ensaio	4- etilfenol (mg/L)	pH	Etanol (%)	Sacarose (%)
1	7,5 (-1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	5 (-1)
2	7,5 (-1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	5 (-1)
3	7,5 (-1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	5 (-1)
4	7,5 (-1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	5 (-1)
5	7,5 (-1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	13 (+1)
6	7,5 (-1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	13 (+1)
7	7,5 (-1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	13 (+1)
8	7,5 (-1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	13 (+1)
9	12,5 (+1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	5 (-1)
10	12,5 (+1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	5 (-1)
11	12,5 (+1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	5 (-1)
12	12,5 (+1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	5 (-1)
13	12,5 (+1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	13 (+1)
14	12,5 (+1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	13 (+1)
15	12,5 (+1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	13 (+1)
16	12,5 (+1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	13 (+1)
17	10 (0)	2,0 (-2)	3 (0)	9 (0)
18	10 (0)	4,0 (+2)	3 (0)	9 (0)
19	10 (0)	3,0 (0)	0 (-2)	9 (0)
20	10 (0)	3,0 (0)	6 (+2)	9 (0)
21	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	1 (-2)
22	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	17 (+2)
23	5 (-2)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)
24	15 (+2)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)
25	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)
26	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)
27	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)
28	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)

4.2.3 Condução do experimento

Para a condução do experimento, inicialmente o meio de cultura de cada ensaio foi preparado em tubos falcon de 50 mL contendo meio YPS nas condições previamente definidas para concentração de sacarose (1, 5, 9, 13 e 17% p/v). O pH foi ajustado utilizando solução de ácido clorídrico (2,5 mol/L) para os valores definidos (2,0, 2,5, 3,0, 3,5 e 4,0). Os tubos foram esterilizados a 120°C, 1 atm, por 15 minutos em autoclave. Após esterilização, a estes tubos foram acrescidos etanol absoluto (Dinâmica®, 99,9%) na concentração definida para cada ensaio (0, 1,5, 3, 4,5 e 6% v/v) e 1 mL da solução estoque de 4-etilfenol (Sigma-Aldrich®, grau de pureza 98%) em concentração determinada para obter a concentração final desejada (5, 7,5, 10, 12,5 e 15 mg/L). O volume final do meio de cultura de cada ensaio no tubo falcon foi de 10 mL, adicionando meio de cultura YPS estéril respectivo para completar o volume, quando necessário. Desta forma, foram preparados 28 meios de cultura distribuídos em tubos falcon, um para cada ensaio. As concentrações finais dos meios de cultura para cada ensaio para 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose estão demonstradas na Tabela 2.

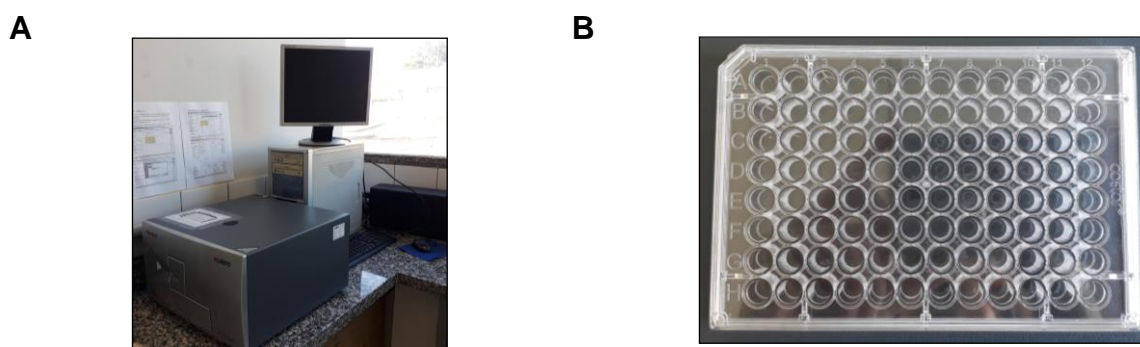
As curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 foram obtidas utilizando-se leitora de microplacas Tecan Infinite® M200 (Figura 3a) e microplaca estéril modelo “Costar” com 96 poços (Figura 3b). Aos poços da microplaca foram adicionados assepticamente 180 µL de meio estéril de cada ensaio de acordo com o planejamento experimental descrito na Tabela 2; e 20 µL do inóculo de *S. cerevisiae* (concentração final de 10⁶ células/mL). Foram realizados seis tratamentos controle: meio YPS com 17%, 13%, 9%, 5% e 1% de sacarose sem inoculação da levedura; e meio YPD com inoculação da levedura. Os tratamentos foram realizados em triplicata.

A microplaca foi levada à leitora de microplacas e incubada a 30°C e 160 rpm de agitação (aproximadamente 5 mm de amplitude orbital) por 24 horas. O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorbância a 600 nm a cada 15 minutos. Foi calculada a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max} , h⁻¹) por meio da regressão linear dos dados de ln da absorbância X tempo na fase exponencial, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica de crescimento máxima.

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância para a variável resposta (velocidade específica de crescimento

máxima), Diagrama de Pareto e Metodologia de Superfície de Resposta utilizando o programa *Statistica* 7.0.

Figura 3. Leitora de microplacas Tecan Infinite® M200 (A) e microplaca utilizada nos experimentos (B).



4.3 Efeito do 4-etilfenol sobre a capacidade fermentativa da levedura *S. cerevisiae* PE-2

4.3.1 Preparo do inóculo

As leveduras foram repicadas para placas de Petri com meio YPD e incubadas a 30°C por 5 dias. Duas alçadas das colônias crescidas foram transferidas para 5 erlenmeyers de 50 mL com 25 mL de meio YPD líquido, sob agitação de 160 rpm, a 30°C por 18 h. Após esse tempo, o conteúdo dos Erlenmeyers foi centrifugado a 3600 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para 5 Erlenmeyers de 100 mL com 50 mL de meio YPD sob agitação de 160 rpm a 30°C por 18 h. Posteriormente, o conteúdo dos Erlenmeyers foi centrifugado a 3600 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para 5 Erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de meio YPD sob agitação de 160 rpm a 30°C por 18 h.

Por fim, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 3600 rpm por 5 minutos e as células ressuspensas em 80 mL de meio YPS com 17% de sacarose a pH 4,5. A quantidade de células por mL foi obtida por contagem em câmara de Neubauer e padronizada para 10⁹ células vivas/mL.

4.3.2 Condução do experimento

Os testes fermentativos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL (tamponados com algodão) com 180 mL de meio de fermentação (YPS 17% sacarose, pH 4,5) acrescidos de 20 mL do inóculo previamente preparado e diluído para uma concentração final de 10^8 células/mL, perfazendo um volume final de 200 mL.

Foram avaliadas duas concentrações de 4-etilfenol (10 mg/L e 20 mg/L), adicionadas assepticamente no início da fermentação ou após 4 horas do início da fermentação. Foi também realizado um tratamento controle sem adição de 4-etilfenol.

Os ensaios foram realizados em triplicata, mantidos em shaker a 30°C com agitação de 160 rpm, por 12 horas. Foram retiradas alíquotas de 15 mL de 4 em 4 horas (0, 4, 8 e 12 horas). As amostras de 4 h de fermentação foram retiradas antes da adição do 4-etilfenol nos tratamentos em que esse composto foi adicionado após 4 h de fermentação. Desta alíquota utilizou-se 1 mL para contagem de células em microscópio, o restante da amostra foi centrifugado a 3600 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação foram coletados 14 mL do sobrenadante para análise de pH, etanol e açúcares redutores totais (ART).

4.3.3 Análises das amostras

O número de células e a viabilidade celular foram determinados por meio da contagem das células em microscópio utilizando câmara de Neubauer com solução de azul de metileno-citrato de sódio como corante segundo Lee, Robinson e Wang (1981). O cálculo do número de células e da viabilidade foram feitos da seguinte forma:

$$N^{\circ} \text{ células (mL)} = (n^{\circ} \text{ células vivas}/5) \times 25 \times 10^4 \times \text{Diluição}$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ de células vivas}}{n^{\circ} \text{ células vivas} + n^{\circ} \text{ células mortas}} \times 100$$

O pH do sobrenadante foi obtido com o auxílio do pH-metro digital MS Tecnopon mPA210.

A concentração de ART dos sobrenadantes foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS), segundo metodologia de Miller (1959). Foi transferido 1 mL de cada amostra para balões volumétricos de 100 mL, sendo em seguida, adicionados 30 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e homogeneizado. Os balões foram levados para banho-maria a 65°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas em água corrente e em seguida adicionados 2,8 mL de solução de NaOH 12 mol/L e completado o volume do balão até o menisco com água destilada.

Foi retirado 1 mL de cada solução preparada transferindo-se para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, tendo no total 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Os tudo foram homogeneizados por 5 segundos em vórtex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital Bio-Mate® (Analítica). O mesmo procedimento foi feito utilizando-se água ao invés da amostra para se obter o branco da reação, que foi utilizado como referência para calibrar o aparelho. A curva padrão foi elaborada a partir da leitura da absorbância de 10 soluções de glicose com concentrações equidistantes de 0,12 a 1,2 g/L ($R^2 = 0,9937$). A concentração de ART nas amostras foi calculada com base na equação:

$$ART \text{ (mg/mL)} = \frac{(\text{Absorbância da amostra}_{540\text{nm}} + 0,0369) \times \text{diluição da amostra}}{0,7321}$$

Para a determinação do teor alcoólico, inicialmente as amostras foram filtradas em membrana porosidade 0,45 µm e em seguida o etanol foi quantificado por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (FID) GC-2010 Plus da marca SHIMADZU® e coluna Restek Stabilwax-DA (30m x 0,25mm x 0,25mm) nas seguintes condições: temperatura do injetor: 220°C; gás de arraste: Hélio; velocidade linear do gás de arraste: 20 cm/seg; taxa de *split*: sem *split*; temperatura do FID: 280°C; temperatura da coluna: 30°C por 5 minutos, incremento de 12°C/min até 100°C, seguido de incremento de 15°C/min até 165°C, seguido de incremento de 80°C até 230°C mantendo esta temperatura por 6 minutos.

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

$$Eficiência\ Fermentativa = \frac{\left[\left(\frac{Etanol}{ART\ Inicial - ART\ Final} \right) \times 100 \right]}{0,511}$$

4.3.4 Análise estatística

Os resultados dos testes fermentativos (contagem de leveduras, viabilidade, pH, etanol, ART e eficiência fermentativa) foram submetidos a análise de variância (ANOVA). Para esta análise, os dados de contagem de leveduras foram transformados em logaritmo; os dados de viabilidade e eficiência (valor da porcentagem/100) foram transformados em arco seno da raiz de x. Em caso de diferença estatística significativa, as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software R.

4.4 Meios e soluções utilizados

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados por autoclavagem a 120°C, 1 atm por 15 minutos.

Meio YPD

Composto de 1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona e 2% (p/v) de glicose. Para meio sólido acrescentou-se 2% (p/v) de ágar.

Meio YPS

Composto de 1% (p/v) de extrato de levedura, 2% (p/v) de peptona e sacarose de acordo com a Tabela 1 (para os experimentos do item 4.2) ou 17% (p/v) para os testes fermentativos (item 4.3). O pH do meio foi ajustado com solução de ácido clorídrico de acordo com os valores da Tabela 1 para os experimentos do item 4.2 e para 4,5 para os experimentos do item 4.3.

Solução de 4-etilfenol

Para o experimento do item 4.2, inicialmente foi preparada uma solução estoque de 150 mg/L (15 mg de 4-etilfenol em 100 mL de água destilada estéril). A partir dessa solução estoque inicial, foram preparadas as soluções estoque com 50, 75, 100 e 125 mg/L de 4-etilfenol de acordo com Tabela 3. Aos tubos falcon preparados com o meio de cultura conforme Tabela 2, foi adicionado 1 mL das soluções estoque nas concentrações de 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L para obter a concentração final de 5, 7,5, 10, 12,5 e 15 mg/L de 4-etilfenol, respectivamente.

Tabela 3. Volumes e concentrações das soluções estoque de 4-etilfenol utilizados no experimento de crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 realizado na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.

Volume da solução estoque inicial ¹ (mL)	Volume de água destilada estéril (mL)	Concentração da solução estoque (mg/L)
8,3	1,7	125
6,7	3,3	100
5	5	75
3,3	6,7	50

¹ Solução estoque inicial: 150 mg/L

Para os teste fermentativos (item 4.3), foram preparadas duas soluções estoque por meio da dissolução de 0,1 g de 4-etilfenol em um volume de 50 mL de água destilada estéril (2000 mg/L) e de 0,2 g de 4-etilfenol em um volume de 50 mL de água destilada estéril (4000 mg/L). Ao meio de fermentação foi acrescentado 1 mL da solução estoque 2000 mg/L para obter a concentração final de 10 mg/L de 4-etilfenol, e de 1 mL da solução estoque 4000 mg/L para obter a concentração final de 20 mg/L de 4-etilfenol.

Solução estoque de ADNS

Pesou-se 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico e dissolveu-se em 150 mL de água destilada a 45°C, sendo essa a solução A. Separadamente pesou-se 150 g de tartarato de sódio e potássio e dissolveu-se em 100 mL de solução NaOH 2N recém

preparada a 40°C, sendo essa a solução B. Juntou-se ambas as soluções e completou-se o volume para 500 mL, sendo que ao final a mesma deve ser límpida e apresentar coloração alaranjada. Armazenou-se a solução em frasco escuro e envolto em papel alumínio por no máximo seis meses.

Solução azul de metileno-citrato de sódio

Dissolveu-se 0,01 g de azul de metileno e 2,0 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada.

Solução salina

Dissolveu-se 8,5 g de NaCl em 1 litro de água destilada.

Solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2 mol/L)

Adicionou-se cautelosamente 26,63 mL de ácido sulfúrico concentrado em um balão de 500 mL contendo 100 mL de água destilada. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 500 mL.

Solução de ácido clorídrico (HCL 2,5 mol/L)

Adicionou-se cautelosamente 38,65 mL de ácido sulfúrico concentrado em um balão de 500 mL contendo 100 mL de água destilada. Após o resfriamento, o volume foi ajustado para 500 mL.

Solução de hidróxido de sódio (NaOH 12 mol/L)

Pesou-se 240 g de hidróxido de sódio que foram colocados em béquer de 600 mL adicionando 300 mL de água destilada cuidadosamente. Aguardou-se o resfriamento para completar a solução para 500 mL, a mesma foi armazenada em frasco plástico.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose sobre a velocidade específica de crescimento máxima da levedura *S. cerevisiae* PE-2

O planejamento experimental completo 2^4 avaliou o efeito de quatro variáveis independentes: concentração de 4-etilfenol (5, 7,5, 10, 12,5, 15 mg/L), pH (2, 2,5, 3, 3,5 e 4), concentração etanol (0, 1,5, 3, 4,5 e 6%) e concentração de sacarose (1, 5, 9, 13, 17%) sobre a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2. As escolhas dos valores e concentrações para pH, etanol e sacarose foram baseadas em condições encontradas no processo fermentativo, e as concentrações de 4-etilfenol foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos por Silva et al. (2018).

Os valores utilizados para cada fator da matriz do DCCR foram apresentados na Tabela 2. Apresenta-se na Tabela 4 a matriz dos ensaios do DCCR com os resultados obtidos para a variável velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) em cada ensaio realizado.

Tabela 4. Valores codificados e nominais utilizados no DCCR para as quatro variáveis estudadas (4-etilfenol, pH, etanol e sacarose) e resposta obtida (velocidade específica de crescimento máxima).

Ensaio	4-etilfenol (mg/L)	pH	Etanol (%)	Sacarose (%)	Velocidade (μ_{max}, h⁻¹)¹
1	7,5 (-1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	5 (-1)	0,444
2	7,5 (-1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	5 (-1)	0,341
3	7,5 (-1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	5 (-1)	0,275
4	7,5 (-1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	5 (-1)	0,161
5	7,5 (-1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	13 (+1)	0,114
6	7,5 (-1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	13 (+1)	0,326
7	7,5 (-1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	13 (+1)	0,194
8	7,5 (-1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	13 (+1)	0,216
9	12,5 (+1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	5 (-1)	0,409
10	12,5 (+1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	5 (-1)	0,353
11	12,5 (+1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	5 (-1)	0,265
12	12,5 (+1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	5 (-1)	0,205
13	12,5 (+1)	2,5 (-1)	1,5 (-1)	13 (+1)	0,144
14	12,5 (+1)	3,5 (+1)	1,5 (-1)	13 (+1)	0,336
15	12,5 (+1)	2,5 (-1)	4,5 (+1)	13 (+1)	0,180
16	12,5 (+1)	3,5 (+1)	4,5 (+1)	13 (+1)	0,249
17	10 (0)	2,0 (-2)	3 (0)	9 (0)	0
18	10 (0)	4,0 (+2)	3 (0)	9 (0)	0,374
19	10 (0)	3,0 (0)	0 (-2)	9 (0)	0,417
20	10 (0)	3,0 (0)	6 (+2)	9 (0)	0,227
21	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	1 (-2)	0,251
22	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	17 (+2)	0,321
23	5 (-2)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,300
24	15 (+2)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,222
25	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,429
26	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,461
27	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,411
28	10 (0)	3,0 (0)	3 (0)	9 (0)	0,377

¹ Média de triplicatas

Os valores da velocidade específica de crescimento máxima da linhagem PE-2 para os diferentes níveis de 4-etilfenol pH, etanol e sacarose, variaram de um mínimo $\mu_{\max} = 0 \text{ h}^{-1}$ no Ensaio 17, sob condições de pH 2, até um máximo de $\mu_{\max} = 0,444 \text{ h}^{-1}$ no Ensaio 1 nos níveis -1 para todos os parâmetros.

Os pontos centrais, ensaios 25, 26, 27 e 28, apresentaram velocidade específica de crescimento máxima de 0,429, 0,461, 0,411 e 0,377 h^{-1} , respectivamente. Essa proximidade nos valores representa boa reprodutibilidade dos ensaios realizados, trazendo maior confiabilidade no método empregado.

Observou-se nos ensaios 5 e 13 que a redução do pH e aumento da concentração de sacarose provocou um efeito negativo sobre a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max} = 0,114 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{\max} = 0,144 \text{ h}^{-1}$ respectivamente), enquanto que nos ensaios 1 e 9 onde a concentração de sacarose foi reduzida, houve um aumento na velocidade específica de crescimento máxima, $\mu_{\max} = 0,444 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{\max} = 0,409 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Analisando o Ensaio 19, observa-se que com a redução na concentração de etanol a velocidade específica de crescimento máxima é aumentada. Já no ensaio 20 realizado com a maior concentração de etanol proposta, houve um decréscimo na velocidade específica de crescimento máxima.

Os ensaios 23 e 24 apresentaram a menor e a maior concentração de 4-etilfenol testada, respectivamente, onde observa-se uma queda na velocidade específica de crescimento máxima quando na maior concentração (15 mg/L), de 0,300 h^{-1} para 0,222 h^{-1} . No entanto, é válido ressaltar que os demais parâmetros estão no nível central, cuja velocidade específica de crescimento máxima chegou a $\mu_{\max} = 0,461 \text{ h}^{-1}$, podendo-se concluir que a presença de 4-etilfenol pode alterar o meio e provocar algum efeito sobre a variável resposta.

O Diagrama de Pareto, com os efeitos estimados das variáveis independentes sobre a variável resposta velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}, \text{h}^{-1}$), é apresentado na Figura 4.

O Diagrama de Pareto mostra um efeito estatístico significativo para os parâmetros pH (linear e quadrático), etanol (linear), 4-etilfenol (quadrático), sacarose (quadrático) e interação pH e sacarose (linear).

A partir dos resultados obtidos foi determinado o coeficiente de regressão para as variáveis analisadas. Analisando a Tabela 5, pode-se verificar por meio do *p*-valor que, como já observado no Diagrama de Pareto, a variável com maior efeito

sobre a velocidade específica de crescimento máxima é o pH. O efeito da concentração de 4-etilfenol, etanol e sacarose também apresentou um valor de p significativo, inferiores ao nível de significância de 0,05.

Figura 4. Diagrama de Pareto com os efeitos das variáveis independentes sobre a variável resposta velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) da linhagem *S. cerevisiae* PE-2. O grau de confiança utilizado foi de 95% e o valor de significância de $p=0,05$.

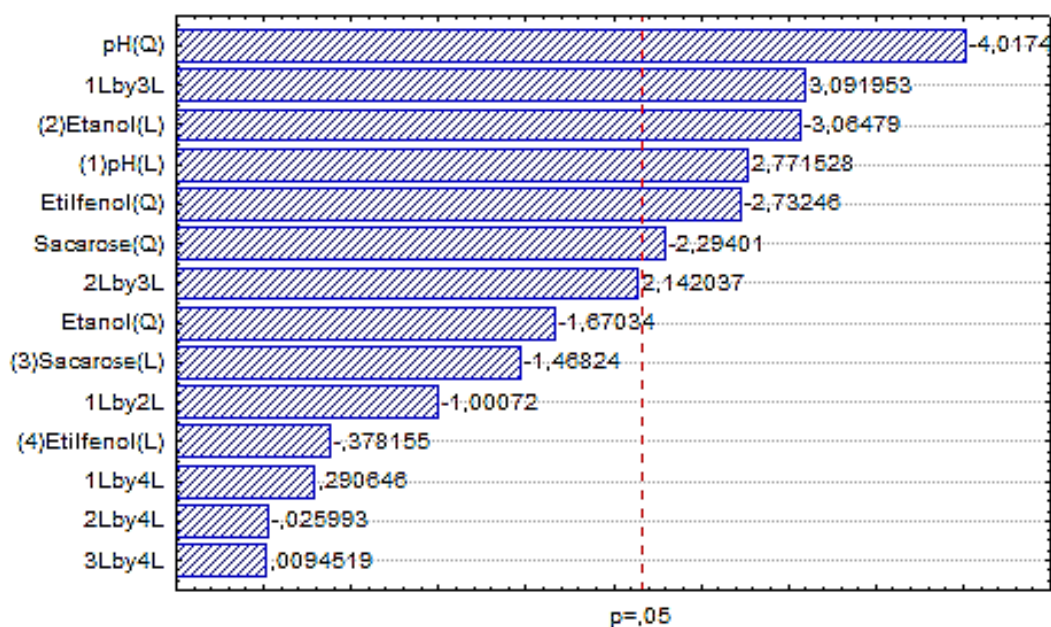


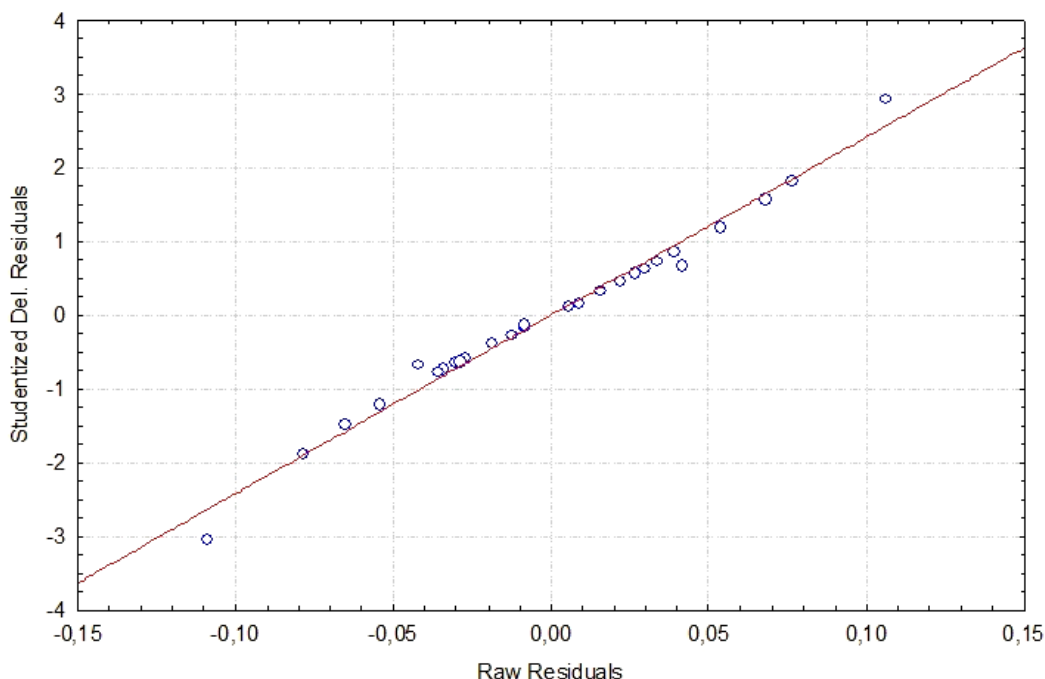
Tabela 5. Coeficientes de regressão para a variável velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) de PE-2.

Variável	Coeficiente	Erro padrão	T (13)	p-valor
MÉDIA	0,4199	0,0352	11,9070	0,0000
X ₁ (L)	-0,0399	0,0143	2,7715	0,0158
X ₁ (Q)	-0,0578	0,0143	-4,0174	0,0014
X ₂ (L)	-0,0441	0,0143	-3,0647	0,0090
X ₂ (Q)	-0,0240	0,0143	-1,6703	0,1187
X ₃ (L)	-0,0211	0,0143	-1,4682	0,1658
X ₃ (Q)	-0,0330	0,0143	-2,2940	0,0390
X ₄ (L)	-0,0054	0,0143	-0,0378	0,7114
X ₄ (Q)	-0,0393	0,0143	-2,7324	0,0171
X ₁ X ₂	-0,0176	0,0176	-1,0007	0,3352
X ₁ X ₃	0,0545	0,0176	3,0919	0,0085
X ₁ X ₄	0,0051	0,0176	0,2906	0,7759
X ₂ X ₃	0,0377	0,0176	2,1420	0,0517
X ₂ X ₄	-0,0004	0,0176	0,0259	0,9796
X ₃ X ₄	0,0001	0,0176	0,0094	0,9926

Legenda: X₁: pH; X₂: etanol; X₃: sacarose; X₄: 4-etilfenol; L, termos lineares; Q, termos quadráticos

Os valores obtidos pela ANOVA para os dados fornecidos pelo DCCR apresentaram uma variação explicada (R^2) significativa de 80,86 %. Pela Figura 5 pode-se observar que os erros do ajuste estão distribuídos em torno da reta, o que indica normalidade para a variável resposta.

Figura 5. Distribuição dos resíduos em torno da reta para a resposta.



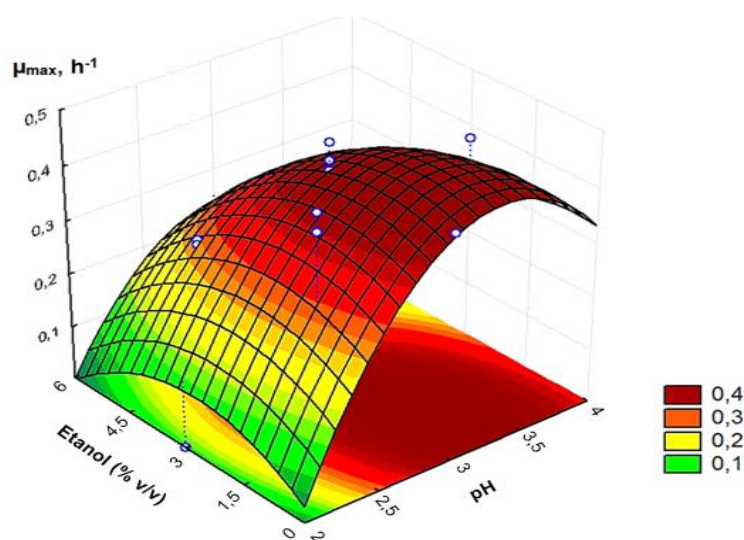
Com os parâmetros 4-etilfenol, pH, etanol e sacarose obteve-se as superfícies de resposta que descrevem o comportamento da levedura PE-2 quanto à sua velocidade específica de crescimento máxima nas condições estudadas. Constatou-se que todos os tratamentos empregados apresentaram efeitos sobre a variável resposta. Para a maioria dos parâmetros as regiões compreendendo os níveis intermediários, circundadas pelos pontos centrais estão relacionadas à maior velocidade específica de crescimento máxima. Assim os níveis extremos que compõem o experimento foram responsáveis por um crescimento inferior para a linhagem estudada.

Analisando a superfície de resposta para pH e etanol (Figura 6) verifica-se que o pH tem grande influência sobre o crescimento quando comparado ao etanol. Observando as faixas, as zonas vermelhas são as que apresentam as maiores velocidades de crescimento, enquanto que as zonas entre as cores amarelo e verde indicam menor velocidade de crescimento.

Neste caso, para o parâmetro pH as faixas ótimas foram de pH 3 a 3,5, enquanto que para o etanol a concentração favorável foi de 3% de etanol. Efeitos negativos foram observados na condição de pH 2 com uma condição de ausência de etanol ou com 6% de etanol, ou seja, houve um efeito sobre a velocidade específica

de crescimento máxima, nessas condições. As variáveis pH e etanol influenciaram negativamente o crescimento da PE-2, indicando que os ambientes mais ácidos e com alta concentração de etanol simultaneamente podem levar ao decréscimo do crescimento.

Figura 6. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) em função do pH e concentração de etanol.



As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5. Nos mostos industriais os valores geralmente encontram-se na faixa entre pH 4,5 e 5,5 (LIMA et al., 2001). Entretanto, durante o processo fermentativo as células passam pela centrifugação e são lavadas com ácido sulfúrico diluído a pH 2,0-2,5 por 1-2 h, a fim de reduzir a contaminação bacteriana (AMORIM et al., 2011). Apesar dessas linhagens apresentarem tolerância a baixos valores de pH, as condições do meio externo provocam alterações no seu metabolismo como, maior dispêndio de energia direcionado para a manutenção do pH interno, diminuição da viabilidade celular e alterações na velocidade de crescimento das leveduras (LUDWIG et al., 2001; STECKELBERG, 2001). Valores muito baixos de pH estão associados a perda de nutrientes, aumento da sensibilidade ao etanol e ácidos orgânicos (GOMES, 1988).

Outro fator estressante são as elevadas concentrações de etanol no fim de cada ciclo fermentativo em torno de 8-12% (v/v) (BASSO et al., 2011), que estão associadas a efeitos tóxicos para as leveduras, dado que este pode atuar na

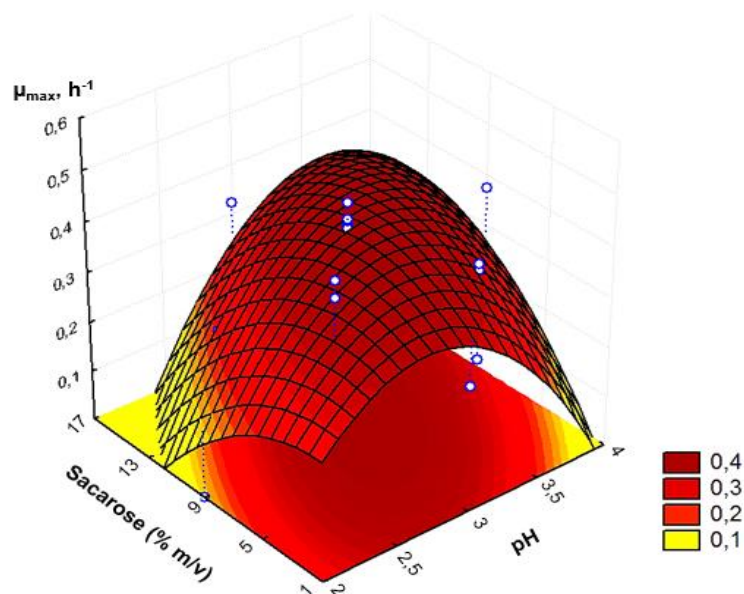
membrana plasmática, alterando sua polaridade e modificando sua fluidez (INGRAM, 1976). Por consequência, ocorre a queda da viabilidade celular, inibição do crescimento e inibição de vários sistemas de transportes, como o de aminoácidos e o transporte de hexoses. No entanto, o grau de inibição depende da linhagem da levedura utilizada e de outros fatores como temperatura, composição do mosto, presença de contaminantes e presença de subprodutos do processo fermentativo (TONOLI, 2017).

As leveduras *S. cerevisiae* são consideradas microrganismos “robustos”, pois são capazes de suportar condições drásticas de fermentação. Reis (2011), verificando a resistência a condições de estresse em linhagens de *S. cerevisiae* observou crescimento de PE-2 em pH 1,25 e 1,5, e em meios com 0 a 14,5% (v/v) de etanol. Também observou que, quando as células foram submetidas ao tratamento ácido não houve diminuição expressiva no crescimento e estabilidade das colônias.

Quando submetidas a condições de estresse, as leveduras desenvolvem rápida resposta molecular para se adaptar e se proteger dos efeitos de situações adversas. Essa resposta se dá por meio da síntese de proteínas específicas, aumento da trealose e glicerol, alteração na composição lipídica da membrana plasmática e da atividade da ATPase (BIRCH; WALKER, 2000).

Para o sinergismo pH e sacarose observou-se uma interação significativa. Analisando a superfície de resposta (Figura 7), é possível verificar que alta concentração de sacarose (17%) associada a pH 4 diminui a velocidade específica de crescimento máxima, enquanto que o ponto central é a melhor condição para ambos os parâmetros.

Figura 7. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) função do pH e concentração de sacarose.

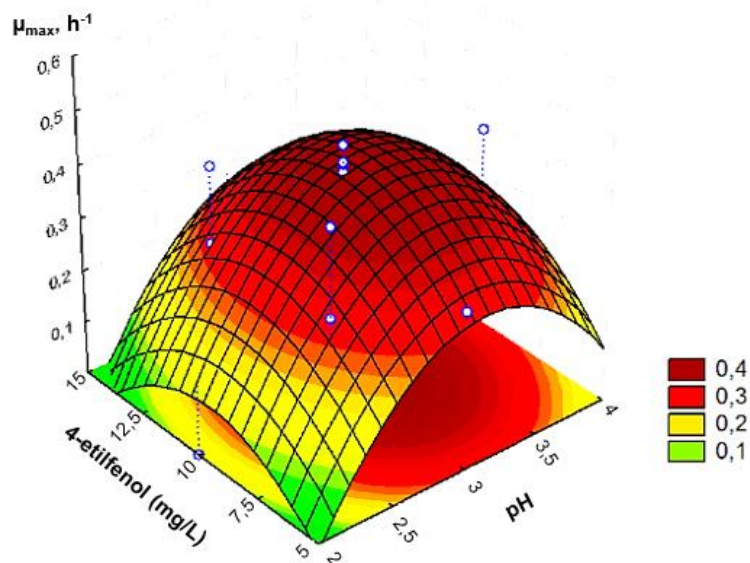


Essa condição pode ser explicada pela pressão osmótica ocasionada devido à alta concentração de sacarose presente. As leveduras utilizadas atualmente possuem limitada tolerância ao estresse por altas concentrações de açúcar, pois geralmente durante o processo de fermentação são submetidas a condições de concentrações totais de açúcar entre 5-7% (BASSO et al., 2011). A consequência da exposição a estresse osmótico é a perda de água pela migração do interior da célula para o exterior, fazendo com que a membrana plasmática sofra um turgor (MAGER et al., 2002). Esse fator age de forma sinérgica com o etanol, aumentando o sua toxicidade e como consequência há redução da viabilidade celular. Além disso, a pressão osmótica elevada pode aumentar a toxicidade de outros compostos presentes no meio, como o ácido lático que inibe o crescimento de *S. cerevisiae* (NGANG et al., 1989; GRAVES et al., 2006). Gutierrez (1991) ressalta que em condições de elevada concentração de sacarose, há produção de glicerol durante a fermentação etanólica, cujo efeito também é influenciada pela linhagem, pH e temperatura.

Analisando a superfície de resposta para a interação pH e 4-etilfenol (Figura 8) percebe-se que as faixas ótimas foram de pH 3 a 3,5, enquanto que para o 4-etilfenol o ponto central (10 mg/l) foi favorável ao crescimento. Todavia, pode-se

observar que os níveis extremos para o parâmetro 4-etilfenol foram correlacionados negativamente com a variável resposta.

Figura 8. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) função do pH e concentração de 4-etilfenol.



Neste caso, é possível correlacionar o efeito negativo da menor concentração de 4-etilfenol (5 mg/L) pela presença de um ambiente acidificado (pH 2), enquanto que a maior concentração de 4-etilfenol (15 mg/L) pode ter ocasionado a diminuição da velocidade específica de crescimento máxima devido aos efeitos tóxicos relacionados a presença de fenóis voláteis no meio.

Compostos fenólicos podem matar ou inibir o crescimento de microrganismos como bactérias, fungos ou protozoários. De acordo com Landete (2012), o nível de inibição é relacionado com a estrutura química do composto e a espécie do microrganismo.

Silva (2018) estudando o efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* PE-2, não observou efeito inibitório do ácido p-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol nas concentrações de 4 a 20 mg/L, 2 a 10 mg/L e de 3 a 15 mg/L, respectivamente, sobre a velocidade específica de crescimento da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2, porém não foram simuladas

condições que ocorrem na fermentação, como baixo pH, alta concentração de sacarose e presença de etanol.

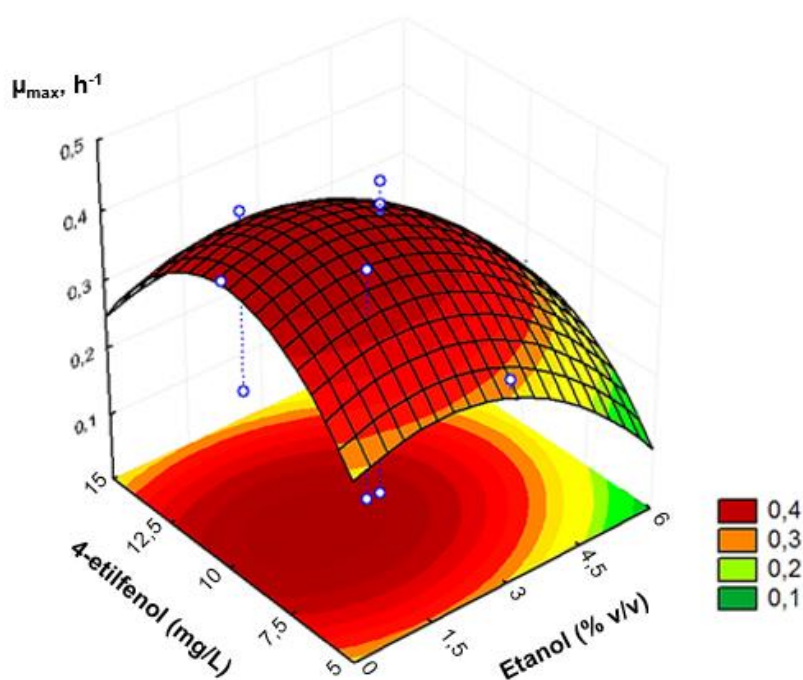
Sabel et al. (2017), avaliando o efeito de compostos fenólicos sobre o crescimento e viabilidade de leveduras e bactérias associadas ao vinho, observaram que em pH 3,5, a linhagem *S. cerevisiae* 16.1 mostrou inibição completa de crescimento apenas com 1 mg/mL de ácido ferúlico ou resveratrol enquanto as outras espécies *S. bayanus* HL77 e *Saccharomyces* HL78 foram altamente sensíveis aos compostos fenólicos, sendo inibidas pelo ácido p-cumárico, o ácido ferúlico e o siringaldeído. Esse trabalho é consistente com o estudo de Pastorkova et al. (2013), que observaram uma alta sensibilidade de leveduras na presença de ácidos hidroxicinâmicos.

Campos et al. (2009), estudando o efeito do ácidos hidroxicinâmicos (ácidos p-cumárico, cafeico e ferúlico) sobre a permeabilidade da membrana celular de bactérias do vinho observaram que estes induziram a maiores vazamentos de íons e maior influxo de prótons do que os ácidos hidroxibenzóicos. Entre os ácidos hidroxicinâmicos, o ácido p-cumárico mostrou possuir o efeito mais forte, levando a diminuição da viabilidade celular. Os mesmo autores ressaltam que, embora as concentrações de ácidos fenólicos utilizados no trabalho foram maiores do que os normalmente encontrados nos vinhos, é possível que fatores como pH mais baixos possam facilitar a difusão de compostos fenólicos por meio da membrana citoplasmática e também que outros agentes antimicrobianos podem ter efeitos sinérgicos com estes compostos sobre a membrana celular.

Adeboye et al. (2014) estudando a toxicidade de 13 compostos fenólicos sobre o crescimento de *S. cerevisiae* constataram que a indução de efeitos inibitórios é altamente variável e que os mesmos tem efeitos distintos sobre a formação de biomassa, produção de etanol, acetato e glicerol.

A superfície de resposta para a interação concentração de etanol e concentração 4-etilfenol (Figura 9) evidencia existir algum efeito sobre a velocidade específica de crescimento máxima de PE-2 quando na presença desses dois compostos. Para o parâmetro etanol a concentração favorável foi de 0 a 1,5%, enquanto que para o 4-etilfenol as concentrações 7,5, 10 e 12,5 mg/L não provocaram efeitos sobre a velocidade específica de crescimento máxima, nessas condições. A faixa que representa o efeito da concentração de etanol em sinergismo com a de 4-etilfenol na velocidade específica de crescimento máxima é de 0 a 3%.

Figura 9. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) função da concentração de etanol e concentração de 4-etilfenol.



Diferentemente da relação estabelecida entre pH e 4-etilfenol, a maior concentração deste último (15 mg/L) foi menos danosa que a maior concentração de etanol (6%). É importante ressaltar que em termos proporcionais a quantidade de 4-etilfenol é inferior à produção de etanol, entretanto foi suficiente para alterar o meio.

Num processo de fermentação onde a presença de 4-etilfenol é devido ao metabolismo de *D. bruxellensis*, a capacidade de produção deste composto é maior quando a concentração de etanol é baixa (SUÁREZ et al., 2007). Benito et al. (2009) verificaram que na ausência de outros fatores limitantes, *D. bruxellensis* D37 é incapaz de converter o ácido p-cumárico em 4-etilfenol quando a concentração de etanol é superior a 15% (v/v). Na concentração de 10% (v/v) há um atraso na formação de 4-etilfenol em mais de 3 dias em relação aos resultados para a concentração de 5% (v/v). Na ausência de etanol a produção de 4-etilfenol também foi atrasada. Tal fato pode indicar que a baixa concentração de etanol, mas não muito baixa, favorece o processo enzimático necessário para descarboxilação e/ou redução.

Ganga et al. (2011) também observaram que a presença de etanol no meio resulta em uma maior atividade da cumarato descarboxilase e metabolização do

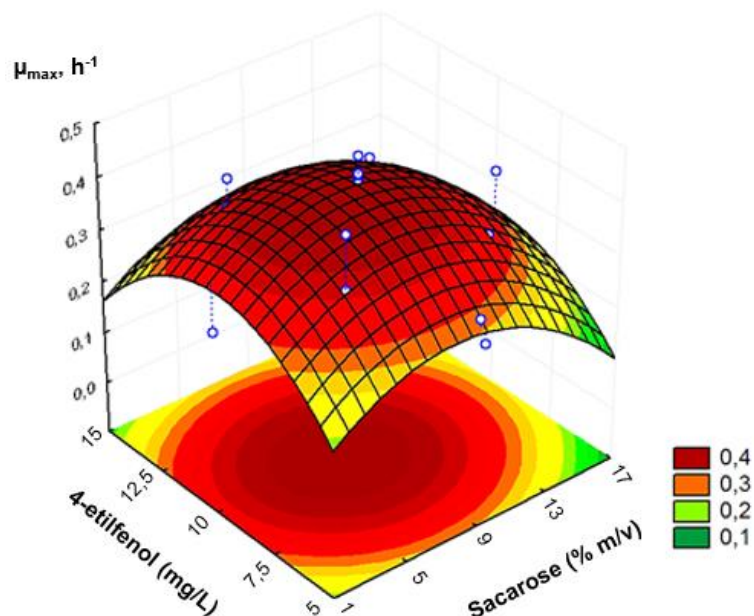
ácido p-cumárico pela levedura *D. bruxellensis*, no entanto de acordo com o estudo por eles realizado concentrações acima de 6,5% provocam redução da atividade da cumarato descarboxilase. Verificaram que a 22°C com 10% de etanol, a levedura metabolizou em média apenas 38% do ácido p-cumárico no meio de cultura, enquanto que com 3% de etanol, 74% do ácido p-cumárico inicial foi metabolizado.

Outros estudos relatam a capacidade de sorção de compostos fenólicos por meio da parede celular das leveduras. Salameh et al. (2008), estudando a cinética de conversão do ácido p-cumárico verificaram aumento da sorção por *Brettanomyces* sp. quando aumentado o nível da população. A perda dos ácidos hidroxicinâmicos em meio sintético pode ser explicada tanto pela sua instabilidade em alta temperatura, pela reação de esterificação com etanol ou pela capacidade das paredes celulares de levedura para adsorver esses compostos.

Nieto-Rojo et al. (2014) investigaram a cinética e termodinâmica de sorção de 4-etilfenol (4-EP) e 4-etilguaiacol (4-EG) por paredes celulares de *S. cerevisiae*, utilizando vinho sintético. Os resultados mostraram que a capacidade de sorção das paredes celulares para 4-EG foi maior que a de 4-EP. A retenção destes compostos foi pela sorção química específica por meio de ligações a lipídios residuais e interação com os grupos funcionais das manoproteínas e dos aminoácidos livres da superfície das paredes celulares.

Na superfície de resposta para sacarose e 4-etilfenol (Figura 10), verifica-se que os níveis extremos afetam negativamente a variável resposta. Nesse cenário o ponto central para ambos favorece a velocidade específica de crescimento máxima. O efeito combinado da concentração de sacarose e do 4-etilfenol que favorece a variável resposta indica uma faixa de 5 a 9% de sacarose para uma concentração de 10 mg/L de 4-etilfenol.

Figura 10. Velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) função da concentração sacarose e concentração de 4-etilfenol.



A fermentação com alta concentração de açúcar pode ser utilizada em escala industrial (PULIGUNDLA et al., 2011). Essa tecnologia proporciona níveis mais elevados de etanol e minimização dos custos de produção, em contrapartida, como mencionado anteriormente, em condições de alta concentração de sacarose a levedura do processo pode ser afetada pelo estresse osmótico e torna-se vulnerável aos efeitos provocados pela presença de etanol, e por consequência dos compostos fenólicos presentes no meio.

Os resultados obtidos mostraram que a velocidade específica de crescimento máxima (μ_{\max} , h^{-1}) de *S. cerevisiae* PE-2 é afetada pela presença de 4-etilfenol nas diferentes condições de pH, concentração de etanol e sacarose.

5.2 Efeito do 4-etilfenol sobre a capacidade fermentativa da levedura *S. cerevisiae* PE-2

Considerando os resultados obtidos no item anterior, em que o 4-etilfenol teve efeito sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae* em condições encontradas na fermentação etanólica (alta concentração de açúcar e etanol e baixo pH), foram realizados testes fermentativos de ciclo único de 12 horas em que o 4-etilfenol foi adicionado no início da fermentação e após 4h de fermentação, em concentrações de 10 mg/L e 20 mg/L. Silva et al. (2018) observaram produção de cerca de 10 mg/L de 4-etilfenol por uma linhagem de *D. bruxellensis* em melaço de cana-de-açúcar logo no primeiro ciclo de fermentação de 12h. Optou-se por adicionar o 4-etilfenol após 4h de fermentação na condição de simular uma possível contaminação por *D. bruxellensis* que apresentasse produção de 4-etilfenol dentro desse período de tempo. Dessa forma, o experimento objetivou avaliar o efeito da concentração do 4-etilfenol e do tempo de permanência do mesmo no meio de fermentação sobre os parâmetros fermentativos.

O número de leveduras em 12h de fermentação apresentou diferença estatística significativa a 5% de significância entre os tratamentos (Tabela 6). Os tratamentos T2 e T3 (4-etilfenol adicionado no início da fermentação) foram os que apresentaram a menor média quando comparado aos demais, indicando o efeito do 4-etilfenol quando adicionado no início do processo fermentativo (Tabela 7). A Figura 11 mostra o número de células da levedura ao longo de 12h de fermentação, podendo-se observar uma queda à medida que se aumentou a concentração de 4-etilfenol de 10 para 20 mg/L, principalmente quando colocado no início da fermentação.

Tabela 6. Análise da variância dos resultados do número de leveduras (células vivas/mL) em 12h de fermentação¹.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,267	0,006	29,97*
Resíduo	10	0,022	0,002	
Total	14	0,290	0,020	

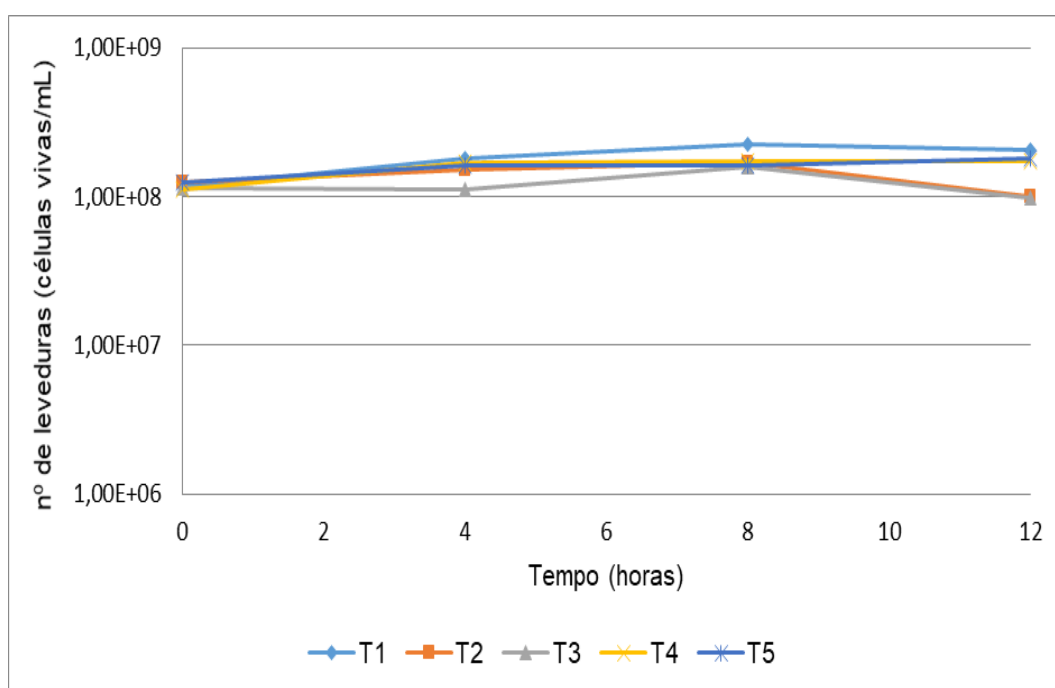
*significativo a 5%; ¹dados foram transformados para log

Tabela 7. Média e desvio-padrão dos números de leveduras (células vivas x 10⁸/mL) em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão ¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	2,05 ± 0,27 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	1,01 ± 0,08 b
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	0,99 ± 0,06 b
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	1,74 ± 0,27 a
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	1,79 ± 0,14 a

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 11. Número de leveduras (células vivas/mL) durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.



O número de células na fermentação sem adição de 4-etilfenol (controle) apresentou um aumento de 49% em relação à contagem inicial de células após 8 h de fermentação. Ao longo da fermentação, o número de leveduras foi sempre maior no experimento onde não foi adicionado 4-etilfenol, sendo maior a diferença entre os

valores comparando-se os tratamentos controle e aqueles em que o 4-etilfenol foi adicionado no início da fermentação. Os resultados mostraram também o efeito da concentração do 4-etilfenol, com inibição do crescimento da levedura até 4h de fermentação com 20 mg/L de 4-etilfenol adicionado no início da fermentação (Figura 11).

Com relação à viabilidade celular, não foi observada diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 8) em 12h de fermentação. Na fermentação sem adição de 4-etilfenol, a média da viabilidade em 12h de fermentação foi de 95,2%, enquanto que no ensaio com 20 mg/L de 4-etilfenol, tanto quando colocado no início (T3) como em 4h de fermentação (T5), houve uma diminuição (Tabela 9), porém não significativa.

Como pode ser observado na Figura 12, houveram oscilações nos valores de viabilidade celular ao longo da fermentação, com tendência à queda para todos os tratamentos, porém não foram observados valores abaixo de 93% ao final de 12h de fermentação.

Tabela 8. Análise da variância dos resultados de viabilidade celular (%) em 12h de fermentação¹.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,0223	0,0055	1,45 ^{ns}
Resíduo	10	0,0381	0,0038	
Total	14	0,0604	0,0043	

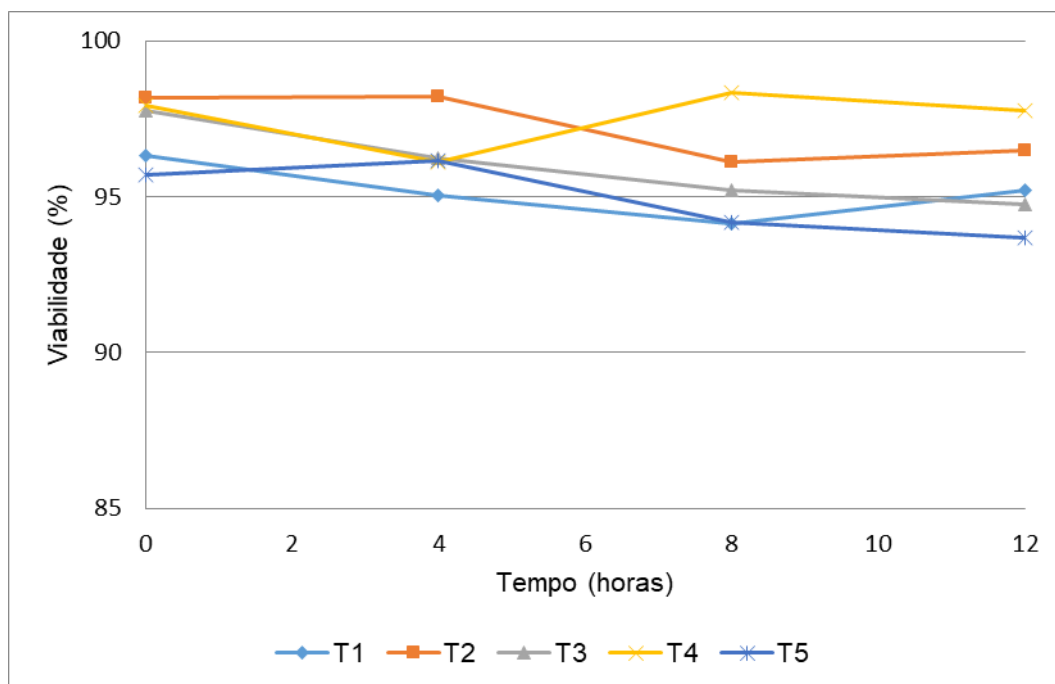
^{ns}não significativo a 5%; ¹dados foram transformados para arco seno da raiz de x.

Tabela 9. Média e desvio-padrão dos valores de viabilidade celular (%) em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	95,22 ± 0,39 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	96,47 ± 1,44 a
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	94,77 ± 4,06 a
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	97,77 ± 2,23 a
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	93,67 ± 2,86 a

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Figura 12. Viabilidade celular (%) das leveduras durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.



A análise estatística revelou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 10) para o teor alcoólico do meio de fermentação. Com a adição de 4-etilfenol, seja no início ou após 4h de fermentação, o teor alcoólico foi significativamente menor em relação ao tratamento sem adição de 4-etilfenol após 12h de fermentação (Tabela 11). A Figura 13 mostra a evolução do teor alcoólico ao longo de 12h de fermentação para cada um dos ensaios.

Tabela 10. Análise da variância dos valores de teor alcoólico (g/L) em 12h de fermentação.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	751,61	187,90	12,34*
Resíduo	10	152,17	15,21	
Total	14	903,78	90,37	

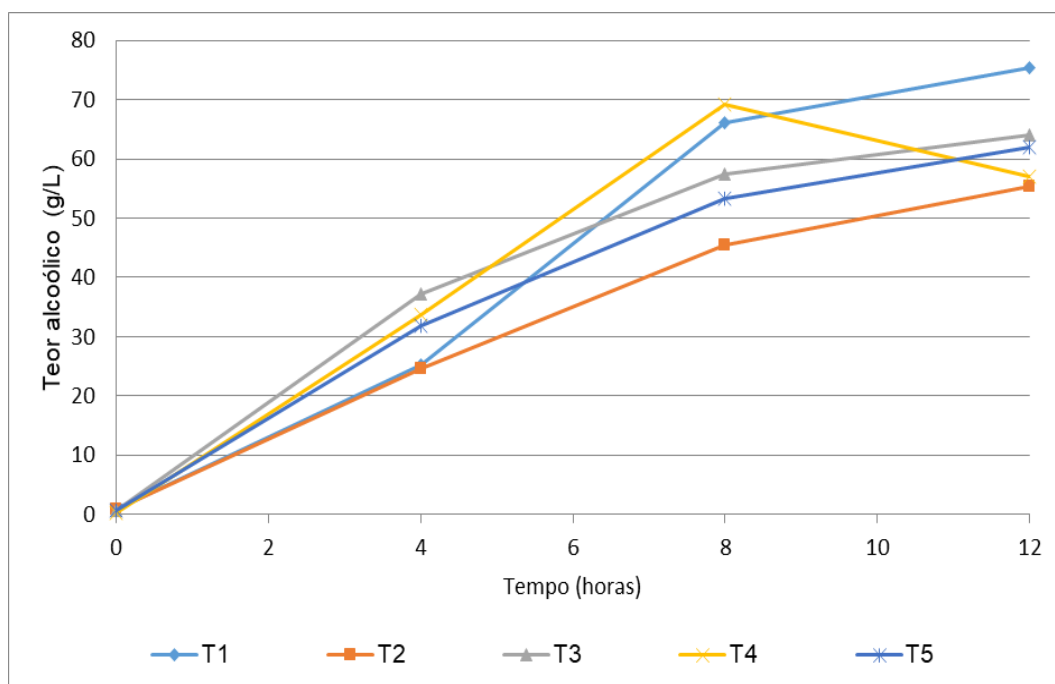
*significativo a 5%

Tabela 11. Média e desvio-padrão do teor alcoólico (g/L) em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão ¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	75,43 ± 1,90 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	55,33 ± 4,74 b
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	64,13 ± 1,34 b
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	57,07 ± 5,60 b
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	62,07 ± 4,11 b

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 13. Teor alcoólico (g/L) do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.



A análise estatística mostrou diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos para o valor de pH ao final de 12h de fermentação (Tabela 12). Nas fermentações com adição de 4-etilfenol, os valores de pH foram menores em comparação com a fermentação sem adição de 4-etilfenol, com exceção do tratamento onde 10 mg/L foram adicionados em 4h de fermentação. Todas as fermentações iniciaram com pH = 4,5 e após 4 horas de fermentação, observou-se uma queda para todos os tratamentos. Após 8h de fermentação, pode-se considerar que o pH manteve-se constante (Figura 14).

Tabela 12. Análise da variância dos valores de pH em 12h de fermentação.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,191	0,047	47,92*
Resíduo	10	0,010	0,001	
Total	14	0,201	90,378	

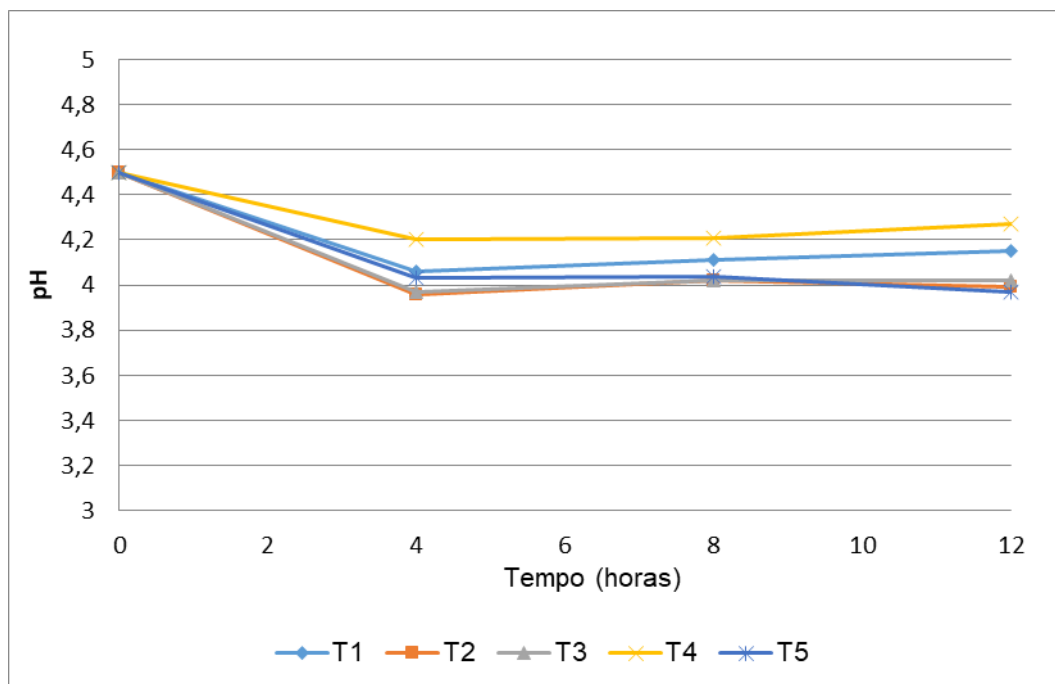
*significativo a 5%

Tabela 13. Média e desvio-padrão dos valores de pH em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	4,15 ± 0,02 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	3,99 ± 0,03 b
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	4,02 ± 0,02 b
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	4,27 ± 0,02 c
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	3,97 ± 0,06 b

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Figura 14. pH do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.



Os resultados de açúcar redutor total (ART) residual não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos ao final de 12h de fermentação (Tabelas 14 e 15). No entanto, pode-se observar na Figura 15 que o consumo do substrato se deu mais lentamente para os tratamentos em que foi adicionado o 4-etilfenol, principalmente na concentração de 20 mg/L do composto.

Tabela 14. Análise da variância dos valores de açúcar redutor total (ART; g/L) em 12h de fermentação.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,002	0,0005	0,13 ^{ns}
Resíduo	10	0,036	0,0036	
Total	14	0,038	0,0027	

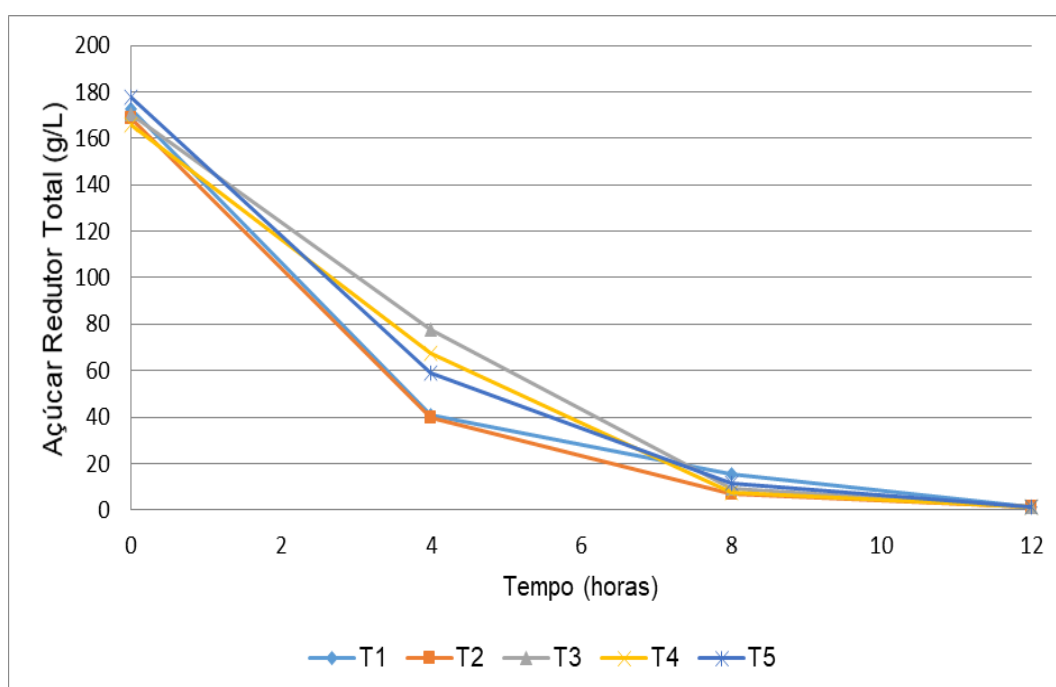
^{ns} não significativo a 5%

Tabela 15. Média e desvio-padrão dos valores de açúcar redutor total (ART, g/L) residual em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão ¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	1,11 ± 0,04 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	1,10 ± 0,06 a
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	1,09 ± 0,04 a
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	1,06 ± 0,08 a
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	1,10 ± 0,06 a

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Figura 15. ART residual (g/L) do meio durante fermentação em meio YPS, a 30°C, pH 4,5, 160 rpm de agitação. *Legenda:* T1: tratamento controle sem 4-etilfenol; T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h; T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h; T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h.



Em relação à eficiência fermentativa, foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos ao final de 12h de fermentação (Tabela 16). A média da eficiência fermentativa na fermentação sem adição de 4-etilfenol (86,16%) foi estatisticamente diferente das médias nas fermentações com adição de 4-etilfenol, seja no início quanto após 4h de fermentação (faixa de 64,72 a 74,11%).

Tabela 16. Análise da variância dos valores de eficiência fermentativa (%) em 12h de fermentação¹.

	Grau de Liberdade	SQ	QM	F
Tratamento	4	0,1223	0,0305	12,67*
Resíduo	10	0,0241	0,0024	
Total	14	0,1464	0,0104	

*significativo a 5% ¹dados foram transformados para arco seno da raiz de x.

Tabela 17. Média e desvio-padrão dos valores de eficiência fermentativa (%) em 12h de fermentação.

Tratamentos	Média e desvio-padrão¹
T1: Tratamento controle sem 4-etilfenol	86,16 ± 2,20 a
T2: 10 mg/L de 4-etilfenol em 0h	64,72 ± 5,53 b
T3: 20 mg/L de 4-etilfenol em 0h	74,11 ± 1,54 b
T4: 10 mg/L de 4-etilfenol em 4h	67,74 ± 6,64 b
T5: 20 mg/L de 4-etilfenol em 4h	68,84 ± 4,58 b

¹Médias dos tratamentos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Avaliando os resultados dos testes fermentativos em conjunto, verificou-se que o 4-etilfenol tem efeito sobre o processo fermentativo conduzido pela levedura *S. cerevisiae* PE-2. Houve efeito significativo da adição do 4-etilfenol sobre o número de leveduras, pH e teor alcoólico do meio de fermentação, resultando em queda na eficiência fermentativa. A velocidade de consumo de ART também foi influenciada pela presença de 4-etilfenol no meio de fermentação. Esses efeitos foram observados nas duas concentrações de 4-etilfenol testadas (10 e 20 mg/L), adicionadas tanto no início quanto ao final de 4h de fermentação. Embora o efeito tenha sido mais intenso na fermentação onde o 4-etilfenol foi adicionado no início da fermentação, essa é uma situação improvável de ocorrer no meio industrial. No entanto, a condição da fermentação com adição de 4-etilfenol após 4h de fermentação simula uma provável situação no meio industrial, considerando contaminação por *D. bruxellensis* e produção do composto nesse período de tempo. Silva et al. (2018) mostraram produção estabilizada de 4-etilfenol em 24h de fermentação em ciclo único, não sendo possível deduzir se a produção se inicia em tempo inferior à esse. Essa é uma informação importante para reforçar os resultados aqui obtidos.

O efeito do 4-etilfenol sobre a eficiência fermentativa pode ser explicado pela ação do composto diretamente sobre as células da levedura, afetando seu crescimento e estado fisiológico e conseqüentemente com efeito sobre a produção de etanol. Esse efeito pode ser potencializado pelo próprio etanol sendo produzido pela levedura no meio de fermentação. No item anterior, foi demonstrado que o 4-etilfenol apresenta maior efeito sobre a velocidade específica de crescimento máxima da levedura quanto maior a concentração de etanol do meio (Figura 9).

Sob condições de estresse, as leveduras desenvolvem rápida resposta molecular para se adaptar e se proteger dos efeitos de situações adversas. Numa situação de estresse salino e osmótico, por exemplo, o metabolismo é direcionado para manutenção celular, o que resulta em maior dispêndio de energia e consumo de glicose (GUTIERREZ, 1991; BIRCH; WALKER, 2000; NARENDRANATH, POWER, 2005). Por consequência, o açúcar que seria utilizado para produzir etanol, passa a ser aproveitado para a multiplicação do fermento, bem como a formação dos carboidratos de reserva (trealose e glicogênio), produtos secundários como glicerol, ácido succínico, acetato, lactato, acetona e álcoois superiores (FERREIRA et al., 1999). Assim, é provável que a adição de 4-etilfenol tenha provocado um

desvio no consumo de açúcar para a manutenção celular em detrimento da produção de etanol, o que explica o mais baixo consumo de ART e menor produção de etanol.

Houve diminuição no pH do meio de fermentação nos tratamentos com adição de 4-etilfenol, mas esse resultado pareceu ser mais em decorrência da fermentação em si do que do efeito do 4-etilfenol. Durante o crescimento da levedura em glicose e outros açúcares, ocorre acidificação do meio devido ao metabolismo desses substratos (ERASO; GANCEDO, 1987). Conforme Meneghin (2007), a diminuição do pH na fermentação relaciona-se com o consumo do substrato, resultando em maior quantidade de gás carbônico eliminado e, portanto, em aumento da acidez do meio. Desta forma, a variação no pH do meio de fermentação pode estar relacionado com a produção de etanol, ou seja, menor pH nas fermentações com maiores teores alcoólicos, como pode ser verificado nos resultados apresentados.

Outra possibilidade para explicar o efeito do 4-etilfenol sobre a fermentação etanólica pode estar relacionada ao seu efeito indireto sobre as enzimas ligadas ao metabolismo glicolítico, causando inibição da atividade das mesmas. Como a produção de etanol está intimamente ligada ao crescimento celular, quando não ocorre o consumo contínuo de ATPs pelas células em crescimento, o metabolismo glicolítico é interrompido imediatamente, pois o acúmulo intracelular de ATP inibe a fosfofrutoquinase (PFK), uma das enzimas mais importantes envolvidas na regulação da glicólise (BAI, ANDERSON E MOO-YOUNG, 2008).

Um ponto importante a ser levado em consideração é a capacidade de sorção de compostos fenólicos por *S. cerevisiae* por meio da parede celular, como demonstrado para vinho (CHASSAGNE et al., 2005; PRADELLES et al., 2008). Essas interações podem ser hidrofóbicas, eletrostáticas ou pela atuação das forças de van der Waals e estão sujeitas à influência da origem da cepa e das condições de cultivo, bem como a alterações provocadas por fatores físico-químicos, como pH e temperatura, além da presença de outros compostos no meio, como etanol (LUBBERS et al., 1994; CHASSAGNE, et al., 2005; JIMÉNEZ-MORENO; ANCÍN-AZPILICUETA, 2007).

Pradelles et al. (2008) avaliaram a capacidade de sorção de 4-etilfenol em vinho sintético em sete cepas enológicas de *S. cerevisiae* e oito cepas laboratoriais. A concentração inicial de 4-etilfenol foi de 10 ppm, pH 3,5, teor de etanol de 12,5% e temperatura de 10°C. Os autores observaram que o equilíbrio de cinética de sorção

foi alcançado após 4h de tempo de contato e que o tamanho da célula pode influenciar na capacidade de sorção. Também observaram que nem todas as manoproteínas presentes na parede celular são responsáveis pela sorção. Linhagens com deleção do gene codificador de Gas1p apresentaram capacidade de sorção 75% menor que a do tipo selvagem. A capacidade de sorção foi significativamente maior em biomassa obtida da fermentação alcoólica.

Neste estudo, não foram realizados testes para determinar se ocorreu ou não a sorção do 4-etilfenol pela *S. cerevisiae* PE-2 e se essa característica pode demandar energia, o que explicaria a menor produção de etanol e consequentemente menor eficiência fermentativa pelo desvio do açúcar para a atividade de sorção. Dessa forma, estudos futuros poderão investigar a capacidade de sorção de *S. cerevisiae* na fermentação etanólica a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos, seja a nível de metabolismo celular como quanto a interferência das características físico-químicas do meio extracelular e assim estabelecer o modo de ação do composto 4-etilfenol e seu efeito sobre a fermentação.

Do que foi exposto pode-se sugerir que a produção de 4-etilfenol, em decorrência da contaminação por *D. bruxellensis*, em concentrações próximas a 10 mg/L a partir do precursor ácido p-cumárico presente nos mostos de cana-de-açúcar, conforme demonstrado em trabalho anteriormente desenvolvido com linhagens isoladas do processo fermentativo (SILVA et al., 2018), pode impactar a eficiência do processo fermentativo, seja pelo efeito sobre as células da leveduras seja pelo efeito sobre a bioquímica da fermentação. Os mecanismos relacionados à esses efeitos demandam ainda uma ampla investigação. Os resultados aqui obtidos podem contribuir para o entendimento do impacto dessa levedura em processos de produção de bioetanol industrial.

6 CONCLUSÕES

As condições simuladas neste estudo para concentração de 4-etilfenol, pH, concentração de etanol e de sacarose provocaram efeitos sobre a velocidade específica de crescimento máxima da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 isolada da fermentação.

Observou-se que o efeito da concentração de 4-etilfenol está ligado à concentração de etanol no meio e que este é capaz de influenciar o crescimento de *S. cerevisiae* quando as concentrações dos demais parâmetros não são favoráveis para a viabilidade da levedura.

Verificou-se que o 4-etilfenol tem efeito sobre o processo fermentativo conduzido pela levedura *S. cerevisiae* PE-2. Houve efeito significativo da adição do 4-etilfenol sobre o número de leveduras, pH e teor alcoólico do meio de fermentação, resultando em queda na eficiência fermentativa. A velocidade de consumo de ART também foi influenciada pela presença de 4-etilfenol no meio de fermentação. Esses efeitos foram observados nas duas concentrações de 4-etilfenol testadas (10 e 20 mg/L), adicionadas tanto no início quanto ao final de 4h de fermentação.

Conclui-se, portanto, que o crescimento e a capacidade fermentativa da levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2 são afetados pela presença de 4-etilfenol, um composto produzido pela levedura contaminante *D. bruxellensis* em mostos de cana-

de-açúcar, o que pode contribuir para explicar o impacto dessa levedura em processos de produção de bioetanol industrial.

7 LITERATURA CITADA

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocelluloses hydrolisates. **AMB Express**, v. 4, n. 46, p. 1-10, 2014.

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

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, n.15, p. 1267-1275, 2011.

ANDRIETTA, M. G. S. A.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – Brazil, 30 years of Proalcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.

ANDRIETTA, M. G. S. A.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais. **Revista Multiciência**, v. 7, n. 11, p. 1-16, 2006.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89–105, 2008.

BARATA, A.; PAGLIARA, D.; PICCININNO, T.; TARANTINO, F.; CIARDULLI, W.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. **Yeast Research**, v. 8, n.7, p. 1097-1102, 2008.

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

BASSI, A. P. G. **Avaliação da contaminação conjunta de *Dekkera bruxellensis* e *Lactobacillus fermentum* sobre a fermentação alcoólica: efeito do substrato e formas de controle.** 2016. 118p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.8, n. 7, p. 115-1163, 2008.

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

BENITO, S.; MORATA, A.; CALDERÓN, F.; SUÁREZ-LEPE, F. A. Factors affecting the hydroxycinnamate decarboxylase/vinylphenol reductase activity of *Dekkera/Brettanomyces*: application for *Dekkera/Brettanomyces* control in red wine making. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 1, p. 15-22, 2009.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 678-687, 2000.

BLOMQVIST, J.; EBERHARD, T.; SCHNURDER, J.; PASSOTH, V. Fermentations characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n.4, p. 1487-1497, 2010.

BLOMQVIST, J.; PASSOTH, V. *Dekkera bruxellensis*-spoilage yeast with biotechnological potential, and a model for yeast evolution, physiology and competitiveness. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 4, p. 1-9, 2015.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Yeast identification in alcoholic fermentation process in a sugar cane industry unit of São Paulo state, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 56, n.1, p. 207–16, 1999.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; FIGUEIREDO, A. R.; TOTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S.; HOGG, T. A. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p.144–151, 2009.

CHASSAGNE, D.; GUILLOUX-BENATIER, M.; ALEXANDRE, H.; VOILLEY, A. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. **Food Chemistry**, v. 91, n.1, p. 39–44, 2005.

CHASSAGNE, D.; RAMIREZ, G.; LUBBERS, S.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M.; VOILLEY, A. Sorption of aroma compounds to oak wood in wine ageing conditions. In: J. L. Le Que´re´ & P. X. Etievant (Eds.), **Flavour research at the dawn of the twenty-first century**. Cachan, France: Lavoisier. p. 63–66, 2003.

CHATONNET, P.; DUBORDIEU, D.; BOIDRON, J. N. The influence of *Brettanomyces/Dekkera sp.* and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 46, n. 4, p. 463-467, 1995.

CHATONNET, P.; DUBORDIEU, D.; BOIDRON, J. N. The origin of ethylphenols in wines. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 60, n. 2, p.165-178, 1992.

CIANI, M.; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal Science Food Agriculture**, v.75, n. 4, p. 489-495, 1997.

COLOMBI, B. L.; ORTIZ, M. A.; ZANONI, P. R. S.; MAGALHÃES, W. L. E.; TAVARES, L. B. B. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, n. 2, p. 339-352, 2017.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira - cana-de-açúcar**: Terceiro levantamento, dezembro 2018 - safra 2018/2019: Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, v. 5, n. 3, 2018. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>> Acesso: Janeiro de 2018.

CONTERNO, L.; JOSEPH, C. M. L.; 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.139-147, 2006.

DIAS, L.; PEREIRA-DA-SILVA, S.; TAVARES, M.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 377–384, 2003.

DING, M. Z.; YANG, Y.; YAUN, Y. J. Metabolomic study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 15, n. 10, p. 647-53, 2011.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; de ABREU NETO, M. S.; NICOLAU-JÚNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 177-182, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, M. J.; NOVOA, A. V.; LINARES, A. F.; LAJOLO, F. M.; INÉS GENOVESE, M. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 4, p.187-192, 2006.

EDLIN, D. A. N.; NARBAD, A.; KICKINSON, J. R.; LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, n. 2-3, p. 311-316, 1995.

ERASO, P.; GANCEDO, C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. **FEBS Letters**, v. 224, n.1, p. 187–192, 1987.

FERREIRA, L. V.; AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Fermentação de trealose e glicogênio endógenos em *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n. 10, p. 29 – 32, 1999.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v.160, p. 3–14, 2014.

FREER, S. N. Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 217-275, 2002.

FUGELSANG, K. C; EDWARD, C. G. **Wine Microbiology. Practical applications and procedures**. 2 ed. New York: The Chapman & Hall Enology Library, 1997. 393p.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology Biotechnololy**, v. 84, p.13–28, 2009.

GALAFASSI, S.; CAPUSONI, C.; MOKTADUZZAMAN, M.; COMPAGNO, C. Utilization of nitrate abolishes the “Custers effect” in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 40, n. 2-3, p. 297-303, 2013.

GANGA, M. A.; SALINAS, F.; RAVANAL, C.; GARCIA, V.; CARRASCO, C.; MARTINEZ, C.; SAAVEDRA, J. Cinnamic acid, ethanol and temperature interaction on coumarate decarboxylase activity and the relative expression of the putative CD gene in *D. bruxellensis*. **Journal of Biotechnology**, v.14, n. 5, p. 3458–3458, 2011.

GERBEAUX, V.; JEUDY, S.; MONAMY, C. Study of phenol volatiles in Pinot noir wines in Burgundy. **Bulletin de l’OIV**, v. 73, p. 581–599, 2000.

GODOY, L.; GARRIDO, D.; MARTÍNEZ, C.; SAAVEDRA, J.; COMBINA, M.; GANGA, M. A. Study of the coumarate decarboxylase and vinylphenol reductase activities of *Dekkera bruxellensis* (anamorph *Brettanomyces bruxellensis*) isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, n. 4, p.452–457, 2009.

GOFFEAU, A.; BARRELL, B. G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546 – 567, 1996.

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

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

GUILLOUX-BENATIER, M.; CHASSAGNE, D.; ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M. Influence of yeast autolysis after alcoholic fermentation on the development of *Brettanomyces/Dekkera* in wine. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 35, p.157–164, 2001.

GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais ESALQ**, v. 48, p. 55–69, 1991.

HAGMAN, A.; SALL, T.; PISKUR, J. Analysis of the yeast short-term Crabtree effect and its origin. **FEBS J.**, v. 281, n. 21, p. 4805-4814, 2014.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends Biotechnology**, v. 12, n. 10, p. 409–415, 1994.

INGRAM, L. O. Adaptation of membrane lipids to alcohols. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n.2, p. 670-678, 1976.

JIMÉNEZ-MORENO, N. ANCÍN-AZPILICUETA, C. Binding of oak volatile compounds by wine lees during simulation of wine ageing. **LWT- Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 619–624, 2007.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.

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

KUNDIYANA, D.K. “**Sorganol®**”: in-fi eld production of ethanol from sweet sorghum. 2006. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-graduação em Ciências, Universidade Estadual de Oklahoma, Oklahoma, 2006.

LANDETE, J. M. Updated Knowledge about Polyphenols: Functions, Bioavailability, Metabolism, and Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n.10, p. 936-948, 2012.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y.; Rapid determination of east viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641-649, 1981.

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no brasil. **Novos Estudos**, v. 78, p. 15-21, 2007.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LOPES, L.; PAULILLO, S. C. DE. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIN NETO, H. B.; AMORIN, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 64-76, 2016.

LUBBERS, S.; CHARPENTIER, C.; FEUILLAT, M.; VOILLEY, A. Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 45, p. 29–33, 1994.

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

MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. N. Insights into the osmotic stress response of yeast. **FEMS Yeast Research**, v.2, n. 3, p. 251-257, 2002.

MARTIN, C.; JÖNSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* a inibidores de fermentação derivados de lignocelulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 386-395, 2003.

MENEGHIN, M. C. **Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica**. 2007. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

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

MILHEIRO, J.; FILIPE-RIBEIRO, L.; VILELA, A.; COSME, F.; NUNES, F. M. 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatechol in red wines: microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.19, p. 1-25, 2017.

MISSAWA, S. K. **Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional**. 2009. 150p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, 2009.

MORATA, A.; COLOMO, B.; SUÁREZ, J. A.; GÓMEZ-CORDOVE, S. M. C.; BARTOLOMÉ, B.; SUBERVIOLA, J. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 14, p. 4084-4088, 2003.

MOREIRA, B. L. D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L. F.; Jorge José Correa LOPES, J. J. C. Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 1672-1677, 2013.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica. In: Workshop sobre produção de etanol: qualidade de matéria-prima, 2008. **Anais...** Lorena, 2008.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2239–2243, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae* in minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171-7, 2001.

NGANG, J. J. E.; LETOUNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.

NIETO-ROJO, R.; ANCIN-AZPILICUETA, C.; GARRIDO, J. J. Sorption of 4-ethylguaiacol and 4-ethylphenol on yeast cell walls, using a synthetic wine. **Food Chemistry**, v.152, p. 399–406, 2014.

NOGUEIRA, A.; GUYOT, S.; MARNET, N.; LEQUÉRÉ, J. M.; DRILLEAU, F.; WOSIACKI, G. Effect of alcoholic fermentation in the content of phenolic compounds in cider processing. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1025-1032, 2008.

OLIVA-NETTO, P. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. In: MÉNDEZ-VILAS, A (Ed.). **Materials and processes for energy: communicating current research and technological developments**. Badajoz: Fomatex, p. 371-379, 2013.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HAGERDAL. B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n.1, p. 46–55, 1999.

PANAGIOTOU, G.; OLAVARRIA, R.; OLSSON, L. *Penicillium brasilianum* as an enzyme factory: the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n.3, p. 219-228, 2007.

PARALUPPI, A. L. **Utilização do metabissulfito de potássio no processo de fermentação etanólica para controle de leveduras e bactérias contaminantes**. 2017. 67p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018.

PASTOKOWA, E.; ZAKOVA, T.; LANDA, P.; NOVAKOVA, J.; VADLEJCH, J.; KOKOSKA, L. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeast

and acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, n.3, p. 209-213, 2013.

PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1997, 1324p.

PEREIRA, L. F.; BASSI, A. P.; AVANSINI, S. H.; NETO, A. G.; BRASILEIRO, B. T.; CECATO-ANTONINI, S.R.; MORAIS, M. A. JR. DE. 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. 529-39, 2012.

PITA, W. B.; LEITE, F. C.; SOUZA-LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. J. R. 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**, v. 100, n. 1, p. 99-107, 2011.

POLAKOVIC, M.; HANDRIKOVÁ, G.; KOSIK, M. Inhibitory effects of some phenolic compounds on enzymatic hydrolysis of sucrose. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p. 369-71, 1992.

PRADELLES, R.; VICHI, S.; ALEXANDRE, H.; CHASSAGNE, D. Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p.152–157, 2009.

PRONK, J. T.; STEENSMA, H. Y.; VAN, DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n.16, p. 1607-1633, 1996.

PULIGUNDLA, P.; SMORGROVICOVA, D.; OBULAM, V. S. R.; KO, S. Very high gravity (ACA) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n.9, p. 1133-1144, 2011.

REIS, V. R. **Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol**. 2011.

89p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RODERO, J. M.; RODRIGUES, A.; SOUZA, A. E. M. Análise da contaminação microbiana nas etapas de processamento e fermentação da cana de açúcar em uma usina sucroalcooleira. **Revista Funec Científica**, v. 5, n. 7, p. 12-22, 2016.

SABEL, A. BREDFELD, S.; SCHLANDER, M.; CLAUS, H. Wine phenolic compounds: antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. **Beverages**, v. 2, n. 29, p. 1-14, 2017.

SALAMEH, D.; BRANDAM, C.; MEDAWAR, W.; LTEIF, R.; STREHAIANO, P. Highlight on the problems generated by p-coumaric acid analysis in wine fermentations. **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1661–1667, 2008.

SANTOS, A. P. **Desenvolvimento de um método para determinação da atividade de esterases usando material lignocelulósico como substrato**. 2014, 87 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

SILVA I.; CAMPOS M. F.; HOGG T.; COUTO J. A. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n. 2-3, p.471–475, 2011.

SILVA, L. F. L. **Produção de fenóis voláteis por linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica**. 2018. 75p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2018.

SILVA, L. F. L.; RÉCO, A. S.; PEÑA, R. GANGA, M. A.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Volatile phenols are produce by strains of *Dekkera bruxellensis* under Brazilian fuel industry-like conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 21, 2018.

SOUSA, J. L. U.; MONTEIRO, R. A. B. Fatores interferentes na fermentação alcoólica para produção de etanol. **FAZU em Revista**, n. 8, p. 100-107, 2011.

SOUZA, R.B.; MENEZES, J. A.; DE SOUZA, R. de F.; DUTRA, E. D.; DE MORAIS, M. A. JR. Mineral composition of the sugarcane juice and its influence on the ethanol fermentation. **Applied Biochemistry Biotechnol**, v. 175, n. 1, p. 209 - 222, 2015.

SOUZA-LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C.; RESENDE, A. M. DO.; BRASILEIRO, B. T.; SILVA-FILHO, E. A. DA.; MORAIS, J. O. DE.; SIMÕES, D. A.; MORAIS, M. A. JR. de. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 538-547, 2007.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. 202p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

SUÁREZ, R.; SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A.; CALDERON, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. **Food Chemistry**, v. 102, n.1, p. 10-21, 2007.

ŠUĆUR, S.; ČADEŽ, N.; KOŠMERL, T. Volatile phenols in wine: Control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. **Acta Agricultura**, v. 107, n. 2, p. 453-472, 2016.

TONOLI, F. C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico**. 2017. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 967 p.

UNICA. **Fotografia do setor sucroenergético no Brasil e os benefícios econômicos, ambientais e sociais gerados**. 2018. Disponível em: <

file:///C:/Users/betec/Downloads/5f1476c10f03980c21151f0ecca6e7ce.pdf> Acesso:
Jan de 2019.

van der WALT, J. P. Discussion of the genera belonging to the ascosporegenous yeasts: genus 8: *Dekkera* van der Walt: In: KREGGER-van RIJ, N. J. W. (Ed.). **The yeasts**: a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science, 1984. P. 146-151.

WIJSMAN, M. R. Inhibition of fermentation and growth in batch cultures of the yeast *Brettanomyces intermedius* upon a shift from aerobic to anaerobic conditions (Custer's effect). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.50, n. 2, p. 83-192, 1984.

WOOLFIT, M.; ROZPEDOWSKA, E.; PISKUR, J.; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007.

YOUNG, T. W. The biochemistry and physiology of yeast growth. In: **Brewing microbiology**. PRIEST. F. G.; Campbell. I., p. 15-46, 1987.

ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. **Journal Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 23-30, 2009.