



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

PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS POR ISOLADOS DE *Dekkera bruxellensis*  
DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E EFEITOS SOBRE UMA LINHAGEM  
INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*

LINCON FELIPE LIMA SILVA

Araras

2018

Lima Silva, Lincon Felipe

PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS POR ISOLADOS DE *Dekkera bruxellensis* DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E EFEITOS SOBRE UMA LINHAGEM INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae* / Lincon Felipe  
Lima Silva. -- 2018.

64 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, Reinaldo Gaspar Bastos, Leonardo Lucas Madaleno

Bibliografia

1. *Dekkera bruxellensis*. 2. Etanol. 3. Ácidos Hidroxicinâmicos. 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**

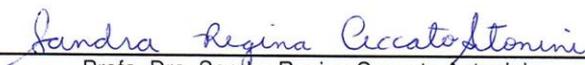
Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lincon Felipe Lima Silva, realizada em 02/05/2018:



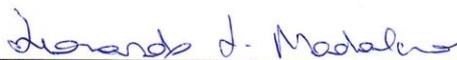
---

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini  
UFSCar



---

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
UFSCar



---

Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno  
FATEC



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

PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS POR ISOLADOS DE *Dekkera bruxellensis*  
DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E EFEITOS SOBRE UMA LINHAGEM  
INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*

LINCON FELIPE LIMA SILVA

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

2018

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família por ter me apoiado sempre como pode, emocional e financeiramente. Com destaque ao meu avô Prof. Dr. Euclides Custódio de Lima Filho, que me inspirou a seguir a vida acadêmica, à minha avó Lucy Masiero Lima, e aos meus avós José Oliveira da Silva e Terezinha de Jesus Marques da Silva. Meu pai José Vitor da Silva, que sempre zelou de perto pela minha segurança e bem-estar, e minha mãe Denise Masiero Lima Silva, por me acompanhar e incentivar a cada passo, sendo um suporte muito necessário para todas as dificuldades que surgiram e por ter financiado a maior parte da minha viagem à Santiago do Chile. Por fim agradeço ao meu companheiro Thiago Inácio Gomes, por ter sido um porto seguro em meio à pressão do último ano de mestrado.

Agradeço à minha orientadora Profa. Sandra Regina Ceccato Antonini, por ter me aceitado como seu aluno de mestrado, por ter acreditado que eu seria capaz de realizar um projeto inovador e por ter sido sempre acessível e presente, me orientando 24 horas por dia quando se fez necessário.

Agradeço a todos do LAMAM (Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular), UFSCar – *Campus* de Araras, que me ajudaram nessa jornada, com destaque especial à estagiária Aline Sotta Récco que me ajudou diretamente no último ano em todos os experimentos possíveis, à técnica Lucia Picollo que sempre foi prestativa e me socorreu várias vezes, à aluna Anna Livia Paraluppi que me ensinou grande parte do que eu precisava para realizar as fermentações, e ao estagiário Luiz Guilherme Silva, que me ajudou nos últimos experimentos.

Agradeço ao Prof. Reinaldo Gaspar Bastos e sua equipe, pois foram indispensáveis nas análises cromatográficas realizadas no Brasil.

Agradeço por fim à Profa. María Angelica Ganga, por ter me recebido no LAMAP (Laboratório de Microbiologia Aplicada), Universidad de Santiago, Chile, à pós-doutoranda Liliana Godoy por ter me orientado nos experimentos, ao técnico Walter Tapia, e ao aluno de doutorado Rubén Peña, por terem me ajudado várias vezes nas execuções dos experimentos realizados na USACH.

Meus agradecimentos à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, e à FAPESP pelo auxílio a pesquisa (processo número 2016/20680-4).

## SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>03</b>
2.1 Objetivos gerais.....	03
2.2 Objetivos específicos.....	03
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>04</b>
3.1 Características da fermentação etanólica no Brasil.....	04
3.2 Produção de compostos fenólicos reduzidos.....	07
3.3 Mecanismo de ação dos compostos fenólicos sobre as leveduras.....	12
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 Micro-organismos.....	14
4.2 Determinação das atividades enzimáticas CD e VR.....	15
4.1.1 Extração de proteínas das leveduras.....	15
4.1.2 Quantificação da concentração de proteínas.....	15
4.1.3 Determinação da atividade específica da enzima CD.....	16
4.1.4 Determinação da atividade específica da enzima VR.....	16
4.3 Testes fermentativos.....	16
4.3.1 Preparo do inóculo.....	17
4.3.2 Fermentação em batelada sem reciclo celular.....	17
4.3.3 Fermentação em batelada com reciclo celular.....	18
4.4 Efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
5.1 Determinação da atividade enzimática específica CD e VR.....	23
5.2 Fermentação em batelada sem reciclo celular.....	26

5.3	Fermentação em batelada com reciclo celular.....	29
5.4	Efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2.....	46
6	CONCLUSÕES.....	50
7	LITERATURA CITADA.....	51
	APÊNDICE.....	63

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Volumes e concentrações das soluções de ácido <i>p</i> -cumárico utilizados no experimento de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 realizado na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.....	21
Tabela 2. Volumes e concentrações das soluções de 4-vinilfenol utilizados no experimento de crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> PE-2 realizado na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.....	21
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.....	22
Tabela 4. Atividade das enzimas cumarato descarboxilase (CD) e vinilfenol redutase (VR) das linhagens de <i>D. bruxellensis</i> (CCA059, CCA077, CCA155) e <i>S. cerevisiae</i> (CAT-1, PE-2).....	24
Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos em meios de caldo de cana e melaço utilizados nos experimentos fermentativos em 2016 <sup>1</sup> e 2017 <sup>2</sup> , 16° Brix, pH 4,5.....	26
Tabela 6. Análise de variância dos valores de concentração de 4-etilfenol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com as culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e das linhagens de <i>D. bruxellensis</i> CCA059, CCA077 e CCA155, ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C, pH 4,5, em sistema de batelada com reciclo celular.....	30
Tabela 7. Análise de variância dos valores de concentração de 4-etilfenol nas fermentações desenvolvidas em melaço, com as culturas puras de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 e das linhagens de <i>D. bruxellensis</i> CCA059, CCA077 e CCA155, ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C, pH 4,5, em sistema de batelada com reciclo celular.....	31
Tabela 8. Velocidade específica de crescimento ( $\mu$ , h <sup>-1</sup> ) da linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em meio YPD acrescido de ácido <i>p</i> -cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol em diferentes concentrações, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 30°C, 150 rpm, com leitura da densidade óptica (DO) por absorbância a 600 nm por 21 horas <sup>1</sup> .....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação da formação de fenóis voláteis a partir de seus precursores (Adaptação de SUÁREZ et al. 2007).....	08
Figura 2. Curva de crescimento (densidade óptica, DO) e produção de 4-etilfenol (4-EF) pela linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 (A e B) e pelas linhagens de <i>D. bruxellensis</i> CCA059 (C e D), CCA077 (E e F) e CCA155 (G e H) em caldo e melão, a 30°C, sem agitação, por 72 h.....	28
Figura 3. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.....	32
Figura 4. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA059 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.....	35
Figura 5. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA077 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.....	36
Figura 6. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA155 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.....	38
Figura 7. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>S. cerevisiae</i> PE-2 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os	

experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.....	39
Figura 8. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA059 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.....	40
Figura 9. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA077 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.....	42
Figura 10. Número de células de leveduras/mL, pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de <i>D. bruxellensis</i> CCA155 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.....	43
Figura 11. Consumo (%) do ácido <i>p</i> -cumárico em caldo de cana (A) e melãoço (B), durante as fermentações desenvolvidas pelas linhagens de <i>D. bruxellensis</i> (CCA059, CCA077 e CCA155) e <i>S. cerevisiae</i> (linhagem PE-2), a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos. As barras indicam os seis ciclos fermentativos.....	45

# PRODUÇÃO DE FENÓIS VOLÁTEIS POR ISOLADOS DE *Dekkera bruxellensis* DA FERMENTAÇÃO ETANÓLICA E EFEITOS SOBRE UMA LINHAGEM INDUSTRIAL DE *Saccharomyces cerevisiae*

**Autor:** LINCON FELIPE LIMA SILVA

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

## RESUMO

Uma das principais leveduras contaminantes da fermentação é a espécie *Dekkera bruxellensis*, sendo conhecida sua capacidade de produzir compostos fenólicos voláteis como o 4-vinilfenol (4-VF) e o 4-etilfenol (4-EF) a partir de ácidos hidroxicinâmicos por meio da atividade das enzimas cumarato descarboxilase (CD) e vinilfenol redutase (VR), respectivamente. Ácidos hidroxicinâmicos estão presentes no caldo de cana-de-açúcar assim como no melaço e, desse modo, 4-EF poderia ser sintetizado durante a fermentação etanólica e atuar como inibidor do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*. O objetivo desse trabalho inicialmente foi quantificar as atividades específicas das enzimas CD e VR de três linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica e de duas linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1). Em seguida, foi avaliada a produção de 4-EF em fermentações com e sem reciclo celular utilizando melaço e caldo de cana como meios de fermentação pelas linhagens de *D. bruxellensis* e uma linhagem industrial de *S. cerevisiae* (PE-2). O efeito do ácido *p*-cumárico, de 4-VF e 4-EF sobre o crescimento de *S. cerevisiae* PE-2 foi também avaliado em meio semi-sintético. As linhagens de *D. bruxellensis* apresentaram atividade enzimática específica máxima (U/mg proteína) CD de 184,44 até 215,52 e VR de 101,94 até 154,26. Embora as linhagens de *S. cerevisiae* tenham também apresentado atividade enzimática CD e VR, verificou-se que não houve produção de 4-EF em condições de fermentação. Os testes fermentativos sem reciclo demonstraram que os maiores valores obtidos para 4-EF ocorrem após 24 h, durante a fase exponencial de crescimento, e se mantém estáveis até 72 h de fermentação em caldo e melaço. Comparativamente, as concentrações de 4-EF são muito maiores nas fermentações com reciclo celular, especialmente em melaço, sendo a levedura *D. bruxellensis* CCA077 a maior produtora, atingindo 9,47 mg/L já no primeiro ciclo fermentativo de 12 h. Não houve efeito inibitório do ácido *p*-cumárico, 4-VF e 4-EF 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 máxima de crescimento da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2.

**Palavras Chave:** *Dekkera bruxellensis*; Etanol; Etilfenol; Ácidos Hidroxicinâmicos

## **PRODUCTION OF VOLATILE PHENOLS BY STRAINS OF *Dekkera bruxellensis* ISOLATED FROM THE ETHANOLIC FERMENTATION AND EFFECTS ON AN INDUSTRIAL STRAIN OF *Saccharomyces cerevisiae***

**Author: LINCON FELIPE LIMA SILVA**

**Adviser: Profa Dra SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

### **ABSTRACT**

One of the main contaminant yeast is *Dekkera bruxellensis* being known its ability to produce volatile phenolic compounds such as 4-vinylphenol (4-VP) and 4-ethylphenol (4-EP) from hydroxycinnamic acids through the activity of the enzymes cumarate decarboxylase (CD) and vinylphenol reductase (VR), respectively. Hydroxycinnamic acids are present in the sugarcane juice as well as molasses and, thus, 4-EP could be synthesized during Brazilian ethanol fermentation conditions and act as metabolism inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae*. The objective of this work was initially quantify the specific activities of the enzymes CD and VR of three strains of *D. bruxellensis* isolated from the ethanolic fermentation and two industrial strains of *S. cerevisiae* (PE-2 and CAT-1). Following the production of 4-EP in fermentations with and without cell recycle utilizing molasses and sugarcane juice as fermentation media by the strains of *D. bruxellensis* and one industrial strain of *S. cerevisiae* (PE-2) was evaluated. The effect of *p*-coumaric acid, 4-VP and 4-EP on the growth of *S. cerevisiae* PE-2 was also evaluated in semi-synthetic medium. The *D. bruxellensis* strains showed maximum specific enzymatic activity (U/mg protein) CD of 184.44 up to 215.52 and VR of 101.94 up to 154.26. Although the *S. cerevisiae* strains also showed CD and VR enzymatic activities, that there was no 4-EP production under fermentation conditions. The fermentative tests without cell recycle showed that the highest values for 4-VP and 4-EP occurred after 24 h during the exponential phase of growth and were stable until 72 h of fermentation in sugarcane juice and molasses. Comparatively the concentrations of 4-EP were higher in the fermentations with cell recycle especially in molasses, with *D. bruxellensis* CCA077 being the largest producer, 9.47 mg/L, in the first 12-h fermentative cycle already. There was no inhibitory effect of *p*-coumaric acid, 4-VP and 4-EP at concentrations of 4 to 20 mg/L, 2 to 10 mg/L and 3 to 15 mg/L, respectively, on the maximum specific growth rate of the *S. cerevisiae* PE-2 strain.

**Keywords:** *Dekkera bruxellensis*; Ethanol; Ethylphenol; Hydroxycinnamic Acids

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o processo de fermentação para produção de etanol combustível é atividade não estéril, que utiliza caldo de cana e/ou melaço como meios de cultura, com reciclo das leveduras após centrifugação, durante todo o período da safra. Quando se trata de bactérias, a contaminação pode ser controlada utilizando-se agentes antibacterianos, como antibióticos. No caso das leveduras, este controle fica mais difícil (LOPES et al., 2016).

A espécie *Dekkera bruxellensis* tem sido considerada a principal levedura contaminante, tanto na indústria do vinho (COCOLIN et al., 2004; RENOUF et al., 2007; OELOFSE et al., 2008; MILHEIRO et al., 2017), quanto na produção de etanol combustível (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; BASÍLIO et al., 2008) e a presença prejudica especialmente a produtividade do processo fermentativo (MENECHIN et al., 2013). Em sistemas com oxigênio disponível, *D. bruxellensis* produz grandes quantidades de ácido acético (FREER, 2002), que é inibidor do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Contudo, em sistemas em semi-anaerobiose (somente há presença de oxigênio atmosférico em contato com a superfície do meio), como é o caso da fermentação alcoólica, a produção de ácido acético é praticamente nula. Mesmo assim, a presença da *Dekkera* prejudica a eficiência fermentativa do processo. Meneghin et al. (2013) mostraram que mesmo a concentração inicial de 1000 células/mL de *D. bruxellensis* em co-cultura com *S. cerevisiae* há queda de

7,9% da eficiência fermentativa após 14 ciclos, reduzindo consideravelmente o pH do meio, porém o mecanismo responsável por esse efeito prejudicial não foi esclarecido.

O gênero *Dekkera* é conhecido pela capacidade de converter os ácidos hidroxicinâmicos ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico nos compostos 4-vinilfenol (4-VF) e 4-etilfenol (4-EF), e 4-etilguaiacol, respectivamente, causando impacto sensorial negativo nos vinhos. Elevadas concentrações destes compostos em vinho estão associadas a odor desagradável, descritos principalmente como “Band-aid” e madeira queimada (ŠUĆUR et al., 2016; MILHEIRO et al., 2017).

Sabe-se que o caldo de cana-de-açúcar possui ácidos hidroxicinâmicos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SANTOS, 2014), e, desse modo, etilfenóis podem ser produzidos durante a fermentação alcoólica. Há evidências crescentes de que esses compostos interferem na membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e causando vazamentos de constituintes intracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos e íons inorgânicos. Assim, atuam como agentes de dissociação de membranas, levando a perturbação do pH interno e do gradiente de carga (SABEL et al., 2017). Segundo LARSSON et al. (2000) os compostos fenólicos de menor peso molecular são potencialmente os agentes mais tóxicos para a membrana celular. Ao alterar a seletividade da membrana citoplasmática, esses compostos facilitam a entrada de outros agentes potencialmente tóxicos para a levedura, como o ácido acético e o furfural (HEIPIEPER et al., 1994; LARSSON et al., 2000).

Não existem dados na literatura sobre a produção de 4-EF por *D. bruxellensis* durante a fermentação alcoólica brasileira. Considerando-se que no caldo de cana e melaço utilizados na indústria brasileira para a produção de etanol combustível existem precursores fenólicos, torna-se importante avaliar se ocorre a produção de 4-VF e 4-EF nas condições em que a fermentação é realizada no Brasil, e se há desvio de açúcar para essa síntese e se podem afetar a viabilidade da levedura no processo.

São necessárias pesquisas para preencher essa lacuna, as quais irão colaborar para o melhor entendimento do comportamento de *D. bruxellensis* como contaminante industrial, o que poderá ajudar na criação de medidas para combater a queda na eficiência fermentativa em processos contaminados com essa levedura.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de fenóis voláteis por linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação etanólica e o efeito desse composto sobre a levedura *S. cerevisiae* no contexto desse processo fermentativo.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade das enzimas cumarato descarboxilase (CD) e vinilfenol redutase (VR) em linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica e linhagens industriais de *S. cerevisiae* (PE-2 e CAT-1);
- Avaliar a produção de fenóis voláteis pelas linhagens de *D. bruxellensis* e pela levedura industrial *S. cerevisiae* PE-2, em cultivos puros, em processo fermentativo em batelada com e sem reciclo celular utilizando caldo de cana e melaço como meios de fermentação;
- Avaliar se os compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol) afetam a velocidade específica de crescimento da levedura *S. cerevisiae* nas concentrações em que são encontrados nos mostos de cana-de-açúcar após fermentação com *D. bruxellensis*.

### **3 REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Características da fermentação etanólica no Brasil**

O etanol é o biocombustível mais consumido no mundo, sendo o Brasil o país que primeiro introduziu este combustível renovável na matriz energética. Durante décadas contou com incentivos governamentais para a criação de demanda de mercado e aperfeiçoamento da produção. O etanol de cana-de-açúcar possui vantagens em relação ao etanol de milho empregado nos EUA, pois já oferece açúcares fermentescíveis sem precisar de uma etapa de hidrólise inicial como ocorre com o amido de milho (CORTEZ, 2010). Além disso, o uso do etanol de cana-de-açúcar permite reduzir em quase 90% as emissões de gases de efeito estufa, sendo que a atual mistura do etanol com a gasolina reduz a emissão na atmosfera de cerca de 1,9 milhões de toneladas de CO<sub>2</sub>, contribuindo de modo efetivo para mitigar a mudança climática (BNDES; CGEE, 2008).

Recentemente o Brasil foi superado pelos Estados Unidos na produção de etanol, mas ainda é o maior exportador do mundo. A produção de etanol na safra de 2017/2018 foi de 27,8 bilhões de litros (UNICA, 2018) sendo que o setor sucroenergético gerou 613 mil empregos em 2016 (UDOP, 2017). (BASSO et al., 2011).

A fermentação alcoólica consiste na transformação dos açúcares do mosto em etanol, gás carbônico e energia, sob a ação catalítica das leveduras e em condições anaeróbias (CAMARGO; USHIMA, 1990). Tradicionalmente, a fermentação alcoólica tem sido um processo conduzido em batelada em vez de um sistema contínuo. No sistema em batelada a formação do produto está diretamente relacionada ao crescimento do micro-organismo agente. Esse sistema permite uma melhor assepsia e também a não necessidade de sempre manter o sistema trabalhando como ocorre no sistema contínuo, o que facilita as situações de parada na usina (BASSI, 2011).

No Brasil, são utilizados mosto de caldo misto (caldo e melaço) e melaço para início do processo. Em nenhum dos casos, o mosto resultante é estéril (RODERO et al., 2016), sendo feito o reciclo da população das leveduras, após centrifugação e tratamento ácido, durante todo o período da safra (MONTEIRO, 2016). As vantagens de se realizar a reciclagem das leveduras são a economia do açúcar que seria desviado para a propagação de novo inóculo, e o fato de que altas concentrações de leveduras dentro do fermentador reduzem muito o tempo necessário para o término da fermentação (BASSO et al., 2011). Uma vez que os processos de reciclagem começam com maiores concentrações celulares (8-12%, v/v), os tempos de fermentação das destilarias brasileiras são mais rápidos (6-12 h) quando comparados às fermentações nos EUA (54-72 h) sem reciclagem de células de levedura (LOPES et al., 2016).

Contudo, o reciclo das células facilita para que micro-organismos contaminantes, especialmente leveduras, se estabeleçam no sistema. Diferentes tipos de leveduras e bactérias lácticas conseguem se desenvolver muito bem no caldo de cana-de-açúcar, um substrato com altos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, altos teores de açúcar, com temperatura e pH favoráveis (SOUZA-LIBERAL et al., 2007). A contaminação pode vir não somente do caldo de cana, mas de focos de contaminação das esteiras, moendas, tubulações e outros equipamentos (BASSI, 2011), além de fontes como o melaço, a água de lavagem da cana e o próprio solo em que ela foi cultivada (CECCATO-ANTONINI, 2010).

Algumas práticas na rotina industrial podem ser aplicadas para que a frequência de contaminações seja reduzida, dentre essas, deve-se usar matéria-prima bem conservada e não queimada; tornar mínimo o tempo entre corte e moagem; filtrar o caldo após a moagem e realizar a clarificação do mesmo; efetuar

os devidos ajustes de concentração de açúcar no mosto, com emprego de água de boa qualidade na embebição ou na diluição; utilização de antissépticos; uso de um fermento viável; manutenção da temperatura em torno de 30°C durante a fermentação; proceder exames microscópicos para verificar o grau de contaminação; e limpezas periódicas de todas as instalações da destilaria, que é um dos fatores mais importantes para o controle de micro-organismos selvagens (MUTTON, 2008).

Apesar disso, muitas usinas não fazem o monitoramento microbiológico, o que é uma grande desvantagem, gerando perdas econômicas devido aos efeitos combinados da formação de espuma, floculação, alta produção de glicerol e a presença de açúcar residual, após o término da fermentação em batelada, devido a contaminações (BASSO et al., 2008).

Uma das principais leveduras contaminantes da fermentação etanólica é a espécie *Dekkera bruxellensis* (SOUZA-LIBERAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2012; MENEHIN et al., 2013). Até o presente momento, tem sido apontado que a presença dessa levedura reduz a produtividade do processo devido principalmente ao grande crescimento da população no mosto causado pelo reciclo do inóculo contaminado, e o baixo potencial fermentativo nas condições de fermentação utilizadas nas indústrias brasileiras.

Bassi et al. (2018) comprovaram que a contaminação conjunta de *Lactobacillus fermentum* e *D. bruxellensis* potencializa os efeitos das contaminações pelos micro-organismos isoladamente, reduzindo a eficiência fermentativa em mais de 40% em melaço e mais de 35% em caldo. Além disso, em meio de caldo de cana com 4 °Brix, o crescimento de *D. bruxellensis* foi estimulado na presença da bactéria *L. fermentum*, mostrando que há uma interação positiva entre ambos os microrganismos.

A levedura *D. bruxellensis* possui crescimento lento, alta tolerância a etanol e é anaeróbia facultativa (PISKUR et al., 2006; WOOLFIT et al., 2007) sendo capaz de metabolizar diversas fontes de carbono, como glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e etanol. Como fontes de nitrogênio, assimila amônia, prolina, arginina e nitrato (CONTERNO et al., 2006). Essa levedura também é Crabtree positiva, ou seja, em altas concentrações de glicose ou em meio pobre de nutrientes, mesmo sob condições aeróbias, a fermentação predomina sobre a respiração. Apesar disso,

em sistemas com oxigênio são capazes de produzir grandes quantidades de ácido acético (FREER, 2002).

### 3.2 Produção de compostos fenólicos reduzidos

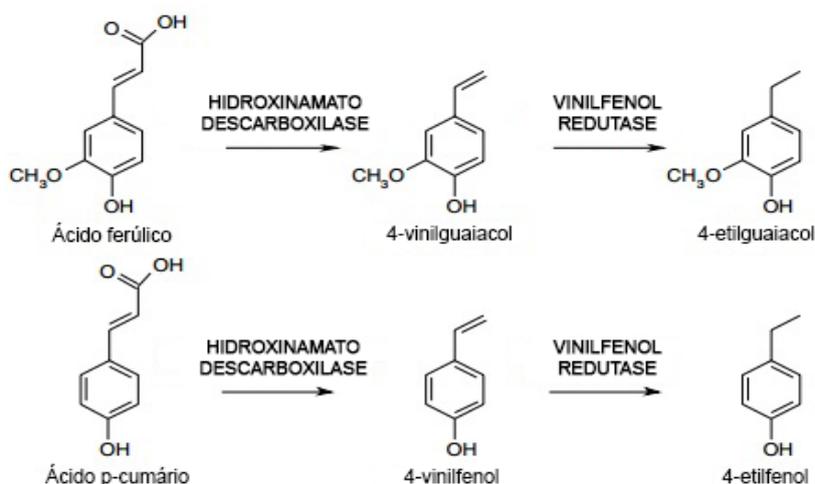
O gênero *Dekkera* é conhecido pela sua capacidade de converter ácidos hidroxicinâmicos em etilfenóis, causando impacto sensorial negativo nos vinhos (MILHEIRO et al., 2017). A enzima que facilita a descarboxilação está presente em grande número de bactérias, fungos e leveduras, mas o passo da redução é realizado principalmente por *Dekkera* (CHATONNET et al., 1995; EDLIN et al., 1995; DIAS et al., 2003; MILHEIRO et al., 2017). Os ácidos hidroxicinâmicos são descarboxilados em derivados de vinilfenol pela ação de enzimas hidroxicinamato descarboxilases, como a cumarato descarboxilase (CD), e então reduzidos pela atividade da vinilfenol redutase (VR) (CHATONNET et al., 1992), Figura 1.

Os ácidos hidroxicinâmicos exibem propriedades antimicrobianas, e microorganismos relacionados com o processo fermentativo tem desenvolvido diferentes estratégias visando metabolizar esses compostos em outros menos tóxicos. No caso das leveduras, várias espécies são capazes de transformar os ácidos hidroxicinâmicos em derivados voláteis-vinil através da enzima CD. Apenas poucas espécies são capazes de reduzir os compostos vinil em derivados etil, através da enzima VR (CORONADO et al., 2015).

Estudos tem mostrado diferenças entre isolados de *D. bruxellensis* quanto à produção dessas enzimas. A atividade CD foi comum a todos os isolados de *D. bruxellensis* testados, mas esse não foi o caso da atividade VR, que foi detectada em baixa porcentagem nas linhagens analisadas (GODOY et al., 2009). Os compostos fenólicos mais importantes obtidos por esse processo são os precursores 4-vinifenol e 4-vinilguaiacol e os produtos 4-etilfenol e 4-etilguaiacol, respectivamente (CHATONNET et al., 1992).

Elevadas concentrações destes compostos em vinho estão associadas a odor desagradável. Licker et al. (1998) descreveram esses aromas principalmente como “cheiro de estábulo”, “plástico queimado”, “Band-Aid” e “animal molhado”. Na forma pura, enquanto o 4-etilfenol exibe um aroma de “Band-aid”, o 4-etilguaiacol apresenta aroma de madeira queimada, sendo a presença desses dois componentes fortes indicadores da presença de *Dekkera*.

Figura 1. Representação da formação de fenóis voláteis a partir de seus precursores (Adaptação de SUÁREZ et al. 2007).



Os compostos fenólicos são característicos de plantas e são muito importantes para a vida das mesmas, pois estão envolvidos no suporte e proteção dos tecidos, mecanismos de defesa e sinalização. Os compostos fenólicos simples como os ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides também são encontrados em frutas e bebidas e contém uma grande variedade de atividades antioxidantes *in vitro* (BOUDET, 2007). Santos (2014) analisou a medula dos entrenós de cana-de-açúcar e comprovou a presença dos ácidos *p*-cumárico e ferúlico, ambos do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos. Complementarmente, Duarte-Ameida et al. (2006) analisaram amostras de caldo de cana obtido no CEAGESP em São Paulo e determinaram a presença de 160 mg/L de compostos fenólicos totais, pelo método de Folin-Ciocalteu. Destes, proporcionalmente, a análise por HPLC atestou que 73,02 mg/L são ácidos hidroxicinâmicos.

O mosto da fermentação alcoólica brasileira é composto por mistura de melaço e caldo de cana (RODERO et al., 2016). Cabrita et al. (2012) verificaram que o melaço contém até 556 mg/L de ácidos hidroxicinâmicos, dessa forma o mosto misto inicial da fermentação brasileira pode conter altas concentrações de precursores cinâmicos. Šučur et al. (2016) explicam que a quantidade de ácidos hidroxicinâmicos em uva varia muito. O suco de *Vitis vinifera* L. possui cerca de 171 mg/L, enquanto a variedade Grenache pode conter entre 270 e 460 mg/L. Outras variedades contém apenas de 50 a 60 mg/L.

Souza-Liberal et al. (2005) descreveram que *D. bruxellensis* prejudica o processo de fermentação devido à competição pelo açúcar que seria utilizado para produção de etanol, ou ainda pela produção de compostos tóxicos à levedura do inoculo inicial. O principal composto tóxico que essas leveduras produzem é o ácido acético, obtido através da oxidação do acetaldeído na presença de oxigênio (FREER, 2002), sendo esse composto eficaz na inibição do metabolismo da levedura *S. cerevisiae* (NARENDRANATH et al., 2001). Sob condições semi-anaeróbias (superfície do mosto em contato com oxigênio atmosférico), como ocorre durante a fermentação nas usinas, a produção de ácido acético por linhagens de *Dekkera* é muito baixa ou quase nula, sendo necessários mais estudos a fim de elucidar como ocorre a inibição da levedura *S. cerevisiae* nesse sistema.

A razão NAD<sup>+</sup>/NADH é um passo crítico em condições anaeróbias, sendo que na fermentação alcoólica, é principalmente a produção de etanol que promove a reoxidação do NADH e o que resta é reoxidado pelo glicerol. Além da via glicolítica, a via de síntese de aminoácidos também produz NADH. Para que este não se acumule, precisa ser reoxidado para NAD<sup>+</sup> e assim manter o ciclo metabólico da levedura. A levedura *D. bruxellensis*, contudo, produz uma quantidade muito baixa de glicerol (AGUILAR-USCANGA et al., 2003; SOUZA-LIBERAL et al., 2007; BLOMQUIST et al., 2010; BLOMQUIST; PASSOTH, 2015). Essa ineficiência tem sido apontada como a principal causa do chamado "Efeito Custer" nesta espécie. Leveduras com esse efeito não conseguem realizar o balanço NAD<sup>+</sup>/NADH e precisam de uma molécula receptora de elétrons para reoxidar o NADH e equilibrar o sistema, evitando a inibição do metabolismo de carboidratos (CIANI; FERRARO, 1997; GERÓS et al., 2000; BLOMQUIST; PASSOTH, 2015).

Em condições aeróbias, o oxigênio faz o papel de reoxidar o NADH, mas na ausência deste, outras moléculas precisam desempenhar essa função. Galafassi et al. (2013) mostraram que *D. bruxellensis* é capaz de utilizar o nitrato como receptor de elétrons, o que melhora seu rendimento fermentativo, mesmo assim ele não foi considerado a única explicação para a maior adaptabilidade dessas leveduras nas indústrias (PITA et al., 2011). Algumas estirpes de *Dekkera* conseguem equilibrar suas funções metabólicas ao converter ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e utilizar a enzima VR para oxidar o NADH em NAD<sup>+</sup>, reduzindo os vinilfenóis em etilfenóis (FULGELSANG; EDWARD, 1997; ŠUĆUR et al., 2016) conforme apresentado na Figura 1. Essas enzimas são intracelulares, sendo liberadas para o

meio somente quando as células de *Dekkera* atingem a fase estacionária de crescimento e sofrem lise. Uma vez no meio, estas enzimas podem atuar diretamente sobre os ácidos hidroxicinâmicos (BERNARDI et al., 2011).

Edlin et al. (1995) mostraram que há diferenças na especificidade da enzima CD de cada espécie de *Dekkera*, o que resulta em diferenças na metabolização dos ácidos hidroxicinâmicos. Gomes (2012) observou que existem diferenças no valor de conversão molar do ácido *p*-cumárico em 4-etilfenol entre diferentes estirpes de *D. bruxellensis*, o que atribuiu à diversidade genética entre elas. Com base nesses resultados, é possível afirmar que são necessários novos estudos sobre o metabolismo de *D. bruxellensis* para cada nova cepa descoberta e para os diferentes processos fermentativos, os quais funcionam em condições bastante diversas.

Na levedura *D. bruxellensis* LAMAP2480, uma enzima CD foi identificada como decarboxilase de ácido fenilacrílico (PAD1p), responsável pela produção de 4-vinilfenol a partir de ácido *p*-cumárico e codificado pelo gene *DbPAD* correspondente (GODOY et al., 2014). A enzima VR foi identificada em *D. bruxellensis* CBS4481 como uma superóxido dismutase de Zn/Cu (SOD1) pertencentes a oxidoreduases dependentes de NADPH da família de Desidrogenases / Reductases (SDRs) de cadeia curta (GRANATO et al., 2015). A clonagem do gene *DbVPR* em *S. cerevisiae*, uma levedura que não produz 4-etilfenol, confirmou recentemente o seu papel na produção de *off-flavors* (ROMANO et al., 2017). A expressão do gene que codifica a enzima CD é fortemente afetada pelo pH e pelo etanol, assim como pelas interações entre pH e SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e etanol. A expressão do gene que codifica a enzima VR é somente afetada pelo pH e pelo SO<sub>2</sub>, separadamente (VALDETARA et al., 2017).

Como os derivados fenólicos são produzidos em um mosto com variações de pH e concentração de etanol, Godoy et al. (2008) avaliaram o efeito do etanol sobre as atividades CD e VR. No caso da atividade CD, após poucos minutos na presença de 10% (v/v) e 12% (v/v) de etanol, a atividade reduziu drasticamente. Após 10 minutos de incubação, a enzima perdeu 50% da atividade, e após 1 hora perdeu completamente sua atividade. A estabilidade da enzima VR diminuiu gradualmente com o tempo na presença de 10% (v/v) e 12% (v/v) de etanol. Após 1 hora de incubação na presença de 10% de etanol, a enzima perdeu 80% da sua atividade, enquanto na concentração de 12% de etanol a enzima perdeu 88% da sua atividade

no mesmo período. Foi também observado que a atividade CD é induzida tanto pela presença do ácido *p*-cumárico quanto pela presença do 4-vinilfenol no meio de cultura, enquanto que a atividade VR é induzida somente pela presença do 4-vinilfenol.

Benito et al. (2009) concluíram que a linhagem *D. bruxellensis* D37 é incapaz de produzir 4-etilfenol quando a concentração de etanol no meio é maior que 15% (v/v). A concentração de 10% (v/v) retardou a formação de 4-etilfenol em mais de 3 dias comparado os resultados obtidos na concentração de 5% (v/v), enquanto a concentração de 15% (v/v) retardou 7 dias. Curiosamente, na ausência de etanol, a produção de 4-etilfenol também foi retardada em comparação à concentração de 5% (v/v). Isso pode indicar que a baixa concentração de etanol – mas não muito baixa – favorece o processo enzimático necessário para descarboxilação e/ou redução. Isso pode estar relacionado com a capacidade da *Dekkera* em usar o etanol como uma fonte de carbono. Na ausência de outros fatores limitantes, a linhagem *D. bruxellensis* D37 não mostrou atividade enzimática na faixa de pH entre 1,75 e 2,17, sendo que no pH 2,17 houve o retardamento de 2 dias para iniciar a metabolização do ácido *p*-cumárico.

KOSEL et al. (2017) compararam a produção de compostos fenólicos reduzidos por *Saccharomyces* e *Dekkera* quando em cultura pura ou em cultura mista com membrana que impedia o contato entre as diferentes leveduras. Porém, permitia a passagem dos metabólitos produzidos. A produção de 4-vinilfenol por *S. cerevisiae* foi maior em cultura mista (separada por membrana) do que em cultura pura (17,4 vs 12,6 mg/L 4-vinilfenol e 6,3 vs 6,1 mg/L 4-vinilguaiacol respectivamente), contudo, após 92 h todo o 4-vinilfenol produzido por *S. cerevisiae* já havia sido convertido pela *Dekkera* em 4-etilfenol. Por outro lado, em cultura mista (separada por membrana), a produção de 4-etilfenol por *Dekkera* foi reduzida quando comparada com a cultura pura, provavelmente, porque o 4-etilfenol estava sendo absorvido pela parede celular da *S. cerevisiae*.

Estudos tem sido desenvolvidos visando a remoção dos compostos fenólicos reduzidos do meio, evitando assim os efeitos prejudiciais. FILIPI-RIBEIRO et al. (2017) avaliaram vários mecanismos para remoção desses compostos e concluíram que a utilização de carbono ativado, em vinho, foi capaz de reduzir até 75,2% dos compostos fenólicos após 6 dias.

### **3.3 Mecanismos de ação dos compostos fenólicos sobre as leveduras**

O mecanismo antimicrobiano dos ácidos fenólicos não está bem estabelecido, contudo, há evidências crescentes de que interferem com a membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e causando vazamentos de constituintes intracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos e íons inorgânicos. Assim, atuam como agentes de dissociação de membranas, levando a uma perturbação do pH interno e do gradiente de carga (SABEL et al., 2017). Segundo LARSSON et al. (2000), os compostos fenólicos de menor peso molecular são potencialmente os agentes mais tóxicos para a membrana celular.

Os ácidos fenólicos são capazes de alterar a proporção de lipídeos e proteínas das membranas (KEWELOH et al., 1990) afetando diretamente sua integridade e funções biológicas (DING et al., 2011). Devido à sua natureza lipofílica, podem atravessar a membrana celular microbiana na sua forma não iônica e acidificar o citosol, causando desnaturação de proteínas e interferindo na atividade celular (CAMPOS et al., 2003), ao mesmo tempo em que a membrana prejudicada perde sua capacidade de servir como barreira seletiva e matriz para enzimas (HEIPIEPER et al., 1994).

A reconfiguração dos lipídeos da membrana plasmática ocasionada por compostos fenólicos dificulta a entrada de ácidos não dissociados, reduzindo os danos que causariam para a levedura (MIRA et al., 2010), por outro lado, essa alteração melhora a difusão do ácido acético e do furfural para o interior das células, que são compostos muito mais prejudiciais ao metabolismo da levedura (DING et al., 2011).

A presença de mais de um inibidor de micro-organismos no meio pode resultar em um efeito sinérgico ou antagônico, o que significa que o efeito final pode ser significativamente aumentado ou reduzido a depender da interação dos inibidores presentes (PALMQVIST et al., 1999; KLINKE et al., 2004). Há indícios de que o furfural presente no meio reforça a toxicidade do fenol e do ácido acético na membrana celular (DING et al., 2011) Em sistemas que utilizam cana-de-açúcar, o furfural pode se originar da queima do palhiço antes da colheita (NOVAES, 1974 apud MELO, 2014; YOKOYA, 1995) e da desidratação e ciclização de pentoses provenientes principalmente do bagacilho (YOKOYA, 1995).

SABEL et al. (2017) avaliaram a capacidade de compostos fenólicos em inibir o crescimento de *Saccharomyces* em meio com pH 3,5 comparado ao meio em pH 5,5. 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 outras espécies de *Saccharomyces* como a *S. bayanus* HL77 e a *Saccharomyces* HL78 foram mais sensíveis aos compostos fenólicos, sendo inibidas pelo ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico e o siringaldeído. Nos experimentos realizados com pH 5,5, o efeito negativo dos ácidos cinâmicos geralmente diminuiu, provavelmente por estarem no estado desprotonado. De todos os compostos fenólicos analisados, o ácido ferúlico mostrou efeito inibitório mais forte, embora o ácido *p*-cumárico também tenha apresentado efeito inibitório em alguns casos. Esses resultados foram consistentes com o trabalho de PASTORKOVA et al. (2013), que também observaram alta sensibilidade para ácidos hidroxicinâmicos por leveduras prejudiciais ao vinho.

ADEBOYE et al. (2014) demonstraram a capacidade que compostos fenólicos possuem em reduzir os rendimentos de etanol e aumentar os de glicerol e acetato em fermentações de *S. cerevisiae*. Os autores concluíram que diferentes compostos fenólicos têm limites de toxicidade diferentes, mesmo os que compartilham os mesmos grupos funcionais. Um exemplo disto foi a diferença significativa entre o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico, os quais mostraram respectivamente limites de toxicidade de 1,8 mM (0,349 g/L) e 9,7 mM (1,59 g/L).

Compostos fenólicos atuam como inibidores do metabolismo das leveduras, comprometendo o processo de degradação dos açúcares, aumentando o tempo de fermentação, reduzindo o consumo de açúcares do mosto, refletindo em significativas perdas no rendimento alcoólico (POLAKOVIC et al., 1992; NARENDRANATH et al., 2001; STUPIELLO, 2002) e alterações na composição do destilado (RAVANELI, 2005).

Até o presente momento não existem trabalhos sobre a produção de fenóis voláteis por linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica para produção de etanol combustível, tampouco sobre a atividade das enzimas CD e VR nessas linhagens. Devido a isso, o presente trabalho é inédito e pretende contribuir para o preenchimento dessa lacuna.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas três linhagens de *D. bruxellensis* (CCA059, CCA077 e CCA155) isoladas do processo fermentativo para a produção de etanol combustível e identificadas por sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal (MENEZHIN, 2007). Para efeitos de comparação, foram utilizadas as linhagens de *S. cerevisiae* PE-2, isolada de um processo fermentativo da Usina da Pedra, Serrana/SP (gentilmente cedida pela Fermentec, Piracicaba-SP) e a *S. cerevisiae* CAT-1, isolada na Usina VO (Grupo Virgolino de Oliveira) de Catanduva. Estas linhagens vem sendo mantidas em *slants* de YPD-ágar (1% de extrato de levedura p/v, 2% de peptona p/v, 2% de glicose p/v, 2% de ágar p/v e água destilada), a 4°C, e em água destilada estéril, à temperatura ambiente.

As leveduras pertencem ao banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA/UFSCar-Campus de Araras. As linhagens de *D. bruxellensis* estão depositadas na Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Toselo sob os números CCT7786, CCT7785 e CCT7784, respectivamente, para CCA059, CCA077 e CCA155.

## **4.2 Determinação das atividades enzimáticas CD e VR**

As análises de atividade enzimática foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMAP), Universidade de Santiago, Chile.

### **4.2.1 Extração de proteínas das leveduras**

O método de extração de proteínas foi baseado em Sambrook et al. (1989). As leveduras foram crescidas em Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio YNB suplementado de 20 g/L de glicose e 100 mg/L de ácido p-cumárico, mantidos sob agitação de 120 rpm a 25°C por 5 dias, sendo, em seguida, centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Os precipitados foram ressuspensos em 30 mL de tampão PBS (140 mM NaCl, 2 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), pH 7,4, sob agitação em vórtex durante 10 minutos e, posteriormente, centrifugados a 12000 g por 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados ressuspensos em 20 mL de tampão A (1 M sorbitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 µg/mL PMSF) e incubados a 30°C por 20 min. Após esse período, os meios foram centrifugados a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C e os precipitados ressuspensos em 20 mL de tampão B (1 M sorbitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM succinato de sódio, 100 µg/mL PMSF) e incubados a 30°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados para cada levedura 100 µL de uma solução estoque de zimoliase (10 mg/mL) e incubadas por 1h e 40 min a 37°C. Após esse período, o meio foi centrifugado a 6760 g por 10 minutos a 4°C e os precipitados foram ressuspensos em 200 µL de tampão de lise H (50 mM HEPES, 1 mg/mL PMSF, 1 µg/mL aprotinina, 1% NP-40), e então transferidos para eppendorfs de 2 mL e incubados por 45 min em gelo. Por fim, o meio foi centrifugado a 12000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recuperado e guardado a -20°C até utilização.

### **4.2.2 Quantificação da concentração de proteínas**

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina de soro bovino (BSA) (Winkler, Ltda.) como padrão. Uma alíquota de 20 µL de água (controle) e 20 µL das amostras foram adicionadas a 250 µL do reagente de Bradford e incubadas a 37°C por 30 min. Posteriormente, foi medida a absorvância das amostras a 595 nm. A concentração final de proteínas foi obtida por meio de uma curva-padrão utilizando albumina de soro bovino.

#### **4.2.3 Determinação da atividade específica da enzima CD**

O método de detecção da atividade CD foi baseado em Edlin et al. (1998). Uma alíquota de 100 µL das proteínas extraídas foram adicionadas separadamente em 250 µL de tampão fosfato pH 6,0, 122 µL de 100 mM de ácido *p*-cumárico (Sigma-Aldrich, Inc; USA) e 528 µL de água. A solução foi incubada a 40°C por 40 min, assim como os brancos da reação (250 µL de tampão fosfato pH 6,0, 100 µL das proteínas extraídas e 650 µL de água) e o controle (250 µL de tampão fosfato pH 6,0, 122 µL 100 mM de ácido *p*-cumárico e 628 µL de água). Posteriormente, 100 µL das soluções foram adicionados em 900 µL de água e a absorbância medida em espectrofotômetro na absorbância de 350 nm. A diferença da absorbância entre o controle e as amostras se relaciona com a atividade enzimática. A unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 µmol/mL de ácido *p*-cumárico por minuto.

#### **4.2.4 Determinação da atividade específica da enzima VR**

O método de detecção da atividade redutase foi baseado em Kato et al. (1991), modificado. Para tanto 200 µL das amostras de proteína foram adicionadas separadamente em 250 µL de tampão fosfato pH 6,0, 20 µL de vinilfenol (0,1M), 37 µL de NADPH (4 mM) e 493 µL de água. A solução foi incubada a 25°C por 25 minutos assim como o branco da reação (250 µL de tampão fosfato pH 6,0, 20 µL de 4-vinilfenol, 100 µL das amostras de proteína e 630 µL de água) e o controle (250 µL de tampão fosfato, 20 µL de 4-vinilfenol, 37 µL de NADPH e 693 µL de água). A atividade redutase foi monitorada pela oxidação do NADPH no comprimento de onda de 340 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 µmol/mL de NADPH por minuto.

### **4.3 Testes fermentativos**

Os testes fermentativos foram realizados no LAMAM, CCA/UFSCar-Campus de Araras. Foram realizadas duas repetições (2016 e 2017) dos experimentos fermentativos em batelada com reciclo celular.

#### 4.3.1 Preparo do inóculo

As leveduras armazenadas em *slants* a 4°C foram replicadas para placas de Petri com meio YPD-ágar e incubadas a 30°C por 5 dias. Duas alçadas das colônias crescidas foram transferidas para 6 erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de meio YPD líquido, sob agitação de 160 rpm, a 30°C por 24h. Após esse tempo, os erlenmeyers foram centrifugados a 4000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram transferidas para 3 erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de caldo de cana 4° Brix e 3 erlenmeyers de 250 mL com 100 mL de melaço 4° Brix, sob agitação de 160 rpm a 30°C por 24 h. Por fim, o conteúdo dos frascos foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos e as células ressuspendidas em 20 mL de água destilada estéril. A quantidade de células por mL foi obtida por contagem em câmara de Neubauer.

O caldo clarificado e o melaço utilizados foram obtidos na Usina São João, safra 2016/2017, tendo sido acondicionados em garrafas plásticas em *freezer* a -6°C até o momento do uso. Ao caldo foi adicionado 1 mL por litro de uma solução de sais (dissolveu-se 50 g de sulfato de amônio, 20 g de fosfato monobásico de potássio, 10 g de sulfato de magnésio, 1 g de sulfato de zinco e 1 g de sulfato de manganês em 500 mL de água destilada, completando-se o volume para 1000 mL, e esterilizando em seguida) sendo autoclavado por 20 minutos a 120°C.

#### 4.3.2 Fermentação em batelada sem reciclo celular

As 3 linhagens de *D. bruxellensis* e de *S. cerevisiae* (separadamente, em culturas puras) foram inoculadas para uma concentração final de 10<sup>8</sup> cel/mL em erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de caldo de cana ou melaço (diluído em água destilada até o Brix desejado), ambos a 16° Brix e pH 4,5. Os erlenmeyers (em triplicata) foram incubados a 30°C em condições de semi-aerobiose (tampados com algodão), sem agitação por 72 horas.

A cada 12 horas, foi retirada uma amostra de 1 mL para determinação da densidade óptica por absorvância a 600 nm em espectrofotômetro Bio-Mate® (Analítica). A cada 24 horas foi retirada uma amostra de 3 mL, a qual foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos, filtrada em membrana 0,45 µm e armazenada em frascos de vidro âmbar com tampa de teflon em *freezer*. Posteriormente, essas amostras foram analisadas quanto à concentração de fenóis voláteis por cromatografia líquida.

Foram avaliados os seguintes compostos: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido caféico, 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol, 4-etilfenol e 4-etilguaiacol. Foi utilizado o equipamento Shimadzu, modelo Prominence, coluna Inertsil ODS-4, 5 µm, 4,6 x 150 mm, marca GL Sciences Inc. A temperatura do forno foi 40°C, comprimentos de onda 280 nm e 320 nm, fluxo em gradiente 1 mL/min. A fase móvel foi Fase A (água: ácido acético 90:10) e Fase B (metanol). As mesmas análises acima descritas foram realizadas com amostras do meio de fermentação, caldo de cana e melaço, 16 °Brix, pH 4,5.

Para apresentação dos resultados sobre produção de 4-etilfenol, descontou-se dos valores obtidos o valor inicial desse composto identificado no meio utilizado (caldo de cana ou melaço).

#### **4.3.3 Fermentação em batelada com reciclo celular**

As 3 cepas de *D. bruxellensis* e de *S. cerevisiae* (separadamente, em culturas puras) foram inoculadas para uma concentração final de 10<sup>8</sup> cel/mL em Erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de caldo de cana ou melaço, ambos a 16° Brix e pH 4,5. Os erlenmeyers (em triplicata) foram incubados a 30°C em condições de semi-aerobiose (tampados com algodão), sem agitação. Após 12 horas, foi retirada uma amostra de 1 mL para determinação do número de células/mL por microscopia em Câmara de Neubauer, adicionando-se o corante azul de metileno para contagem do número de células viáveis/mL (LEE et al., 1981). O conteúdo dos frascos foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos e a massa celular foi adicionada a novo meio de fermentação. Foram realizados 6 ciclos fermentativos de 12 h cada.

Foram retiradas duas alíquotas do sobrenadante obtido ao final de cada ciclo fermentativo: um volume de 3 mL foi filtrado em membrana porosidade 0,45 µm e armazenado em frascos de vidro âmbar com tampa de teflon em *freezer* para as análises de fenóis voláteis por HPLC, conforme descrito no item anterior; e um volume de 13 mL foi armazenado em tubos Falcon de 15 mL em *freezer*, para análises de pH, açúcar residual total e etanol. Os valores de pH foram medidos em pH-metro digital MS TECNOPON modelo mPA210.

A concentração de açúcar residual total nos sobrenadantes foi determinada pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (ADNS), segundo metodologia de Miller (1959) modificada. Foram adicionados 0,5 mL das amostras (sobrenadantes) em balões volumétricos de 100 mL, adicionado 30 mL de água destilada, 2,5 mL de

ácido clorídrico concentrado e, então, tudo foi levado a banho-maria a 65°C por 15 minutos. Após, foram resfriadas em água corrente e adicionado 2,8 mL de NaOH 12,06 N e o volume do balão completado até 100 mL. Transferiu-se 1 mL de cada amostra diluída para tubo de ensaio, e neste adicionou-se 1 mL da solução estoque de ADNS e 1 mL de água destilada, totalizando um volume de 3 mL. As amostras foram submetidas ao banho térmico (água fervente) por 5 minutos, os tubos em seguida, foram resfriados em água corrente e receberam 5 mL de água destilada, perfazendo um total de 8 mL. Homogeneizou-se por exatos 5 segundos em vórtex e realizou-se a leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro digital Bio-Mate® (Analítica), considerando-se a conversão dos valores de absorbância pela utilização de uma curva-padrão “Absorbância X Concentração de Glicose”, com a seguinte fórmula: Concentração de açúcar redutor em g/L= [(Absorbância + 0,0392)/0,6769] X Diluição. 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 com concentrações equidistantes de 0,12 a 1,2 g/L de glicose, obtendo-se a regressão linear com um R<sup>2</sup> igual a 0,9963.

Para a análise de etanol, 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.

Os resultados de concentração de 4-etilfenol ao final dos seis ciclos de fermentação, para cada levedura ensaiada, nos dois meios de fermentação, nos dois experimentos independentes realizados (em 2016 e 2017) foram analisados estatisticamente utilizando-se análise de variância, de forma a avaliar se havia diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois anos de experimentos para esse parâmetro. Utilizou-se o software “Statistica” para a análise dos dados.

#### **4.4 Efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2**

As curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2 em meio YPD acrescido de diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol foram obtidas utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200. Foi utilizada a microplaca modelo “Greiner 96 Flat Bottom Transparent Polystyrene” com 96 poços.

Inicialmente, o inóculo da levedura foi preparado transferindo-se células de placas com meio YPD recém-ativadas para frascos contendo 50 mL de YPD líquido, mantendo-os a 30°C por 24 horas, 150 rpm. A massa celular foi centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos e transferida para novo meio YPD até que fosse obtido o volume necessário de suspensão de leveduras na concentração de  $3 \times 10^7$  células/mL. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer após coloração com solução de azul de metileno-citrato de sódio.

Aos poços da microplaca foram adicionados assepticamente 250 µL de meio YPD estéril, 30 µL do inóculo de *S. cerevisiae* (concentração final de  $3 \times 10^6$  células/mL) e 20 µL de cada uma das soluções estoque 2 de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol preparadas de acordo com a descrição contida nas Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. Foram também realizados dois tratamentos controle: meio YPD sem inoculação da levedura e sem adição de qualquer composto fenólico; e meio YPD com inoculação da levedura e sem adição de qualquer composto fenólico, sendo utilizados 300 µL de meio YPD ou 270 µL de meio YPD esterilizado e 30 µL de inóculo de *S. cerevisiae*, respectivamente. Todos os tratamentos (com e sem adição de compostos fenólicos) foram realizados com 5 repetições.

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 21 horas. O crescimento celular foi monitorado pela medida de absorbância a 600 nm a cada 15 minutos. Foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu$ , h<sup>-1</sup>) por meio da regressão linear dos dados de ln da absorbância X tempo, considerando-se o coeficiente angular como a velocidade específica de crescimento.

Tabela 1. Volumes e concentrações das soluções de ácido *p*-cumárico utilizados no experimento de crescimento da levedura *S. cerevisiae* PE-2, realizado na leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.

Volumes utilizados para preparo da			
solução estoque 2		Concentração da solução estoque 2 (mg/L)	Concentração final na microplaca (mg/L) <sup>2</sup>
Solução estoque 1 (mL) <sup>1</sup>	YPD estéril (mL)		
10	0	300	20
8	2	240	16
6	4	180	12
4	6	120	8
2	8	60	4

<sup>1</sup> Solução estoque 1 (300 mg/L): 30 mg de ácido *p*-cumárico (Sigma-Aldrich) adicionados a 100 mL de meio YPD líquido esterilizado

<sup>2</sup> Foram adicionados 20 µL da solução estoque 2 para um volume final de 300 µL no tratamento

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

Volumes utilizados para preparo da			
solução estoque 2		Concentração da solução estoque 2 (mg/L)	Concentração final na microplaca (mg/L) <sup>2</sup>
Solução estoque 1 (mL) <sup>1</sup>	YPD estéril (mL)		
10	0	150	10
8	2	120	8
6	4	90	6
4	6	60	4
2	8	30	2

<sup>1</sup> Solução estoque 1 (150 mg/L): Um volume de 10 mL da solução 1 (1 mL da solução de 4-vinilfenol 10% - Sigma-Aldrich - adicionado a 66 mL de meio YPD líquido esterilizado) foi acrescentado a 90 mL de meio YPD líquido esterilizado

<sup>2</sup> Foram adicionados 20 µL da solução estoque 2 para um volume final de 300 µL no tratamento

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

Volumes utilizados para preparo da			
solução estoque 2		Concentração da solução estoque 2 (mg/L)	Concentração final na microplaca (mg/L) <sup>2</sup>
Solução estoque 1 (mL) <sup>1</sup>	YPD estéril (mL)		
10	0	225	15
8	2	180	12
6	4	135	9
4	6	90	6
2	8	45	3

<sup>1</sup> Solução estoque 1 (225 mg/L): 22,5 mg de 4-etilfenol (Sigma-Aldrich) adicionados a 100 mL de meio YPD líquido esterilizado

<sup>2</sup> Foram adicionados 20 µL da solução estoque 2 para um volume final de 300 µL no tratamento

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da atividade enzimática específica CD e VR

Todos os isolados estudados mostraram atividade CD e VR (Tabela 4), diferindo do relatado por Godoy et al. (2009), em que todas as cepas de leveduras *D. bruxellensis* testadas exibiram atividade CD, porém somente uma baixa porcentagem exibiu atividade VR.

As linhagens de *D. bruxellensis* apresentaram atividade CD na faixa de 184,4 a 215,5 U/mg, enquanto as linhagens industriais *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2 apresentaram valores inferiores, de 157,9 a 172,5 U/mg. Quanto à atividade VR, as leveduras *D. bruxellensis* também mostraram valores mais elevados (de 101,9 a 154,3 U/mg) do que as leveduras *S. cerevisiae* (91,6 a 94,9 U/mg), Tabela 4.

Até o presente momento não foi relatada atividade enzimática VR em linhagens de *S. cerevisiae* de vinho (CHATONNET et al., 1992; GODOY et al., 2009). É possível que os resultados encontrados para as linhagens PE-2 e CAT-1 nesse trabalho sejam falsos positivos, pois a metodologia utilizada para mensurar essa atividade avalia o consumo do co-fator NADPH que não é específico para a enzima VR. São necessários estudos complementares para corroborar essas análises.

Tabela 4. Atividade específica das enzimas cumarato descarboxilase (CD) e vinilfenol redutase (VR) das linhagens de *D. bruxellensis* (CCA059, CCA077, CCA155) e *S. cerevisiae* (CAT-1, PE-2).

Levedura	Atividade CD (U/mg proteína)	Atividade VR (U/mg proteína)
CAT-1	157,965 ± 19,61	91,5925 ± 5,55
PE-2	172,464 ± 31,12	101,942 ± 0,85
CCA059	184,443 ± 16,92	94,8719 ± 3,06
CCA077	215,524 ± 10,51	104,251 ± 21,56
CCA155	214,891 ± 1,65	154,263 ± 0,95

Coronado et al. (2015) afirmaram que o composto 4-vinilfenol (4-VF) induz a atividade enzimática VR, porém o 4-VF é capaz de reagir com outros componentes do vinho, como as antocianinas, formando compostos estáveis, o que impediria parcialmente a indução da atividade VR pelas leveduras *Dekkera* e, conseqüentemente, resultaria em uma menor atividade enzimática.

Comparando-se os resultados desse trabalho com os de Godoy et al. (2009), os quais utilizaram a mesma metodologia para estudar 12 isolados de *D. bruxellensis* e 1 isolado de *S. cerevisiae*, é possível verificar que as leveduras isoladas da fermentação etanólica brasileira apresentam mais altas atividades CD e VR que leveduras isoladas de vinho. Comparadas às leveduras de vinho, as leveduras da fermentação etanólica possuem uma atividade média de CD 16,5 vezes maior e uma atividade média de VR 2,5 vezes maior.

Ainda há muito a ser descoberto sobre as atividades enzimáticas CD e VR, pois existem poucos estudos sobre o assunto. Barthelmebs et al. (2000) revelaram que existem mecanismos desconhecidos envolvendo o metabolismo dos ácidos fenólicos. O *knockout* do gene *PAD* (ácido fenólico descarboxilase) em *Lactobacillus plantarum* induz duas outras enzimas, até então desconhecidas, com atividade CD. Segundo Schifferdecker et al. (2014), o gene *PAD* de leveduras *Dekkera* é muito mais similar ao gene *PAD* de bactérias do que ao gene *PAD1* de *S. cerevisiae*. Além disso, já foi descrita a presença de dois genes *PAD* em *Dekkera*. As linhagens de *Dekkera* desse trabalho exibiram uma atividade enzimática bastante elevada quando

comparada às leveduras *Dekkera* de vinho. Esses resultados apontam para a existência de fatores genéticos especiais: ou a expressão de novas enzimas, ou maior expressão de genes nas leveduras *D. bruxellensis* da fermentação para combustíveis.

O mosto da fermentação alcoólica utilizado nas destilarias é composto por uma mistura de melaço e caldo de cana (RODERO et al., 2016) e de acordo com resultados apresentados por Cabrita et al. (2012) e Šučur et al. (2016), a concentração total de ácidos hidroxicinâmicos no mosto da fermentação alcoólica é maior do que a encontrada no vinho. É provável que as leveduras selecionadas testadas nesse trabalho sejam conseqüentemente mais adaptadas a maior quantidade de ácidos hidroxicinâmicos, o que poderia explicar as altas atividades CD e VR.

A Tabela 5 apresenta os resultados da concentração de compostos fenólicos (ácidos hidroxicinâmicos e fenóis voláteis) nos meios de fermentação com caldo ou melaço, 16° Brix, pH 4,5, utilizados nos experimentos realizados nos anos de 2016 e 2017. A quantidade dos compostos fenólicos obtida em caldo e melaço apresentaram valores diferentes nas safras de 2016 e 2017. Nas plantas, os compostos fenólicos estão envolvidos no suporte e proteção dos tecidos, mecanismos de defesa e sinalização, além de apresentarem papel antioxidante (BOUDET, 2007). É natural que conforme mudem as condições ambientais durante o cultivo da cana-de-açúcar, bem como as condições e o tempo de armazenamento e transporte, as concentrações dos compostos fenólicos sejam alteradas. Adicionalmente, as usinas recebem diferentes variedades de cana-de-açúcar ao longo das safras para extração do caldo, portanto, é esperado encontrar variações das concentrações de fenólicos no caldo e melaço, tanto dentro de uma mesma safra, quanto mais ainda ao se comparar duas safras diferentes.

Em ambos os anos, o melaço mostrou uma tendência a acumular maior quantidade de compostos fenólicos. Em 2016, a concentração de ácido *p*-cumárico foi aproximadamente 2,5 vezes maior em melaço que em caldo, enquanto que em 2017 foi cerca de 3 vezes maior. A quantidade de ácido ferúlico foi 4,7 vezes maior em caldo que em melaço em 2016, enquanto que foi 3 vezes maior em melaço em 2017. O 4-vinilfenol é um composto facilmente reduzido a 4-etilfenol, além de que, segundo Coronado et al. (2015), é capaz de reagir com antocianinas formando compostos estáveis. Devido a isso eram esperadas baixas concentrações no caldo

após extração e que a concentração decaísse com o tempo restando bem pouco no melaço. Essa expectativa se confirmou em ambas as safras. Conforme esperado, a concentração de 4-etilfenol em melaço foi alta em 2017 enquanto em caldo não foi detectado. Em 2016 a concentração de 4-etilfenol foi menor em melaço que em caldo, isso pode indicar que o melaço deste ano foi armazenado por mais tempo e houve condições favoráveis à volatilização do 4-etilfenol.

Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos em meios de caldo de cana e melaço utilizados nos experimentos fermentativos em 2016<sup>1</sup> e 2017<sup>2</sup>, 16° Brix, pH 4,5.

Composto	Caldo (mg/L)		Melaço (mg/L)	
	2016	2017	2016	2017
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,7	4,9 ± 0,37	11,5	14,7 ± 1,2
Ácido ferúlico	1,9	1,2 ± 0,14	0,4	3,6 ± 0,31
4-vinilfenol	0,8	0,1 ± 0,14	0,4	0
4-vinilguaiacol	0	0	0,1	0,2 ± 0,26
4-etilfenol	0,9	0	0,5	5,2 ± 0,38
4-etilguaiacol	0,5	0	0	0

<sup>1</sup> Amostra sem repetição; <sup>2</sup> Média e desvio-padrão de 10 repetições

## 5.2 Fermentação em batelada sem reciclo celular

Tanto em caldo quanto em melaço o crescimento da linhagem *S. cerevisiae* PE-2 atingiu e máximo em 48 h (Figura 2A e 2B).

Houve diferença no crescimento da levedura *D. bruxellensis* CCA059 em caldo e melaço, com estabilização após 24 h em caldo, e em 48 h em melaço (Figura 2C e 2D). A diferença observada no crescimento pode ser devida à diferença na composição nutricional, de ácidos orgânicos ou fontes de nitrogênio. Assim como a levedura *S. cerevisiae* PE-2, a linhagem de *D. bruxellensis* CCA059 não produziu 4-EF mesmo possuindo atividade enzimática VR.

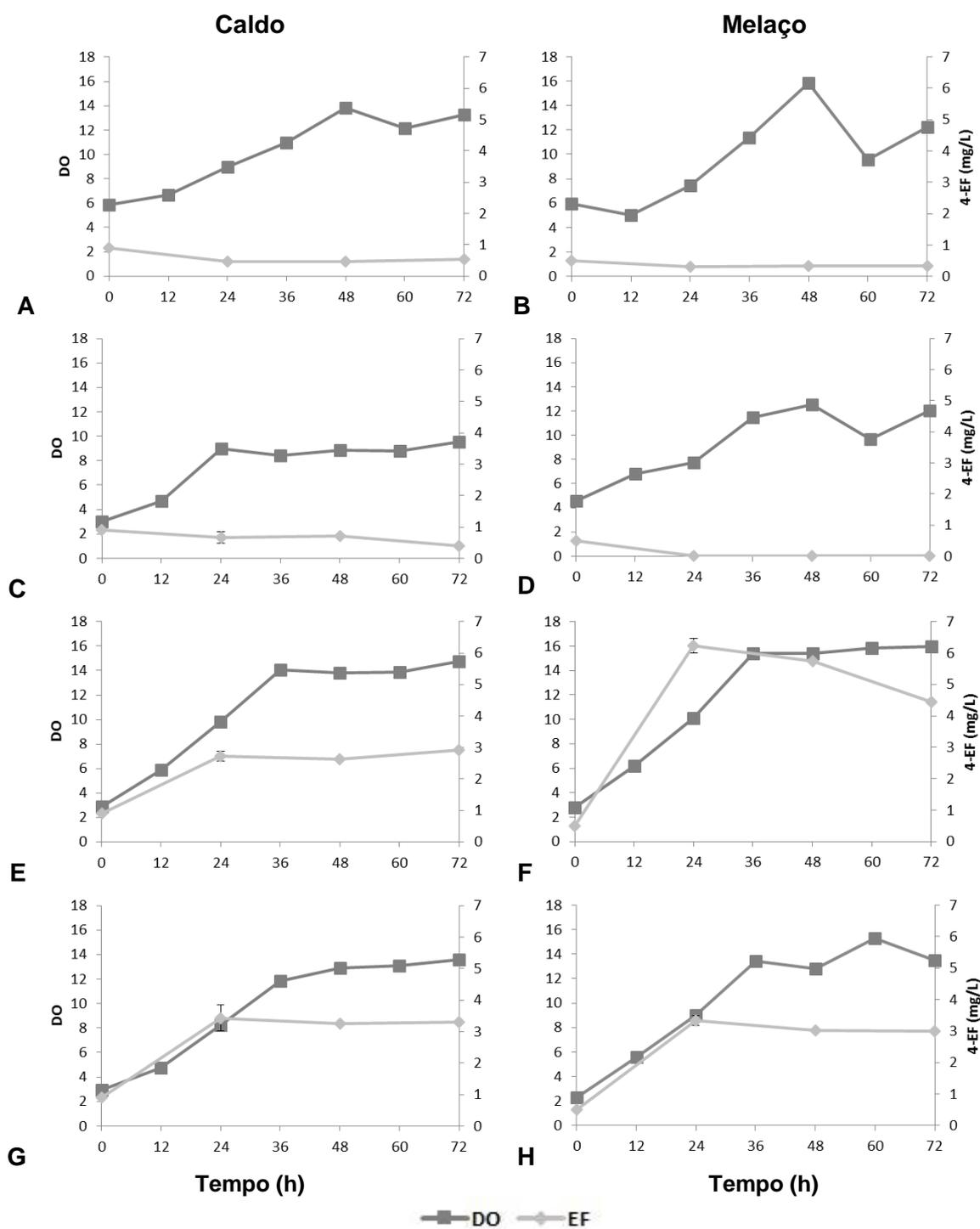
O crescimento da levedura *D. bruxellensis* CCA077 foi semelhante em caldo e melação, estabilizando em 36 h para ambos os meios de cultivo (Figura 2E e 2F), porém a densidade ótica foi 1,3 maior em melação.

A levedura *D. bruxellensis* CCA155 apresentou estabilização de crescimento após 36 h de cultivo em ambos os meios, sendo a densidade ótica 1,6 maior em melação. As máximas produções de 4-EF tanto em caldo quanto em melação foram obtidas após 24 h (Figura 2G e 2H).

Considerando-se somente as linhagens de *D. bruxellensis* que apresentaram produção de 4-EF (CCA077 e CCA155), a produção ocorreu nas primeiras 24 h, coincidente com a fase exponencial de crescimento, estabilizando a seguir, ou até com decréscimo na concentração (Figura 2E, 2F, 2G e 2H). Isto não ocorreu devido ao esgotamento dos precursores dos meios de cultivo, pois as análises cromatográficas mostraram que inicialmente o caldo possuía 4,7 mg/L de ácido p-cumárico e 0,8 mg/L de 4-VF (Tabela 2, ano de 2016), sendo que as linhagens CCA077 e a CCA155 produziram em 24 h, respectivamente, 2,4 mg/L e 3,43 mg/L de 4-EF.

Coronado et al. (2015) avaliaram a produção de 4-EF por uma linhagem de *Dekkera* de vinho de uva em cada fase de crescimento e concluíram que a maior parte deste composto fenólico era produzido durante a fase estacionária. Bernardi et al. (2011) afirmaram que as enzimas CD e VR são intracelulares, sendo liberadas no momento da lise celular que se inicia na fase estacionária. Complementarmente, Šučur et al. (2016) relataram que a síntese de 4-EF ocorreu durante o fim da fase exponencial ou durante a fase estacionária de crescimento em meios sintéticos ou em vinho. Contraditoriamente, as linhagens de *D. bruxellensis* aqui estudadas (com exceção da linhagem CCA059) exibiram síntese de 4-etilfenol na fase exponencial de crescimento. Esse resultado encontra maior similaridade com os dados apresentados por Dias et al. (2003), os quais verificaram que em meio sintético YNB enriquecido, a linhagem de *Dekkera* estudada iniciou a produção de 4-EF no meio da fase exponencial e a finalizou no início da fase estacionária.

Figura 2. Curva de crescimento (densidade óptica, DO) e produção de 4-etilfenol (4-EF) pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 (A e B) e pelas linhagens de *D. bruxellensis* CCA059 (C e D), CCA077 (E e F) e CCA155 (G e H) em caldo e melaço, a 30°C, sem agitação, por 72 h.



No meio com melaço inicial havia 11,5 mg/L de ácido *p*-cumárico e 0,4 mg/L de 4-VF (Tabela 2, ano de 2016), sendo que as linhagens CCA077 e a CCA155 produziram em 24 h, respectivamente, 6,23 mg/L e 3,33 mg/L de 4-EF (Figura 3F e 3H). Segundo Fulgelsang e Edward (1997) e Šučur et al. (2016), algumas estirpes de *Dekkera* conseguem equilibrar suas funções metabólicas ao converter ácidos hidroxicinâmicos em vinilfenóis e utilizar a enzima VR para oxidar NADH em NAD<sup>+</sup>, reduzindo os vinilfenóis em etilfenóis. Esta é a possível explicação para a produção de 4-EF associada ao crescimento, pois é uma fase de grande atividade metabólica e poderia gerar um desbalanço de NAD<sup>+</sup>/NADH se não houvesse produção de 4-EF.

A máxima produção de 4-EF pela linhagem CCA077 foi obtida após 24 h para ambos os meios (Figura 2E e 2F), contudo em melaço foi duas vezes maior. As análises de HPLC mostraram que o melaço utilizado neste trabalho possuía 2,5 vezes mais precursor ácido *p*-cumárico que o caldo, sendo, portanto um resultado esperado.

Ao contrário do vinho de uva, nas indústrias brasileiras a fermentação dura de 6 a 12 h (LOPES et al., 2016). Nos experimentos aqui realizados, a primeira avaliação da concentração de fenóis voláteis foi feita somente após 24 horas, onde se verificou o máximo de produção para alguns compostos, até o final de 72 h. Nas condições industriais, utiliza-se o sistema de reciclo celular, com tempo menor do que 24 h para cada ciclo de fermentação. Desta forma, o próximo item descreve os resultados obtidos quanto à produção de fenóis voláteis ao longo de seis ciclos de fermentação de 12 horas, tanto em caldo quanto em melaço, a fim de verificar se os referidos compostos são produzidos em tempo muito menor.

### **5.3 Fermentação em batelada com reciclo celular**

Os experimentos de fermentação em batelada com reciclo celular foram realizados no ano de 2016 e repetidos no ano de 2017. A fim de avaliar se havia diferença entre os resultados obtidos nos dois anos, foi realizada análise de variância para verificação da existência de interação significativa entre Experimento – Levedura – Ciclo Fermentativo para os resultados de concentração de 4-etilfenol em caldo de cana e melaço. Foi escolhida essa variável de resposta em detrimento das demais, como produção de etanol, consumo de açúcar, pH e número de células das leveduras, pelo fato de a produção de fenóis voláteis ser o foco principal do presente trabalho.

Houve interação significativa em nível de 5% para os resultados de concentração de 4-etilfenol em caldo de cana, indicando que houve diferença na produção desse composto pelas leveduras nos diferentes ciclos de fermentação entre os dois experimentos (Tabela 6). Dessa forma, não é recomendado que os resultados dos dois experimentos sejam analisados em conjunto, e sim separadamente, para todos os parâmetros analisados na fermentação.

Tabela 6. Análise de variância dos valores de concentração de 4-etilfenol nas fermentações desenvolvidas em caldo de cana, com as culturas puras de *S. cerevisiae* PE-2 e das linhagens de *D. bruxellensis* CCA059, CCA077 e CCA155, ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C, pH 4,5, em sistema de batelada com reciclo celular.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Experimento (2016/2017)	37,556	1	37,556	538,573 *
Levedura	79,739	3	26,579	381,160 *
6 Ciclos	28,2634	5	5,653	81,062 *
Experimento X Levedura	40,534	3	13,511	193,759 *
Experimento X Ciclo	1,421	5	0,284	4,076 *
Levedura X Ciclo	28,524	15	1,902	27,270 *
Experimento X Levedura X Ciclo	7,429	15	0,495	7,102 *
Resíduo	6,694	96	0,070	
Total	230,162	143		

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ )

Coeficiente de variação= 19,13%

Com relação ao melaço, não houve interação significativa em nível de 5% para os resultados de concentração de 4-etilfenol, indicando que houve os mesmos padrões de produção desse composto nos diferentes ciclos de fermentação pelas leveduras entre os dois experimentos (Tabela 7). Assim, os resultados obtidos nos dois experimentos (2016 e 2017) foram apresentados como médias dos dois experimentos, para todos os parâmetros analisados na fermentação.

Tabela 7. Análise de variância dos valores de concentração de 4-etilfenol nas fermentações desenvolvidas em melaço, com as culturas puras de *S. cerevisiae* PE-2 e das linhagens de *D. bruxellensis* CCA059, CCA077 e CCA155, ao longo de seis ciclos fermentativos de 12 horas, a 30°C, pH 4,5, em sistema de batelada com reciclo celular.

Causa de variação	SQ	GL	QM	F
Experimento (2016/2017)	12,662	1	12,662	13,892 *
Levedura	1195,131	3	398,377	437,076 *
6 Ciclos	57,359	5	11,472	12,586 *
Experimento X Levedura	120,959	3	40,320	44,236 *
Experimento X Ciclo	5,430	5	1,086	1,191 ns
Levedura X Ciclo	113,224	15	7,548	8,282 *
Experimento X Levedura X Ciclo	21,152	15	1,410	1,547 ns
Erro	87,500	96	0,9110	
Total	1613,417	143		

\* = significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $0,01 \leq p < 0,05$ )

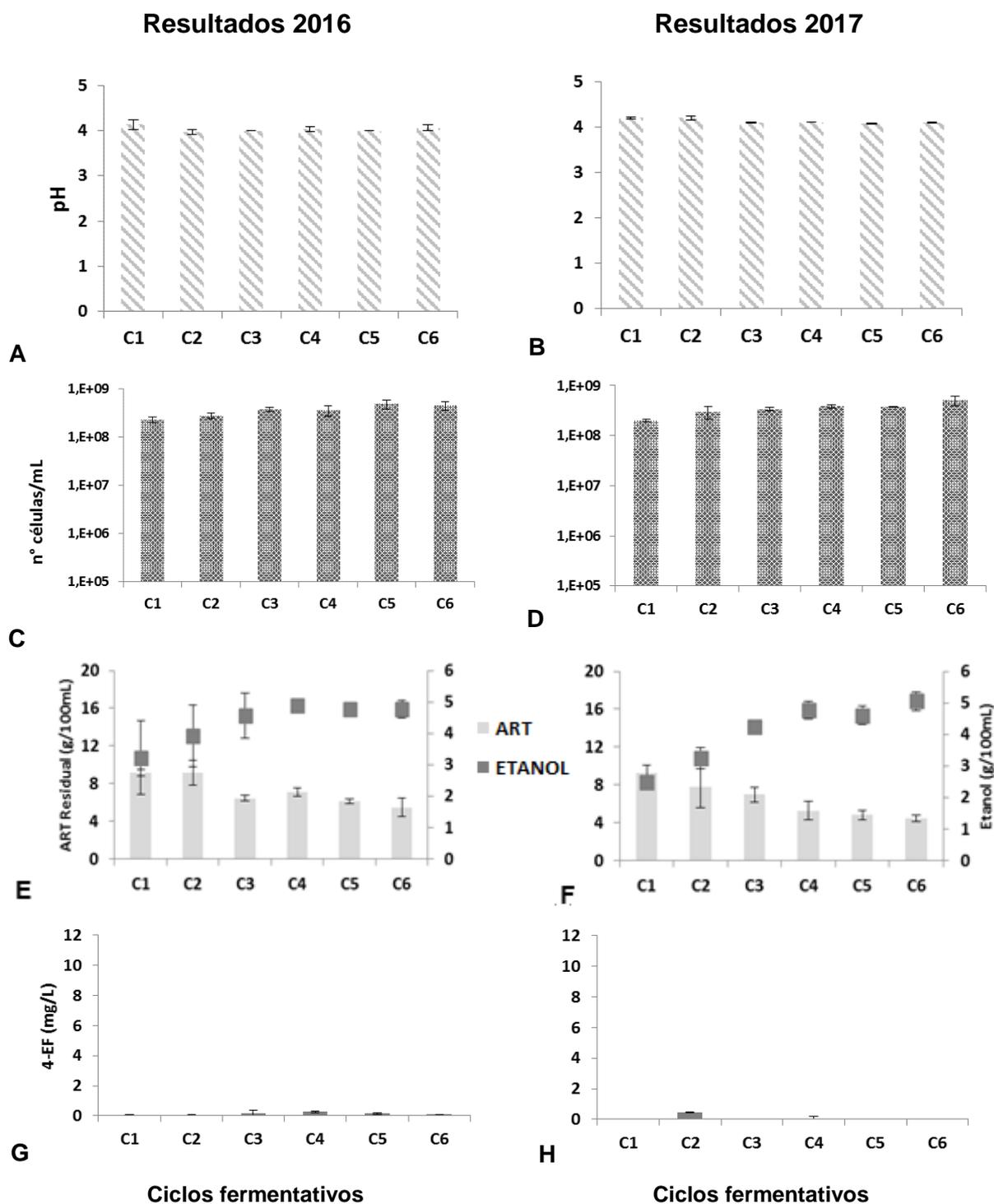
ns= não significativo ( $p \geq 0,05$ )

Coeficiente de variação= 11,68%

Os resultados dos parâmetros fermentativos em caldo de cana (pH, etanol e concentração de açúcar redutor total) e da produção de 4-etilfenol das quatro leveduras estudadas estão apresentados nas Figuras 3 a 6.

Com relação à linhagem *S. cerevisiae* PE-2, tanto os resultados de 2016 quanto os de 2017, obtidos por HPLC das concentrações de 4-EF indicaram que a linhagem PE-2 não tem atividade VR ou essa não é expressa nas condições de fermentação em caldo, de forma que os resultados da atividade enzimática VR apresentados anteriormente são, provavelmente, falsos positivos (Figura 3). Além disso, os resultados para pH, número de células, consumo de açúcar e produção de etanol nos dois anos foram muito semelhantes, havendo somente uma pequena produção maior de etanol no 6º ciclo no ano de 2017 (0,27 g/100mL a mais).

Figura 3. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $2,12 - 2,51 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 18,87 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto de caldo de cana das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, ao final de 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.



Os resultados obtidos na fermentação em batelada com reciclo celular por *S. cerevisiae* PE-2 mostraram decréscimo de pH maior em caldo que em melaço (Figura 3A,3B e 7A), provavelmente pelo fato de o melaço ser um meio com maior poder tamponante que o caldo (SOUZA et al., 1995).

Godoy et al. (2008) demonstraram que tanto a atividade CD quanto VR são estáveis em pH 3,4, sendo que a presença de etanol diminui drasticamente a atividade CD, enquanto a atividade VR é mais estável. Benito et al. (2009) concluíram que pH abaixo de 2,17 inibe a produção de 4-EF por *D. bruxellensis*. Nos experimentos com reciclo celular, o menor pH mensurado foi de 3,8 em caldo (Figura 9A) e, portanto, não seria suficiente para interferir com as atividades enzimáticas CD e VR.

Leveduras *Dekkera* isoladas de vinho são conhecidas por produzirem 4-etilfenol especialmente na fase estacionária de crescimento, quando o processo fermentativo do mosto de uva já acabou e o vinho com pouco açúcar é deixado para maturar. A produção de 4-etilfenol por leveduras *Dekkera* em mostos ricos de açúcar só é relevante nas condições brasileiras de fermentação para produção de etanol devido ao reciclo das leveduras durante toda a safra, o que permite que as leveduras se multipliquem e ativem esse metabolismo.

Em caldo, as linhagens *D. bruxellensis* CCA059 e CCA077 apresentaram produção de 4-etilfenol maior no experimento de 2017 do que no de 2016, mas sempre foi abaixo de 3 mg/L em média (Figuras 4G, 4H, 5G e 5H). Em 2016 a população inicial da levedura CCA059 era  $1,56 \times 10^8$  cel/mL e aumentou para  $2,16 \times 10^8$  cel/mL no final do primeiro ciclo, enquanto que no ano de 2017 onde a população inicial era de  $2,75 \times 10^8$  cel/mL e aumentou para  $3,98 \times 10^8$  cel/mL, ou seja, além de haver inicialmente quase o dobro de células, houve o dobro de crescimento em 2017. Por outro lado, a levedura CCA077 em 2016 apresentou uma população inicial de  $3,57 \times 10^8$  cel/mL que aumentou para  $3,79 \times 10^8$  cel/mL no primeiro ciclo, em oposição à 2017 onde a população inicial era  $3,86 \times 10^8$  células/mL e aumentou para  $5,01 \times 10^8$  células/mL, ou seja, a população inicial era semelhante, porém em 2017 houve maior crescimento. Dessa forma pode-se relacionar o maior crescimento no apresentado no experimento conduzido em 2017 com a maior produção de 4-etilfenol, comparado ao experimento conduzido em 2016.

Nos experimentos realizados tanto em 2016 quanto em 2017, a levedura CCA059 praticamente não apresentou crescimento no decorrer dos 6 ciclos fermentativos em caldo de cana (Figuras 4C e 4D). Esse comportamento difere do obtido por Meneghin et al. (2013), que utilizando a mesma levedura e partindo de uma concentração inicial de células muito semelhante, obteve um crescimento aproximado de 4 ciclos log após 6 ciclos fermentativos. Paralelamente, Meneghin e colaboradores observaram que o pH reduziu de 4,5 para aproximadamente 3 enquanto que no presente experimento o mesmo se manteve próximo a 4 (Figuras 4A e 4B). Por outro lado, o consumo de açúcar e a produção de etanol foram muito semelhantes, com o ART ao final do 6° ciclo em torno de 6 g/100mL, enquanto a produção de etanol no 6° ciclo foi de aproximadamente 1 g/100mL (Figuras 4E e 4F).

Figura 4. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $1,56 - 2,75 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 17,29 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA059 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, ao final de 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.

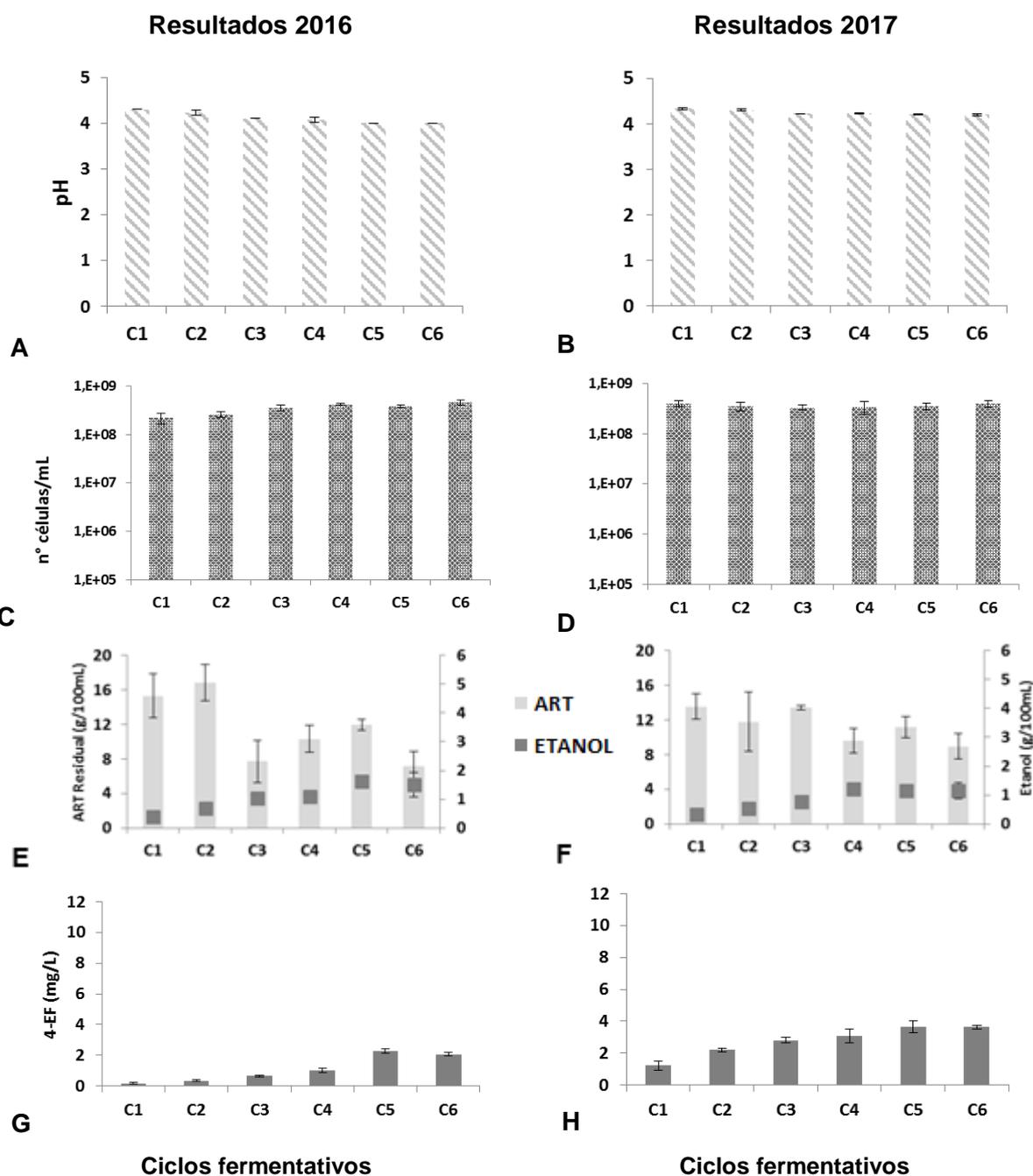
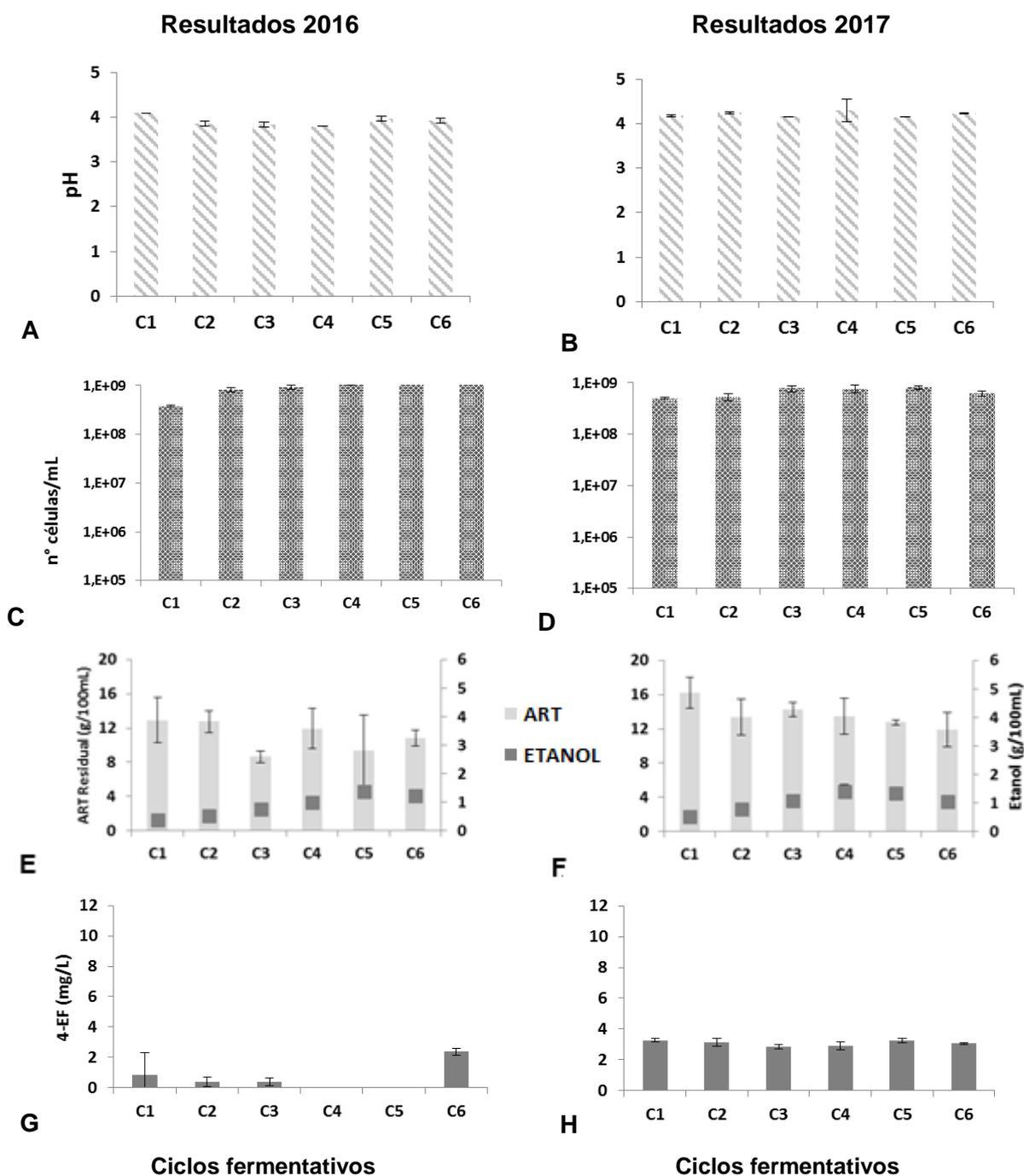


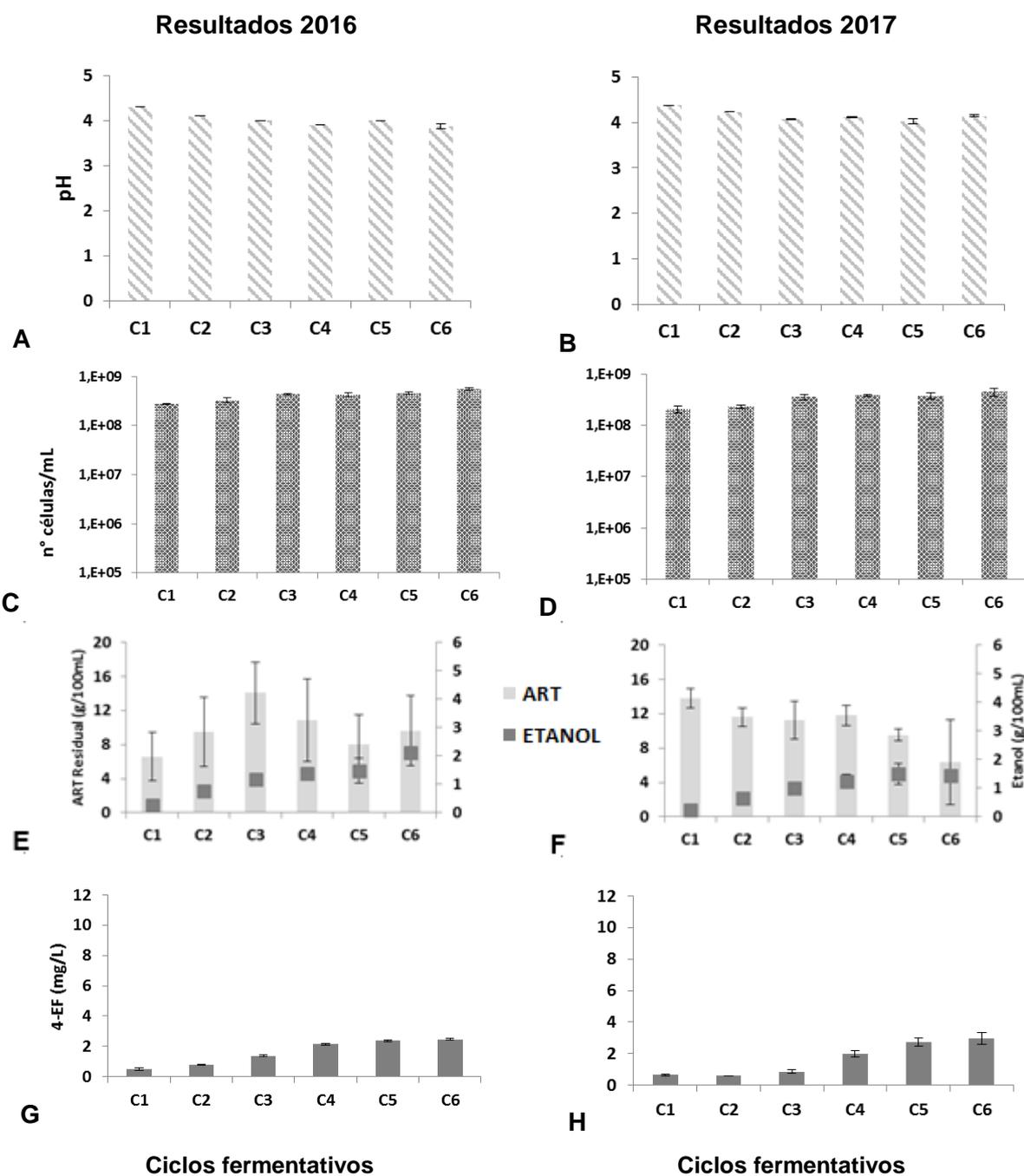
Figura 5. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $3,57 - 3,86 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 15,39 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA077 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, ao final de 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.



A levedura CCA155 não apresentou maior produção de 4-etilfenol no caldo de 2017 em relação a 2016 (Figura 6G e 6H). O número inicial de células foi semelhante nos dois experimentos e o padrão de crescimento foi parecido ao final do primeiro ciclo (crescimento de  $8,8 \times 10^8$  cel/mL em 2016 e  $5,2 \times 10^8$  cel/mL em 2017) (Figura 6C e 6D), dessa forma era de se esperar que não ocorresse o mesmo padrão de aumento da produção de 4-EF em 2017, como ocorreu com as linhagens CCA059 e CCA077.

A linhagem CCA155 em caldo no ano de 2016 apresentou menores valores de ART no ciclo 1 e 2 comparado ao ciclo 3 (Figura 6E e 6F), contudo não houve variação significativa em nenhum outro resultado avaliado nos 2 anos. Não houve variação significativa no pH ao longo do ciclos entre os anos de 2016 e 2017 (Figura 6A e 6B).

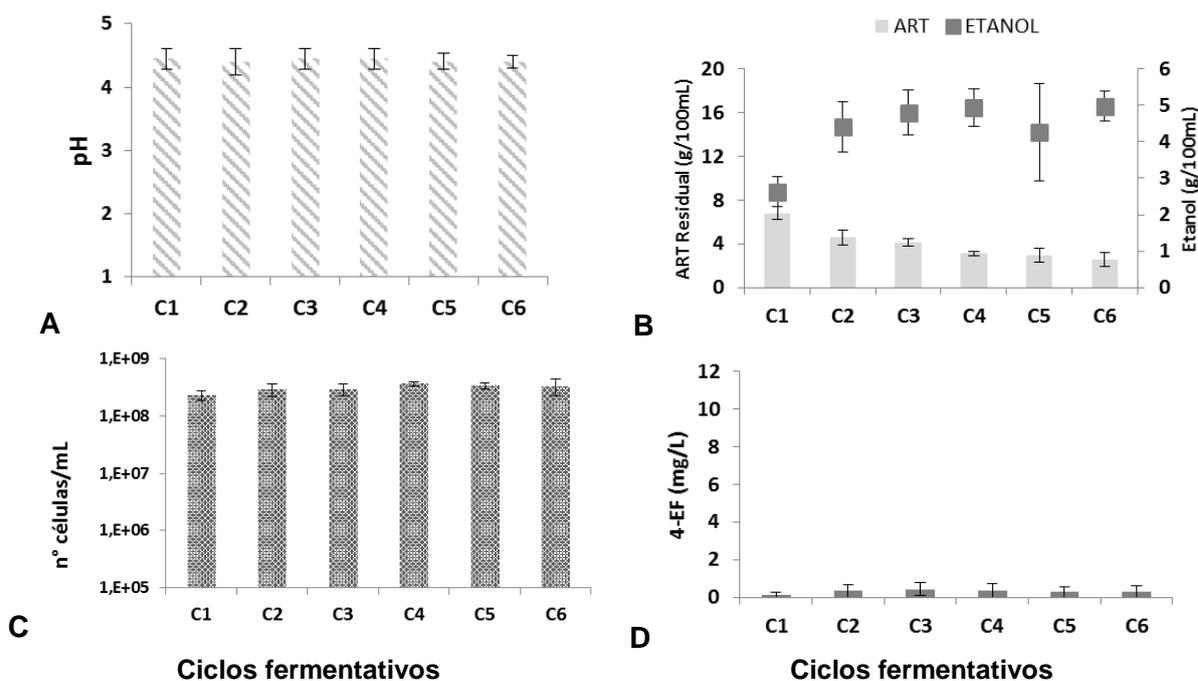
Figura 6. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $1,59 - 1,86 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 16,16 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA155 em caldo de cana, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, ao final de 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017.



Bassi (2016) avaliou o comportamento da linhagem de levedura *S. cerevisiae* PE-2 em melaço. Assim como no presente trabalho (Figura 7B), a levedura estabilizou a produção de etanol no 4º ciclo fermentativo, atingindo produção máxima em torno de 5 g/100mL. O consumo de açúcar também foi muito semelhante atingindo aproximadamente 7,5 ART após o 1º ciclo até aproximadamente 2,5 no 6º ciclo.

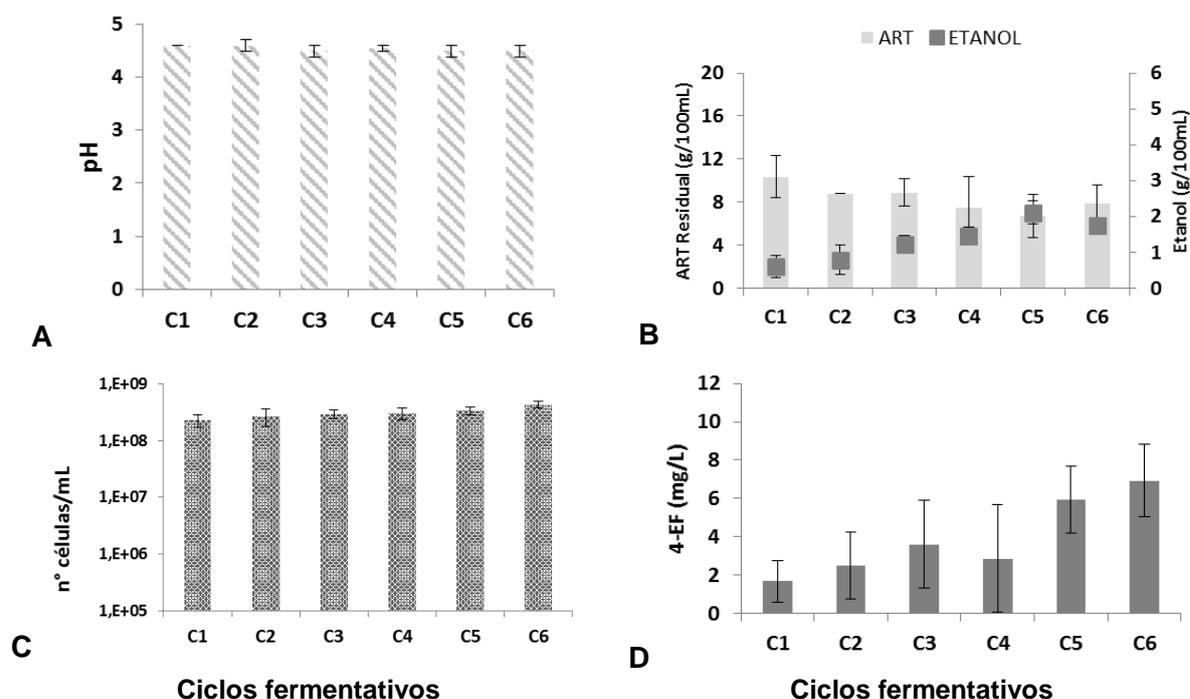
Por fim, o pH ao longo do ciclos também foi semelhante, se mantendo entre 4 e 5 (Figura 7A). Não houve variação no crescimento da levedura ao longo dos ciclos e não houve produção do composto 4-etilfenol.

Figura 7. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $1,55 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 13,7 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 em melaço, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.



A levedura CCA059 não apresentou em melaço variação no valor de pH e no número de células no decorrer dos 6 ciclos (Figuras 8A e 8C), por outro lado, ocorreu aumento da produção de etanol e de 4-etilfenol a cada novo ciclo, acompanhado da redução progressiva do ART (8B e 8D). KOSEL et al., (2014) relataram que a adição de 2,5% de etanol aumentou a produção de 4-etilfenol. Dessa forma, é possível que o aumento do etanol tenha estimulado o aumento do 4-etilfenol. Por outro lado, como a produção de 4-etilfenol é necessária para equilibrar o balanço NAD<sup>+</sup>/NADH e manter o metabolismo ativo, é possível que a produção de 4-EF tenha sido induzida pelas células para compensar o aumento do consumo de açúcar e a consequente ativação do metabolismo.

Figura 8. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $1,55 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 14,36 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA059 em melaço, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.



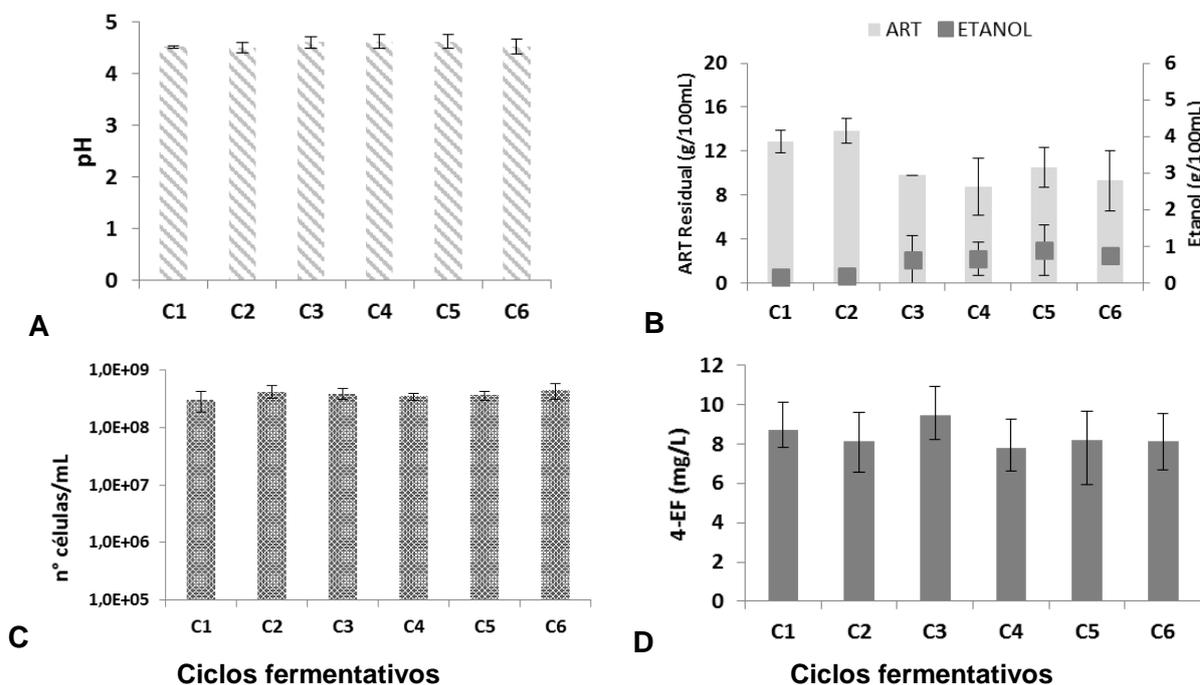
Os resultados obtidos para 4-EF em melaço para as leveduras CCA077 e CCA155 (Figuras 9D e 10D) corroboram os dados obtidos sobre a atividade enzimática VR dessas leveduras, que mostrou que a linhagem CCA155 possui uma atividade VR 1,5 vezes menor que a CCA077 e que, por conseguinte, produziu uma quantidade 1,5 vezes menor de 4-EF. Porém o mesmo não ocorreu em caldo (Figuras 5G, 5H, 6G e 6H), situação em que ambas as leveduras apresentaram a mesma produção de 4-EF. Esse resultado reforça a hipótese de que em substratos mais estressantes (como o melaço) a maior atividade enzimática.

A linhagem de *D. bruxellensis* CCA077 se mostrou uma exceção, pois tanto em caldo (Figura 5H) quanto em melaço (Figura 9D) apresentou alta produção de 4-etilfenol desde o primeiro ciclo ( $3,26 \pm 0,11$  mg/L em caldo e  $8,69 \pm 0,87$  mg/L em melaço), exibindo as máximas produções deste composto em melaço no terceiro ciclo ( $9,47 \pm 1,22$  mg/L).

Gomes (2012) observou que existem diferenças no valor de conversão molar do ácido *p*-cumárico em 4-etilfenol entre diferentes estirpes de *D. bruxellensis*, o que atribuiu à diversidade genética entre as leveduras. Devido ao padrão único de comportamento metabólico, é muito provável que a linhagem CC077 possua variações genéticas, como múltiplas cópias do gene *DbVPR*, responsável pela produção da enzima vinilfenol redutase, ou que possua mecanismos de superexpressar esse gene quando em condições para o crescimento, tendo em vista que a produção de 4-etilfenol pode ser necessário para equilibrar o balanço NAD<sup>+</sup>/NADH ao oxidar o NADH em NAD<sup>+</sup> e tornar possível a obtenção de energia para seu crescimento celular (FULGELSANG; EDWARD, 1997; ŠUĆUR et al., 2016).

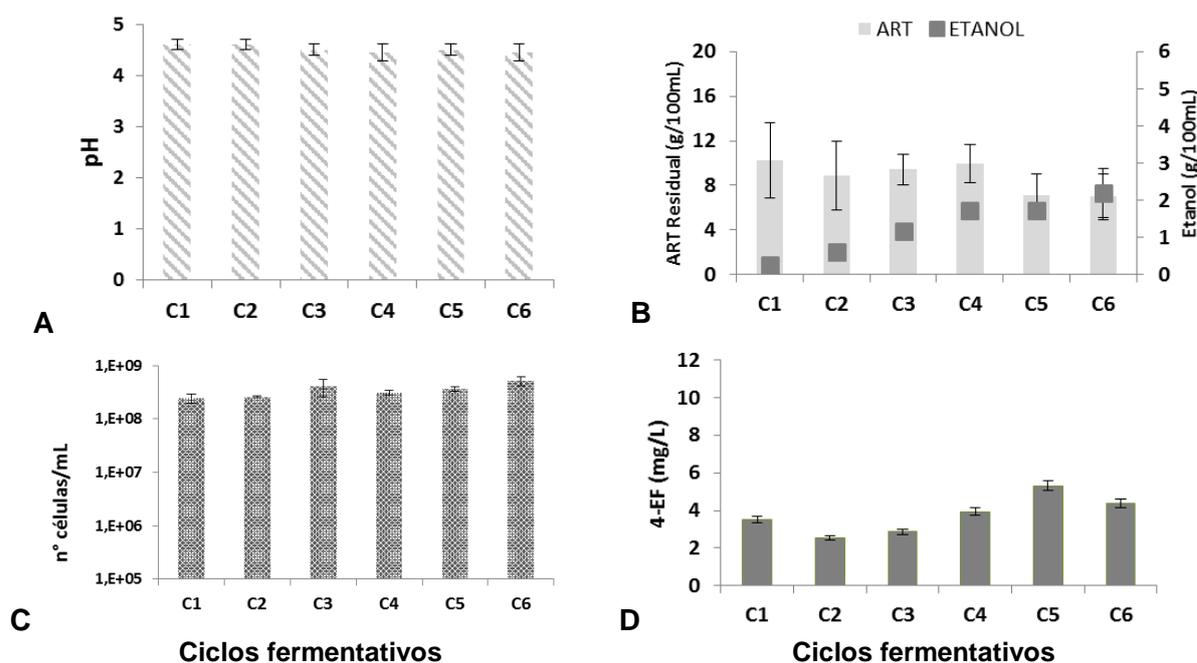
Diferente do observado com as outras linhagens de *Dekkera*, a levedura CC077 praticamente não produziu etanol no decorrer dos ciclos (Figura 9B) enquanto por outro lado produziu muito 4-etilfenol (Figura 9D). Esses dados reforçam a probabilidade desta levedura possuir mecanismo especial que regule a produção de 4-EF, pois diferente das outras linhagens avaliadas, essa produção não parece estar sendo afetada pela produção de etanol.

Figura 9. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $3,7 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 14,97 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA077 em caldo de melaço, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.



A levedura CCA155 mostrou em melaço comportamento semelhante ao observado com a levedura CCA059. Não houve significativa variação do pH e do número de células no decorrer dos ciclos fermentativos (Figuras 10A e 10C), contudo é possível ver uma relação entre o aumento da produção de etanol e o aumento da produção de 4-etilfenol no decorrer dos ciclos (Figuras 10B e 10D). Conforme já citado anteriormente, KOSEL et al., (2014) verificaram uma relação entre concentração de etanol e produção de 4-etilfenol. Dessa forma, é possível que o aumento do etanol tenha estimulado o aumento da produção de 4-etilfenol.

Figura 10. Número de células de leveduras/mL (inicial de  $2,23 \times 10^8$  cel/mL), pH, concentrações de açúcar redutor residual (ART, inicial de 14,11 g/100 mL), etanol e 4-etilfenol (4-EF) no mosto das fermentações desenvolvidas pela linhagem de *D. bruxellensis* CCA155 em melaço, a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos.



ŠUČUR et al., (2016) relataram que a concentração de 5% de etanol é favorece a produção de fenóis voláteis, enquanto valores de 12,5 e 13,5% (v/v) diminuem drasticamente a produção de 4-EF. Complementarmente, KOSEL et al. (2014) verificaram que a adição de 2,5% de etanol aumenta a produção de 4-etilfenol. Tanto em caldo, quanto em melaço, todas as linhagens de *D. bruxellensis* produziram menos de 2 g/100mL de etanol, ou seja, 2% de etanol, o que pode ter colaborado para aumentar a produção de 4-etilfenol nos meios. O consumo máximo de ART foi em torno de 50% do ART inicial pela linhagem CCA059, o que significa que houve também grande sobra de açúcar. A máxima variação de pH foi uma queda de 0,7 à partir do valor inicial de 4,5 que ocorreu no 2° ciclo da linhagem CCA077 em caldo atingindo pH 3,8, e ocorreu no 6° ciclo da linhagem CCA155, com valor também de 3,8, coincidindo com a máxima produção de 4-etilfenol obtida por essa levedura em caldo.

Fazendo-se análise comparativa do crescimento entre as leveduras nos dois experimentos realizados, verificou-se que ao longo dos seis ciclos fermentativos a variação do número de células foi inferior a um ciclo log para todas as leveduras. Somente para a linhagem *D. bruxellensis* CCA077, houve maior discrepância entre o crescimento em caldo e melaço em 2016, crescendo 0,62 log em caldo comparado a 0,17 em melaço. Porém no ano de 2017 essa discrepância não se repetiu, tendo crescido somente 0,2 log em caldo enquanto não houve crescimento em melaço.

Dias et al. (2003) mostraram que a atividade VR depende da fonte de carbono e energia, isto é, altas taxas de conversão de ácido *p*-cumárico em 4-EF só ocorreram quando a glicose ou o etanol estão presentes como substrato. Em todos os experimentos não houve diferença entre a produção de etanol em caldo e melaço para todas as leveduras, sendo que o consumo do ART aumentou com o decorrer dos ciclos enquanto que paralelamente também aumentou a produção de etanol.

Todas as leveduras *D. bruxellensis* produziram mais 4-etilfenol em melaço que em caldo. Nos experimentos com reciclo celular tanto em caldo quanto em melaço, foi possível observar o aumento da produção de 4-etilfenol a cada novo reciclo de células, assim como também houve o aumento da produção de etanol. Os experimentos de ciclo único mostraram que ao final de 12 h, tempo de duração de um ciclo, todas as leveduras *Dekkera* estão em fase exponencial de crescimento, desse modo é possível afirmar que a produção de 4-etilfenol nos experimentos com reciclo foi associada ao crescimento.

Tanto nos experimentos de ciclo único quanto com reciclo foram analisadas as concentrações dos compostos fenólicos 4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol e 4-etilguaiacol. A produção de 4-vinilfenol foi menor ou igual que 6,5 mg/L, já os outros resultados apresentaram valores muito baixos desses compostos, sendo a produção de 4-vinilguaiacol menor ou igual a 0,6 mg/L enquanto a produção de 4-etilguaiacol foi menor que 2,5 mg/L.

O limiar de percepção de um composto indica a concentração necessária no meio para que possa ser percebido sensorialmente. Em vinhos, os limiares de percepção para fenóis voláteis foram estimados em 0,42 mg/L para 4-EF (ŠUĆUR et al., 2016). Desse modo, todas as linhagens de *D. bruxellensis* deste trabalho produziram quantidade muito superior ao limiar de percepção aceito para vinhos de uva.

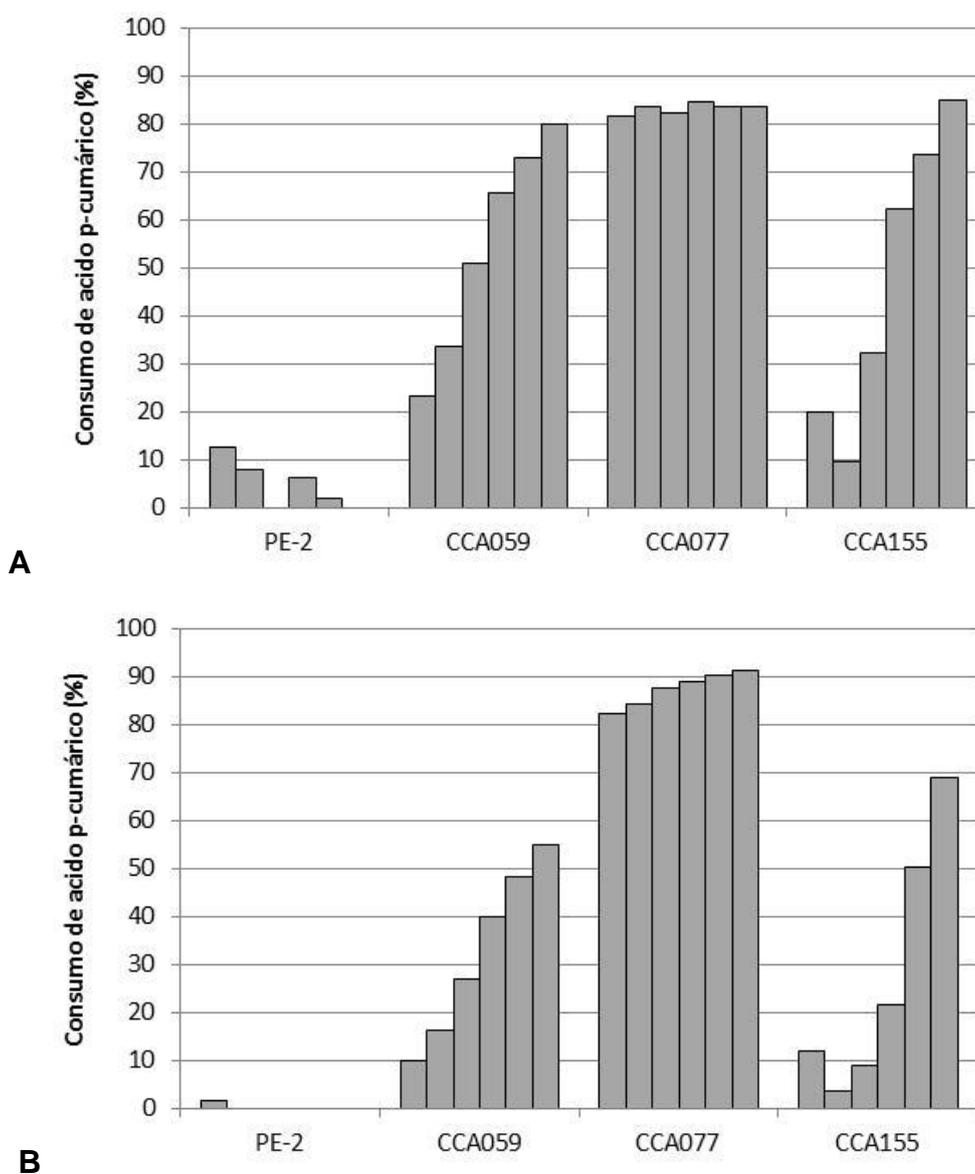
A Figura 11 mostra o consumo médio percentual de ácido *p*-cumárico no decorrer dos 6 ciclos fermentativos pelas linhagens de levedura avaliadas nesse estudo. É possível verificar que a levedura *S. cerevisiae* PE-2 consumiu menos de 13% do ácido *p*-cumárico presente em caldo de cana e menos de 3% do presente em melaço. Esses dados, comparados aos gráficos de produção de 4-EF por essa levedura em caldo e melaço, permitem concluir que essa levedura não converteu o ácido *p*-cumárico nem para 4-VF nem para 4-EF, demonstrando grande tolerância as quantidades desse ácido existentes em caldo e melaço.

A conversão de ácido *p*-cumárico em 4-VF e 4-EF envolve gasto de energia, portanto é uma alternativa viável somente se há necessidade de reduzir a toxicidade do ácido *p*-cumárico ou para equilibrar o balanço NAD<sup>+</sup>/NADH, conforme realizado por leveduras *Dekkera*. A linhagem PE-2, portanto não deve necessitar de nenhuma dessas alternativas e concentra o gasto energético para outras funções metabólicas, como a produção de etanol que se mostrou elevada.

Em melaço, a levedura CC077 mostrou o mesmo percentual de consumo de ácido *p*-cumárico que em caldo, por volta de 80% desde o primeiro ciclo (Figura 11A e 11B), chegando a atingir cerca de 90% ao final do sexto ciclo em melaço, condizendo com as elevadas produções de 4-EF desde o primeiro ciclo relatadas tanto em caldo quanto em melaço (Figuras 5H e 9D) e ainda poderia produzir mais 1 a 2 mg/L de 4-EF pois apresentou cerca de 1 a 2 mg/L de ácido *p*-cumárico residual. A conversão estequiométrica de ácido *p*-cumárico para 4-vinilfenol é de 1 mol para 1 mol, assim como de 4-vinilfenol para 4-etilfenol.

As leveduras CC059 e CCA155 exibiram percentuais de consumos menores no melaço (Figura 11B) que em caldo (Figura 11A). Sabendo que em melaço houve um residual de ácido *p*-cumárico de cerca de 6 mg/L para a linhagem CCA059 e de 4 mg/L para a linhagem CCA155, isso indica que haveria a possibilidade dessas leveduras produzirem mais 6 mg/L e 4 mg/L de 4-EF, respectivamente. Em caldo, os teores residuais de ácido *p*-cumárico não diferiram muito entre as leveduras, por volta de 0,7 a 1 mg/L.

Figura 11. Consumo (%) do ácido *p*-cumárico em caldo de cana (A) e melação (B), durante as fermentações desenvolvidas pelas linhagens de *D. bruxellensis* (CCA059, CCA077 e CCA155) e *S. cerevisiae* (linhagem PE-2), a 30°C, pH 4,5, sem agitação, durante 6 ciclos fermentativos de 12 h. Os experimentos foram realizados em 2016 e repetidos em 2017, sendo apresentada a média aritmética dos 2 experimentos. As barras indicam os seis ciclos fermentativos.



#### 5.4 Efeito dos compostos fenólicos sobre a velocidade específica de crescimento da *S. cerevisiae* PE-2

Não houve efeito inibitório dos compostos fenólicos (ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol) sobre a velocidade específica de crescimento da levedura *S. cerevisiae* nas concentrações testadas (Tabela 8). A escolha das concentrações se baseou nos resultados obtidos nos experimentos de fermentação em batelada com reciclo celular, testando-se concentrações abaixo e acima das máximas obtidas.

Tabela 8. Velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu$  máx,  $h^{-1}$ ) da linhagem de *S. cerevisiae* PE-2 em meio YPD acrescido de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol em diferentes concentrações, utilizando-se a leitora de microplacas Tecan Infinite® M200, a 30°C, 150 rpm, com leitura da densidade óptica (DO) por absorvância a 600 nm por 21 horas<sup>1</sup>.

Composto	Concentração	
	(mg/L)	$\mu$ máx ( $h^{-1}$ )
Ácido <i>p</i> -cumárico	0	0,5018 $\pm$ 0,0089
	4	0,5356 $\pm$ 0,0148
	8	0,5363 $\pm$ 0,0097
	12	0,5404 $\pm$ 0,0033
	16	0,5289 $\pm$ 0,0078
	20	0,5314 $\pm$ 0,0062
4-vinilfenol	0	0,5018 $\pm$ 0,0089
	2	0,5358 $\pm$ 0,0138
	4	0,5320 $\pm$ 0,0098
	6	0,4963 $\pm$ 0,0460
	8	0,5354 $\pm$ 0,0202
	10	0,4949 $\pm$ 0,0459
4-etilfenol	0	0,5018 $\pm$ 0,0089
	3	0,5238 $\pm$ 0,0058
	6	0,5288 $\pm$ 0,0173
	9	0,5367 $\pm$ 0,0052
	12	0,5199 $\pm$ 0,0248
	15	0,5380 $\pm$ 0,0069

<sup>1</sup> DO inicial= 0,0575, equivalente a aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/mL

Conforme exibido na Figura 11A e 11B, a linhagem de levedura PE-2 praticamente não consumiu o ácido *p*-cumárico presente tanto em caldo de cana quanto em melaço, exibindo alta tolerância a esse composto. Com base nisso, é possível afirmar serem necessárias doses mais altas que as avaliadas nesse estudo para que os compostos fenólicos se tornem tóxicos para essa linhagem industrial de *S. cerevisiae*.

Por outro lado, SABEL et al. (2017) avaliaram a capacidade de compostos fenólicos em inibir o crescimento de *Saccharomyces* em meios com diferentes níveis de pH e concluíram que em meios menos ácidos (pH 5,5), o efeito negativo dos ácidos hidroxicinâmicos é geralmente menor, provavelmente por estarem em seu estado desprotonado. Como o pH do meio YPD utilizado, segundo dados do fabricante, é em torno de 6,5, isso pode ter contribuído grandemente para o menor efeito prejudicial dos compostos fenólicos testados.

KOSEL et al. (2014) avaliaram o efeito da adição de 100 mg/L de uma mistura dos precursores fenólicos ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico sobre o crescimento da levedura *S. cerevisiae*. Os autores observaram que ao substituir os precursores por 4-vinilfenol houve redução de 1 ciclo log no crescimento da levedura, tendo sido discutido que este último é, portanto, mais tóxico que os precursores. No presente estudo (Tabela 8) ao se comparar as máximas concentrações avaliadas, foi possível observar tendência em reduzir a velocidade específica de crescimento da levedura *S. cerevisiae* em 0,04 ao se utilizar 10 mg/L de 4-vinilfenol ao se comparar com 20 mg/L de ácido *p*-cumárico. A mesma tendência não se mostrou para a concentração de 15 mg/L de 4-etilfenol.

Em todas as concentrações avaliadas de ácido *p*-cumárico e 4-etilfenol houve aumento da velocidade específica de crescimento da levedura. No melaço avaliado neste trabalho em 2017 foram obtidas concentrações máximas de  $14,7 \pm 1,2$  de ácido *p*-cumárico e  $5,1 \pm 0,38$  de 4-etilfenol, enquanto não foi detectado 4-vinilfenol. É possível que a linhagem de *Saccharomyces* PE-2 esteja adaptada às concentrações desses compostos avaliadas no experimento. Esta é uma linhagem mais robusta, obtida por seleção artificial de processos fermentativos que utilizavam muitos ciclos com meios mistos de caldo e melaço que certamente continham esses compostos fenólicos. Uma linhagem de *S. cerevisiae* não industrial talvez apresentasse inibição de crescimento nas condições aplicadas neste experimento.

Outro fator importante a se considerar é que no experimento realizado utilizou-se um meio complexo (YPD) e não um mosto de cana-de-açúcar e não foram simuladas condições que ocorrem na fermentação, como baixo pH e presença de etanol. Conforme exibido nos experimentos com reciclo em caldo, há tendência na redução do pH com o decorrer dos ciclos (Figuras 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A e 6B) assim como também ocorre o aumento da produção de etanol (Figuras 3E, 3F, 4E, 4F, 5E, 5F, 6E e 6F). SABEL et al. (2017) mostraram que os compostos fenólicos são potencialmente mais tóxicos em meios mais ácidos, portanto, futuros experimentos que visem avaliar a interação entre pH, etanol e os compostos fenólicos poderão esclarecer melhor o potencial inibidor destes últimos em condições mais próximas da realidade dos processos fermentativos.

A representação de algumas das curvas de crescimento obtidas para as diversas concentrações dos compostos estão no Apêndice.

## 6 CONCLUSÕES

As linhagens de *D. bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica apresentam elevadas atividades enzimáticas específicas CD e VR quando comparadas às leveduras de vinho de uva. Consequentemente, a produção de 4-EF avaliada nesse estudo é bem mais elevada que a obtida em vinho por outros autores. Os resultados dos testes fermentativos sem reciclo permitem concluir que os maiores valores obtidos para 4-EF ocorrem após 24 h, durante a fase exponencial de crescimento, e se mantêm estáveis até 72 h de fermentação tanto em caldo quanto em melaço. Comparativamente, as concentrações de 4-EF são maiores nas fermentações com reciclo celular, sendo maiores em melaço do que em caldo de cana. A linhagem de *D. bruxellensis* CCA077 se destacou das demais por apresentar altas produções de 4-EF desde o primeiro ciclo fermentativo, exibindo também as mais altas produções deste composto obtidas neste estudo. Nas condições utilizadas, não há 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.

## 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.

AGUILAR- USCANGA, M.; DELIA, M. L.; STREHAIANO, P. *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2003.

BARTHELMEBS, L.; DIVIES, C.; CAVIN, J. F. Knockout of the *p*-Coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3368-3375, 2000.

BASÍLIO, A. C. et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. **Current Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 322-326, 2008.

BASSI, A. P. G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica.** 2011.

87p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BASSI, A. P. G. **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.

BASSI, A. P. G.; MENEGUELLO, L.; PARALUPPI, A. L.; SANCHES, B. C. P.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* – *Lactobacillus fermentum* – *Dekkera bruxellensis* and feedstock on fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2018. doi:10.1007/s10482-018-1056-2.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p.1155-63, 2008.

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

BENITO, S. et al. 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.

BERNARDI, T. L.; SILVA, G. A.; VALENTE, P. Considerações sobre a presença dos gêneros *Brettanomyces* e *Dekkera* em vinhos. **Revista Brasileira de Viticultura e Enologia**, v. 3, n.3, p. 44-50, 2011.

BLOMQVIST, J. et. al. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1487-1497, 2010.

- BLOMQUIST, 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.
- BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para desenvolvimento sustentável. 1 ed. Rio de Janeiro : BNDES. 2008. 316 p.
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2722-2735, 2007.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CABRITA, M. J. et al. Conversion of hydroxycinnamic acids into volatile phenols in a synthetic medium and in red wine by *Dekkera bruxellensis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 106-112, 2012.
- CAMARGO, C. A.; USHIMA, A. H. **Conservação de energia na indústria do açúcar e o álcool**: manual de recomendações. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1990. 796 p.
- CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A. HOGG, T.A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 167-174, 2003.
- CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. São Carlos: EdUFSCAR, 2010. 105 p.
- CIANI, M; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, n. 4, p.489-495, 1997.

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.

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.

COCOLIN, L. et al. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. **FEMS Yest Research**, v. 5, n. 3, p. 237-245, 2004.

CONTERNO, L. et al. 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.

CORONADO, P. et al. Comparison of the behaviour of *Brettanomyces bruxellensis* strain LAMAP L2480 growing in authentic and synthetic Wines. **Antonie van Leeuwenhoek**, doi: 10.1007/s10482-015-0413-7, 2015.

CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar – P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, 2010. 954 p.

DIAS, L. et al. 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. et al. 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.

DUARTE-ALMEIDA, M. J. et al. 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. et al. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, n. 2-3, p. 311-316, 1995.

EDLIN, D. et al. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 4, p.232-239, 1998.

FILIPI-RIBEIRO, L. et. al. Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in red wine by activated carbons with different physicochemical characteristics: Impact on wine quality. **Food Chemistry**, v. 229, p. 242-251, 2017.

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. 393 p.

GALAFASSI, S. et al. 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.

GERÓS, H.; AZEVEDO, M-M.; CÁSSIO, F. Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n.1, p. 59-62, 2000.

GODOY, L. et al. Purification and characterization of a p-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 127, p. 6-11, 2008.

- GODOY, L. et al. 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.
- GODOY, L. et al. Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage. **Food Control**, v. 45, p. 45-86, 2014.
- GOMES, J. L. **Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por *Brettanomyces/Dekkera***. 2012. 54p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola Superior de Biotecnologia , Universidade Católica Portuguesa, Porto, 2012.
- GRANATO, T. M. New insights on the features of the vinyl phenol reductase from the wine-spoilage yeast *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 321-329, 2015.
- HEIPIEPER, H. J. et al. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 10, p.409–415, 1994.
- KATO, N. et al. Purification and characterization of aromatic acid reductase from *Nocardia asteroides* JCM 3016. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 3, p.757-762, 1991.
- KEWELOH, H.; WWYRAUCH, G.; REHM, H. J. Phenol induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 66–71, 1990.
- 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.

KOSEL, J. et al. Factor affecting volatile phenol production during fermentations with pure and mixed cultures of *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 35-45, 2014.

KOSEL, J. et al. The influence of *Dekkera bruxellensis* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the aromatic profile of synthetic wine must. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 4, p. 1-28, 2017.

LARSSON, S. et al. The influence of lignocellulose derived aromatic compounds on oxygen limited growth and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n.1, p. 617-632, 2000.

LEE, S.S. et al. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p.641-649, 1981.

LICKER, J. L.; ACREE, T. E.; HENICK-KLING, T. What is “Brett” (*Brettanomyces*) flavour? A preliminary investigation. In: WATERHOUSE, A.L.; EBELER, S.E. **Chemistry of wine flavour**. Washington: ACS Symposium Series, 1998, p. 96-115.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

MELO, M. E. G. **Um método espectrofotométrico para quantificação de furfural em cachaças por extração líquido-líquido**. 2014. 78 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 2014.

- MENEGHIN, M. C. **Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica**. 2008. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- MENEGHIN, M. C. et al. 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, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MILHEIRO, J. et al. 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol and 4-ethylcatecol in red wines: microbial formation, prevention, remediation and overview of analytical approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2017. doi:10.1080/10408398.2017.1408563.
- MIRA, N. P.; TEIXEIRA, M. C.; SÁ-CORREIA, I. Adaptive response and tolerance to weak acids in *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide view. **OMICS**, v. 14, n. 5, p. 525-540, 2010.
- MONTEIRO, B. M. S. **Produção de etanol combustível: Efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação do mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. 2016. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.
- MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação alcoólica. In: Workshop sobre produção de etanol: Qualidade de matéria prima, 2008, Lorena-SP. **Anais**.
- 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.

NELSON, L. **The production of volatile phenols by wine microorganisms**. 2008. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Agricultura) – Universidade de Stellenbosch, Stellenbosch, 2008.

OELOFSE, A. et al. Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. **South African Journal of Enology and Viniculture**, v. 29, p. 128-144, 2008.

PALMQVIST, E. et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, p. 46–55, 1999.

PASTORKOVA, E. et al. Growth inhibitory effect of grape phenolics against wine spoilage yeast and acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 209-213, 2013.

PEREIRA, L. F. et al. 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.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p.183–186, 2006.

PITA, W.B. et al. 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 hydrolyses of sucrose. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 5, p. 369-71, 1992.

- RAVANELI, G. C. **Efeito da cigarrinha-das-raízes com tratamento químico sobre a qualidade da matéria-prima e fabricação de álcool**. 2005. 78p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2005.
- RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 149-164, 2007.
- 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.
- ROMANO, D. et al. Cloning the putative gene of vinyl phenol reductase of *Dekkera bruxellensis* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 63, p. 92-100, 2017.
- SABEL, A. et al. Wine phenolic compounds: antimicrobial properties against yeasts, lactic acid and acetic acid bacteria. **Beverages**, v. 2, n. 29, p. 1-14, 2017.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 626 p.
- 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.
- SCHIFFERDECKER, A. J. et al. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. **Yeast**, v. 31, n. 9, p. 323-332, 2014.

SOUZA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F. **Enciclopédia agrícola brasileira**. 1. Ed. São Paulo: Edusp, 1995. 508 p.

SOUZA-LIBERAL, A. T. et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 1, p.19–23, 2005.

SOUZA-LIBERAL, A. T. et al. 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.

STUPIELLO, J. P. Efeitos dos não-açúcares. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v. 20, n. 2, p. 10, 2002.

SUÁREZ, R. et al. 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 Agriculturae**, v. 107, n. 2, p. 453-472, 2016.

UDOP. **Setor sucroenergético brasileiro gerou 613 mil empregos em 2016**, 2017. Disponível em: <http://tvudop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1150943>. Acesso em: 16/06/2018.

UNICA. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2017/2017**, 2018. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1984&safra=2017%2F2018&estado=SP>>. Acesso em: 16/06/2018.

VALDETARA, F. et. al. A response surface methodology approach to investigate the effect of sulfur dioxide, pH, and ethanol on DbCD and DbVPR gene expression

and on the volatile phenol production in *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* CBS2499. **Frontiers on Microbiology**, v. 8, n. 1727, p. 1-12, 2017.

WOOLFIT, M. et al. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 4, p. 721-733, 2007.

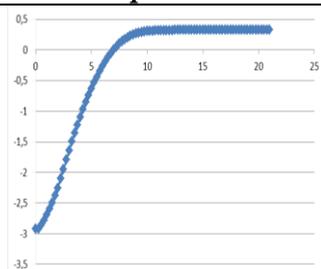
YOKOYA, F. **Fabricação de aguardente de cana**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello. 1995. 92p. (Série Fermentações Industriais, nº 2), Campinas, 1995.

## APÊNDICE

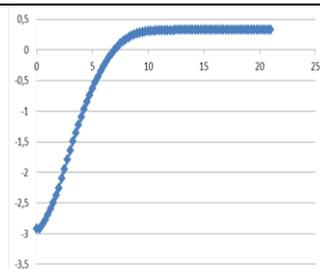
Os gráficos a seguir referem-se às curvas de crescimento da levedura *S. cerevisiae* obtidas a partir das leituras de absorvância a 600 nm transformadas em  $\ln$  (eixo Y) ao longo de 21 horas de cultivo (leituras em período de 15 minutos, eixo X) em microplacas. Os experimentos foram realizados no equipamento leitora de microplacas Tecan Infinite® M200.

Somente foi representada uma repetição dentre as cinco realizadas para cada concentração de ácido *p*-cumárico, 4-vinilfenol e 4-etilfenol.

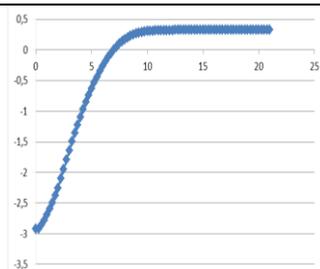
Os resultados entre parênteses ao lado da concentração referem-se às equações de regressão linear obtidas considerando-se os resultados da fase exponencial de crescimento, e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ). O coeficiente angular é a velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ).

**Ácido *p*-cumárico**

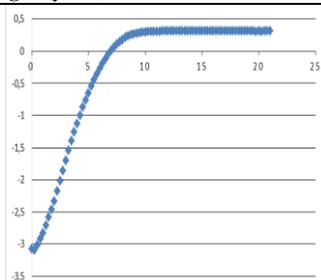
**0 mg/L** ( $y = 0,5113x - 3,2118$ ,  $R^2=0,9943$ )

**4-vinilfenol**

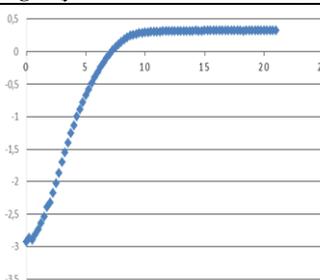
**0 mg/L** ( $y = 0,5113x - 3,2118$ ,  $R^2=0,9943$ )

**4-etilfenol**

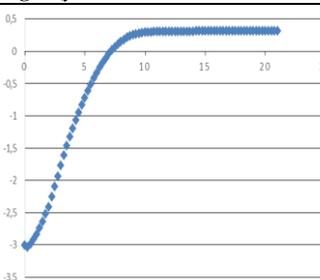
**0 mg/L** ( $y = 0,5113x - 3,2118$ ,  $R^2=0,9943$ )



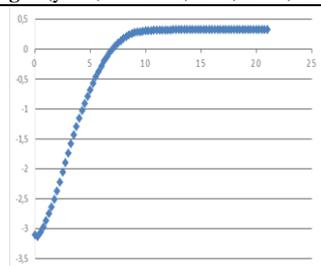
**4 mg/L** ( $y = 0,5357x - 3,3471$ ,  $R^2=0,9945$ )



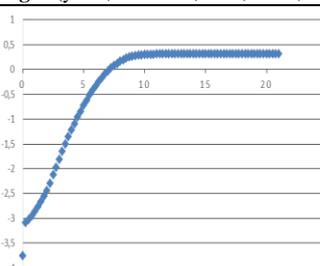
**2 mg/L** ( $y = 0,5141x - 3,2716$ ,  $R^2=0,9941$ )



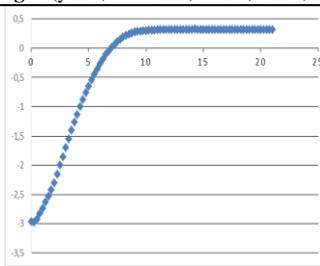
**3 mg/L** ( $y = 0,5318x - 3,34001$ ,  $R^2=0,9949$ )



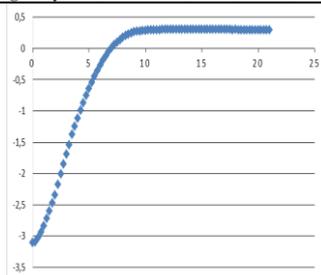
**8 mg/L** ( $y = 0,5418x - 3,4036$ ,  $R^2=0,995$ )



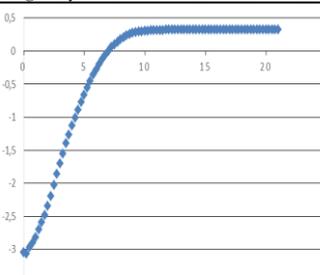
**4 mg/L** ( $y = 0,5209x - 3,3876$ ,  $R^2=0,997$ )



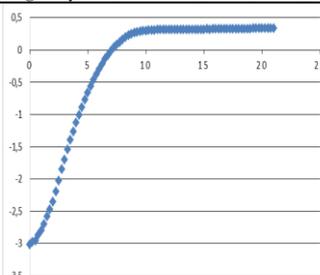
**6 mg/L** ( $y = 0,5219x - 3,3286$ ,  $R^2=0,996$ )



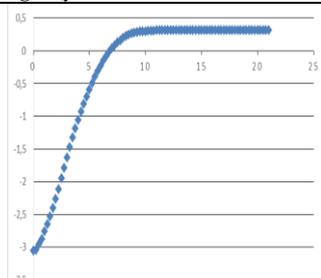
**12 mg/L** ( $y = 0,539x - 3,3579$ ,  $R^2=0,9936$ )



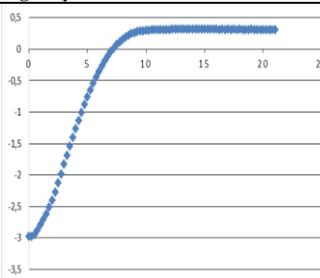
**6 mg/L** ( $y = 0,5347x - 3,3509$ ,  $R^2=0,9945$ )



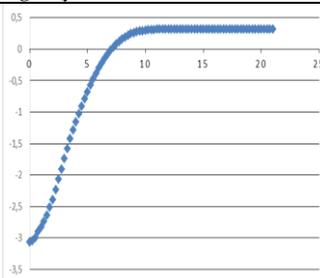
**9 mg/L** ( $y = 0,5305x - 3,3372$ ,  $R^2=0,9937$ )



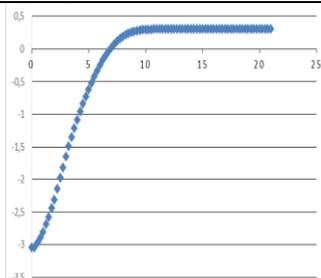
**16 mg/L** ( $y = 0,5329x - 3,2762$ ,  $R^2=0,9934$ )



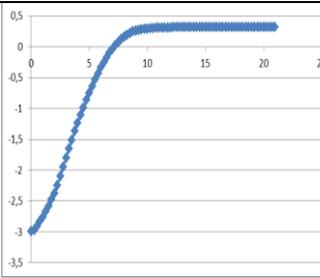
**8 mg/L** ( $y = 0,5176x - 3,3817$ ,  $R^2=0,9973$ )



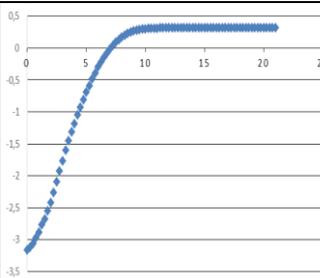
**12 mg/L** ( $y = 0,5381x - 3,3923$ ,  $R^2=0,9942$ )



**20 mg/L** ( $y = 0,5368x - 3,3213$ ,  $R^2=0,9931$ )



**10 mg/L** ( $y = 0,5072x - 3,3122$ ,  $R^2=0,9967$ )



**15 mg/L** ( $y = 0,5458x - 3,4439$ ,  $R^2=0,9946$ )