



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAMON PERES BREXÓ

**CARACTERIZAÇÃO, INTERAÇÃO COM BACTÉRIA LÁTICA,
E O IMPACTO DO RECICLO DE CÉLULAS E LAVAGEM
ÁCIDA DURANTE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA SOBRE
LEVEDURAS ORIGINÁRIAS DE PROCESSO ARTESANAL
DE CACHAÇA E DO RESÍDUO DE MALTE CERVEJEIRO**

CHARACTERIZATION, INTERACTION WITH LACTIC ACID BACTERIA, AND THE
IMPACT OF CELL RECYCLE AND ACID WASHING DURING ETHANOLIC
FERMENTATION ON YEASTS ISOLATED FROM CACHAÇA ARTISANAL PROCESS
AND BREWER'S SPENT GRAIN

CAMPINAS

2017

RAMON PERES BREXÓ

CARACTERIZAÇÃO, INTERAÇÃO COM BACTÉRIA LÁTICA, E O IMPACTO DO
RECICLO DE CÉLULAS E LAVAGEM ÁCIDA DURANTE FERMENTAÇÃO
ETANÓLICA SOBRE LEVEDURAS ORIGINÁRIAS DE PROCESSO ARTESANAL DE
CACHAÇA E DO RESÍDUO DE MALTE CERVEJEIRO

Characterization, interaction with lactic acid bacteria, and the impact of cell recycle and acid
washing during ethanolic fermentation on yeasts isolated from cachaça artisanal process
and brewer's spent grain

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP)
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título
de DOUTOR em CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**These presented to the School of Food Engineering of the
University of Campinas (FEA/UNICAMP) in partial fulfilment
of the requirements for the degree of Doctor in Food Science**

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (DCA/FEA/UNICAMP)

Co-orientadora: Dra. Gislaine Chrystina Nogueira de Faria (DEA/FEA/UNICAMP)

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO RAMON PERES BREXÓ E ORIENTADA
PELO PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA**

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, PROEX/CAPES #3300301702P1

ORCID: <http://orcid.org/http://orcid.org/ht>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

B758c Brexó, Ramon Peres, 1991-
Caracterização, interação com bactéria láctica, e o impacto do reciclo de células e lavagem ácida durante fermentação etanólica sobre leveduras originárias de processo artesanal de cachaça e o resíduo de malte cervejeiro / Ramon Peres Brexó. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.
Coorientador: Gislaine Chrystina Nogueira de Faria.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Leveduras. 2. *Lactobacillus fermentum*. 3. Fermentação. 4. Cachaça. 5. Citometria de fluxo. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Faria, Gislaine Chrystina Nogueira de. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization, interaction with lactic acid bacteria, and the impact of cell recycle and acid washing during ethanolic fermentation on yeast isolated from cachaça artisanal process and brewer's spent grain

Palavras-chave em inglês:

Yeasts

Lactobacillus fermentum

Fermentation

Cachaça

Flow cytometry

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Denise Rosana Perdomo Azeredo

Jaciane Lutz Ienczak

Lara Durães Sette

Rosana Goldbeck

Data de defesa: 30-06-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (FEA/UNICAMP) - Orientador

Prof^a. Dra. Denise Rosane Perdomo Azeredo (IFRJ) - Membro Titular

Prof^a. Dra. Jaciane Lutz Ienczak (CTBE) - Membro Titular

Prof^a. Dra. Lara Durães Sette (UNESP) - Membro Titular

Prof^a. Dra. Rosana Goldbeck (FEA/UNICAMP) - Membro Titular

A ATA da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora
consta no processo de vida acadêmica do aluno

Dedico e agradeço à minha família, amigos, e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta importante etapa da minha vida.

Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

O bioetanol é o biocombustível mais usado no mundo. A preocupação ecológica e a versatilidade de produção com matérias-primas diversas impulsionaram a sua implementação como alternativa sustentável aos combustíveis fósseis. Este combustível é sintetizado principalmente via metabolismo de leveduras a partir de açúcares assimiláveis. Além de parâmetros extrínsecos relacionado ao processamento, as singularidades fisiológicas apresentadas a nível de espécie e até mesmo entre cepas de leveduras podem contribuir significativamente para o melhor desempenho da fermentação. De acordo com este trabalho, a fermentação espontânea de cachaça e o resíduo de grãos da produção de cerveja são bons nichos para a prospecção biotecnológica de novas leveduras, com destaque para a maior abundância e diversidade observada nas amostras provenientes da cachaçaria. Destes dois ambientes foram isoladas 134 leveduras, pertencentes a 6 gêneros e 10 espécies. Estas leveduras foram caracterizadas quanto à capacidade de produção de ascósporos, resistência aos antifúngicos natamicina e actidiona, crescimento em diferentes temperaturas, e produção das enzimas amilolíticas, pectinolíticas, celulolíticas e xilanolíticas. Estas cepas também foram triadas com base na capacidade fermentativa em xarope de cana-de-açúcar e pela morfologia celular. Para os 10 melhores representantes foi analisado o rendimento em etanol, rendimento em biomassa, a produtividade e o perfil cariotípico. As cepas *T. delbrueckii* LMQA BSG 7 e *S. cerevisiae* LMQA SNR 65 se destacaram apresentando resultados fermentativos similares e superiores às cepas industriais PE-2 e CAT-1 usadas como parâmetro referencial. Ainda dentre as cepas selecionadas, a *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 foi escolhida devido a maior viabilidade quando propagada na presença da bactéria contaminante *Lactobacillus fermentum* CCT1668. A partir deste indício, esta cepa em comparação com a PE-2 foi fermentada durante 8 vezes consecutivas, sob o regime de reciclo de células com lavagem ácida, e na presença do contaminante. A performance fermentativa e a fisiologia celular foram analisadas. A levedura LMQA SRC 143 apresentou relevante atuação diante do estresse fermentativo quando na presença do contaminante *L. fermentum* CCT1668, contrariando o ideário de que a contaminação bacteriana sempre causa a redução da capacidade fermentativa. Em suma, este trabalho ressalta a importância do estudo com leveduras provenientes de ambientes distintos à usina sucroalcooleira, destaca a capacidade fisiológica de espécies pouco exploradas, e apresenta contribuições relacionadas com as a respeito das contaminações nas fermentações e os possíveis níveis de interações existentes entre os contaminantes e as leveduras.

Palavras-chave: biocombustível, caracterização, citometria, reciclo, nativas, contaminação, bactéria

ABSTRACT

Bioethanol is the most used biofuel in the world. Ecological concern and versatility of production with diverse raw materials have boosted its implementation as sustainable alternatives to fossil fuels. This fuel is mainly synthesized through the metabolism of yeasts from assimilable sugars. In addition to processing-related extrinsic parameters, the physiological singularities presented at the species level and even among yeast strains can contribute significantly to the better performance of the fermentation. According to this work, a spontaneous fermentation of cachaça and brewer's spent grain are good niches for a biotechnological prospection of new yeasts, with a highlight being a greater abundance and diversity observed in the cachaça samples. Of these two environments, 134 yeasts belonging to 6 genera and 10 species were isolated. These yeasts were characterized as ascospore production capacity, resistance to antifungal natamycin and actidione, growth at different temperatures, and production of amylolytic, pectinolytic, cellulolytic and xylanolytic enzymes. These strains were also screened through fermentative capacity in sugarcane syrup and cell morphology. For the 10 best representatives, the ethanol yield, biomass yield, productivity and karyotypic profile were analysed. The strains *T. delbrueckii* LMQA BSG 7 and *S. cerevisiae* LMQA SNR 65 stood out presenting fermentative results similar or better than the industrial strains PE-2 and CAT-1 used as a parameter. However, as selected strains, a *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 was chosen because of its greater viability when propagated in the presence of contaminating bacteria *Lactobacillus fermentum*. From this indicium, LMQA SRC 143 compared to PE-2 was fermented for 8 consecutive times, under the cell recycling regimen with acid washing, and in the presence of the contaminant. Fermentation performance and cellular physiology were analyzed. The yeast LMQA SRC 143 presented a relevant performance in the presence of the fermentative stress when in the presence of the contaminant *L. fermentum*, contrary to the concept that bacterial contamination always causes the reduction of fermentative capacity. In summary, this work emphasizes the importance of the study of yeasts from environments different of sugar and ethanol plant, highlights the physiological capacity of poorly exploited species, and presents contributions related to contamination in fermentations and possible levels of interactions between contaminants and yeasts.

Keywords: biofuel, characterization, cytometry, recycle, wild, contamination, bacteria

SUMÁRIO

Introdução geral.....	11
Referências	14
Impacto da contaminação microbiana durante a fermentação para a produção de bioetanol ..	16
Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production.....	17
Introduction	17
An overview of bioethanol processing	18
Raw Materials.....	18
Bioethanol processing technologies from sugarcane must.....	18
Yeast in sugarcane must for bioethanol production	20
Microbial contamination during sugarcane must fermentation for bioethanol production ..	21
Wild Yeast.....	21
Bacteria.....	22
Negative aspects of microbial contamination during sugarcane must fermentation for bioethanol production.....	23
Interaction between yeast and lactic acid bacteria during sugarcane must fermentation for bioethanol production.....	24
Concluding remarks.....	25
References	25
O <i>quorum sensing</i> desempenha algum papel nas interações microbianas durante a fermentação do bioetanol de cana-de-açúcar?.....	29
Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role?	30
Introduction	30
Microbiota in bioethanol fermentation	31
Is there QS in fermentation vats?	32
Quorum sensing	32
QS in yeast.....	33
QS in Gram positive bacteria	34
Concluding remarks and further research.....	38
References	39
Leveduras em fermento caipira da produção de cachaça artesanal e de bagaço de malte da cervejaria: biodiversidade e caracterização fenotípica para fins biotecnológicos.....	44
Resumo	46

1. Introdução.....	47
2. Material e métodos	49
2.1. Amostragem	49
2.2. Isolamento e preservação das leveduras.....	49
2.3. Caracterização fenotípica das leveduras	52
2.4. Análises estatísticas.....	56
3. Resultados.....	57
3.1. Composição das espécies de leveduras isoladas das amostras de fermento da produção de cachaça artesanal e do bagaço de malte cervejeiro	57
3.2. Atividade <i>Killer</i>	58
3.3. Formação de Ascósporos	59
3.4. Capacidade de multiplicação na presença de antifúngicos e em diferentes temperaturas.....	59
3.5. Triagem qualitativa e quantitativa da capacidade de produção das exoenzimas ...	62
3.6. Representatividade fenotípica nas diferentes amostras	63
4. Discussão	64
5. Conclusões.....	72
Destilaria de cachaça artesanal e resíduo da indústria cervejeira: fontes de isolamento de leveduras com potencial para a produção de bioetanol	81
Resumo	83
1. Introdução.....	84
2. Material e métodos	86
2.1. Triagem fermentativa com xarope de cana-de-açúcar	86
2.2. Determinação dos parâmetros fermentativos em meio sintético.....	89
2.3. Comparação molecular por cariotipagem	91
2.4. Análise estatística.....	91
3. Resultados e discussão	92
3.1. Morfologia celular.....	92
2.2. Fermentação de triagem em xarope de cana-de-açúcar	93
2.3. Parâmetros fermentativos das cepas selecionadas	97
2.4. Comparação cariotípica das cepas selecionadas	104
3. Conclusões.....	107
Referências	108
Avaliação do estresse causado pela contaminação bacteriana e reciclo celular sobre a produção de bioetanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> LMQA SRC 143 E PE-2	114
Resumo	116
1. Introdução.....	117

2. Material e métodos	119
2.1. Micro-organismos	119
2.2. Preparo das fermentações.....	120
2.3. Análise do mosto fermentado.....	122
2.4. Lavagem ácida.....	123
2.5. Citometria de fluxo.....	124
2.6. Análise estatística.....	127
3. Resultados.....	128
3.1. Dados gerais das fermentações	128
3.2. Influência da composição do inóculo nos parâmetros fermentativos	129
3.3. Efeito do reciclo de células com a lavagem ácida nos parâmetros fermentativos	132
3.4. Fisiologia celular	136
4. Discussão	142
5. Conclusões.....	148
Referências	149
Discussão geral	153
Conclusões gerais	155
Referências bibliográficas	156
Apêndice - capítulo 3.....	193
1- Descrição do processo de fabricação da cachaça artesanal e coleta das amostras	193
2- Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e curva padrão	194
3- Tabelas com todas as cepas isoladas e as respectivas características fenotípicas	195
4- Diferenciação: ascósporos e células vegetativas (Microfotografias)	200
Apêndice - capítulo 4.....	201
1- Metodologia da contagem em Neubauer e ajuste do inóculo.....	201
2- Curva de calibração para as análises da concentração de etanol por cromatografia gasosa	202
3- Tabelas com a relação das cepas floculantes e as características fermentativas individuais	204
Apêndice - capítulo 5.....	209
1- Preparo das soluções e dos corantes fluorescentes.....	209
2- Gráficos do estado fisiológico das células nos três diferentes tempos analisados	211
Anexos.....	212
Permissão de uso dos artigos aceitos pelas revistas Renewable and Sustainable Energy e Critical Reviews in Biotechnology.....	212

INTRODUÇÃO GERAL

As leveduras estão associadas às atividades humanas mesmo antes da compreensão de sua existência. Cosmopolitas e com grande capacidade de suportar variações ambientais, estes micro-organismos contribuíram significativamente para o desenvolvimento das comunidades que abandonaram a vida nômade (AMORIM; LEÃO, 2005). O avanço nas atividades agrícolas também estimulou a capacidade de transformação de vegetais, principalmente grãos e frutas, para a obtenção de alimentos e bebidas com sabores distintos, nutricionalmente diversos e mais estáveis à deterioração. A melhoria na qualidade e oferta de alimento contribuiu direta e indiretamente para o desenvolvimento cognitivo humano, que através da observação e experimentação que foi capaz de atribuir e melhorar a utilização de micro-organismos em benefício próprio (AMORIM; LEÃO, 2005; BOYNTON; GREIG, 2014).

A transição gradativa do conhecimento intuitivo para o embasamento científico e metodológico permitiu o acesso e o conhecimento sobre estes agentes transformadores (AMORIM e LEÃO, 2005). A possibilidade de manipulação deste recurso genético possibilitou a aplicação mais eficiente e rentável. Na atualidade, o conhecimento sobre as leveduras tem sido aplicado com excelentes resultados para a produção otimizada de etanol combustível, desenvolvimento de novos produtos pelas industriais cervejeira, vinícola, de destilados, panificação, cosmética e farmacêutica (LOPES et al., 2016; MICHEL et al., 2016; PADILLA; GIL; MANZANARES, 2016). O sucesso mercadológico atrelado ao uso de leveduras está associado à bioprospecção de cepas mais robustas, metabolicamente diferenciadas e adequadas ao processamento em escala industrial. A bioprospecção consiste na busca de potencial econômico que permita o desenvolvimento de um produto de valor comercial. O isolamento, triagem, e seleção de leveduras em ambientes pouco explorados pode favorecer o acesso ao patrimônio genético mais diversos e favorável a aplicações inovadoras (BASSO et al., 2008; SUÁREZ-LEPE; MORATA, 2012)

O isolamento e aperfeiçoamento de leveduras que sejam ideais aos processos estão ganhando cada vez mais espaço no setor de fermentação industrial consistindo em uma estratégia importante para garantir uma fermentação completa, redução dos insumos, melhores rendimentos, e adaptação aos processos mais estressantes e rentáveis (BASSO et al., 2008; LOPES et al., 2015). Para as usinas de bioetanol, a alta capacidade de hidrolisar a sacarose, a permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática, alta resistência às condições

de estresse, como por exemplo a presença de etanol, pH, osmolaridade e temperatura), o rápido crescimento em presença de O₂ e substrato, e alta produção de etanol são as características tecnológicas das leveduras relevantes ao processo (BASSO et al., 2008; BORGES et al., 2015; LOPES et al., 2016).

O processo fermentativo utilizado no Brasil reutiliza as células de leveduras nas fermentações durante a safra. A magnitude e a complexidade do processo inviabilizam a esterilização do sistema e da matéria-prima, permitindo que a contaminação bacteriana seja inata e recorrente em todas as etapas do processamento (SKINNER; LEATHERS, 2004; BECKNER; IVEY; PHISTER, 2011; BORGES et al., 2015; LOPES et al., 2016). Para a contenção do desenvolvimento bacteriano, as células de leveduras reutilizadas passam pela lavagem ácida antes de retornar à dorna para a fermentação subsequente (AMORIM e LEÃO, 2005; BASSO et al., 2008; BORGES et al., 2015). Desta forma, as leveduras selecionadas devem apresentar, além das características metabólicas que favoreçam a produção de etanol, robustez e estabilidade fisiológica perante o processamento e contaminação bacteriana, pois é requerido o equilíbrio da resposta fermentativa durante todos os ciclos (PEREIRA et al., 2012; LOPES et al., 2015).

Este projeto de doutorado teve o objetivo de ressaltar as características fisiológicas das cepas de leveduras isoladas durante a produção de cachaça artesanal por fermentação espontânea no alambique localizado na cidade de Monte Alegre do Sul – SP (Cachaçaria Campanari) e do resíduo de malte processado popularmente denominado “dreche” de uma cervejaria também localizada no estado de São Paulo (nome não especificado a pedido da empresa). A princípio as cepas foram isoladas, identificadas e caracterizadas perante diversos fatores que favoreçam a bioprospecção destas leveduras para a finalidade biotecnológica. Visando aplicação na produção de etanol combustível, estas cepas também foram triadas, comparadas e selecionadas quanto a capacidade fermentativa. E para o fechamento desta tese, foi selecionada uma levedura para a avaliação do potencial fermentativo frente ao reciclo de células com a lavagem ácida e à contaminação bacteriana. Além das atividades experimentais, as exposições teóricas das revisões bibliográficas são propostas para elucidar o desenvolvimento científico e os avanços do setor sucroalcooleiro, e instigar a discussão sobre contaminação bacteriana e os mecanismos de interação entre a microbiota durante o processamento.

Especificamente, este projeto teve como objetivo:

- Conhecer a diversidade de leveduras presentes na fermentação espontânea de cachaça artesanal e no malte residual da indústria de cerveja utilizando métodos dependentes de cultivo e identificação das cepas;
- Conhecer o valor biotecnológico das cepas isoladas através da avaliação da capacidade de formar ascósporos, ação Killer, resistência aos antifúngicos Natamicina e Actidiona, influência da temperatura no crescimento, e produção das enzimas amilase, pectinase, xilanase e celulase;
- Triar e selecionar as cepas de acordo com a capacidade fermentativa (produção de etanol, consumo de substrato e pH) visando aplicação na produção de bioetanol;
- Comparar o rendimento em etanol, rendimento em biomassa e a produtividade, além do perfil cariotípico das cepas selecionadas;
- Avaliar a performance fermentativa (produção de etanol, consumo de substrato e pH) e o perfil fisiológico (viabilidade, vitalidade, glicogênio e trealose) de uma cepa selecionada perante o reciclo de células com a lavagem ácida e em co-fermentação com o contaminante *Lactobacillus fermentum*.

Este projeto foi estruturado em 5 capítulos redigidos sob a formatação de artigo científico, satisfazendo o embasamento teórico e os objetivos propostos. O **capítulo 1** corresponde ao artigo de revisão submetido e publicado pela revista *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Este capítulo retrata o estado da arte da produção de etanol combustível de cana-de-açúcar, processos emergentes, e elenca a problemática e as consequências envolvida com a contaminação microbiana para o setor produtivo. O **capítulo 2** é uma revisão bibliográfica argumentativa sobre as interações microbianas durante a fermentação etanólica. Este artigo foi submetido e aceito pela revista *Critical Reviews in Biotechnology*. Neste capítulo as interações microbianas são discutidas a nível “sense” sobre a prerrogativa de que existe uma grande lacuna sobre o conhecimento das estratégias moleculares utilizadas pelos micro-organismos em fermentações. O **capítulo 3** está formatado de acordo com os critérios da revista *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* e retrata o isolamento, a identificação e as características fenotípicas de relevância biotecnológica das cepas provenientes do processo fermentativo da cachaça artesanal e do resíduo cervejeiro. O **capítulo 4** foi estruturado para ser submetido para a revista *New Biotechnology*, e aborda a triagem e seleção das leveduras de acordo com a capacidade fermentativa, e a comparação das cepas selecionadas quanto ao rendimento em etanol,

rendimento em biomassa, produtividade e perfil cariotípico. E o **capítulo 5** foi estruturado com base nas normas da revista *Applied and Environmental Microbiology* e retrata a atuação de uma levedura selecionada em comparação com a cepa padrão PE-2 diante das fermentações com reciclo de células e lavagem ácida, e sob a influência da contaminação por *Lactobacillus fermentum*. Neste capítulo também foi utilizado a citometria de fluxo para investigação do estado fisiológico das células das leveduras durante os experimentos fermentativos.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. 1st. ed. Piracicaba: Fermentec, 2005.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.
- BORGES, E. P.; LOPES, M. L.; BERNARDINO, C.; GODOY, A.; RÉ, F. E.; CHERUBIN, R. A.; PAULILLO, S. C. L.; AMORIM, H. V. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar industry (Zuckerindustrie)*, v. 4, n. 140, p. 209–216, 2015.
- BOYNTON, P. J.; GREIG, D. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, v. 31, p. 449–462, 2014.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; CHERUBIN, R. A.; GODOY, A.; NETO, H. B. de A.; AMORIM, H. V. de. Tailored yeast strains selected for ethanol production: the process driven selection (e-book). 1st. ed. Piracicaba: Fermentec Tecnologias em Açúcar e Alcool Ltda, 2015.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 64–76, 2016.
- MICHEL, M.; MEIER-DÖRNBERG, T.; JACOB, F.; METHNER, F.-J.; WAGNER, R. S.; HUTZLER, M. Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 4, p. 569–587, out. 2016.
- PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 1, p. 45–53, 6 jan. 2012.

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking *Trends in Food Science and Technology*, v. 23, n. 1, p. 39–50, 2012.

CAPÍTULO 1

REVISÃO

IMPACTO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA DURANTE A FERMENTAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

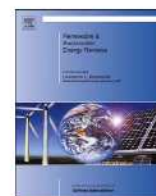
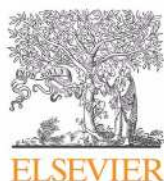
REVIEW

IMPACT AND SIGNIFICANCE OF MICROBIAL CONTAMINATION DURING FERMENTATION FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Artigo publicado na revista:

Renewable and Sustainable Energy Reviews

Brexó, R. P., Sant'Ana A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production (2017). *Renew Sustain Energy Rev* 73:423–34. DOI:10.1016/j.rser.2017.01.151.



Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production

Ramon Peres Brexó, Anderson S. Sant'Ana*

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Ethanol
Bioenergy
Fuel
Feedstock
Wild yeasts
Saccharomyces
Lactic acid bacteria
Bioprocesses, microbial contamination
Sugarcane

ABSTRACT

The bioethanol visibility in the global matrix of fuels, linked to ecological appeal and the possibility of using new raw materials justifies the increasing investments for the development of new processes. This fuel results from fermentation of sugars by yeasts, however the growth of exogenous microorganisms is sometimes unavoidable. The lactic acid bacteria and wild yeasts are the main contaminants, affecting yeasts' performance and leading to negative impacts such as the formation of organic acids, polysaccharides and gummy biofilms. Further undesirable effects of the microbial contamination during bioethanol processing comprise flocculation, reduction of yeast cells viability and decrease in process yield. In extreme cases, the reduction in process yield can reach 20–30%, making the process impracticable. In this article, the impact and significance of microbial contaminants (lactic acid bacteria and wild yeasts) during fermentation of must for bioethanol production are reviewed.

1. Introduction

Ethanol, ethyl alcohol or bioethanol is chemically composed by molecules of carbon, hydrogen and oxygen, with a hydroxyl group attached to an alkyl radical as its main chemical characteristic [1,2]. It is a colorless liquid, clear, with characteristic and pleasing aroma, strongly penetrating with caustic and burning taste. This compound is highly flammable and a viable fuel with lower vapor pressure than gasoline, resulting in reduced evaporative emissions. Ethanol high octane rating serves as an important regulator of detonation potential when used as gasoline additive, thus replacing toxic additives such as tetraethyl and tetra methyl lead [3].

The ecological appeal of biofuels in reducing pollutant gas emissions, the possibility of using regional raw materials in the process, and the carbon recovery through photosynthesis stand out as advantages of bioethanol in the matrix of fuels in the world [4]. The increase in demand of this fuel over the past few years can also be attributed to the introduction of hybrid engines in the market (flex fuel, which uses blends from 0% to 100% of ethanol and gasoline) [5,6]. Currently, the projection on increasing global demand for bioethanol is mainly supported by government policies for blending ethanol in gasoline used in passenger light vehicles, and through incentives for controlling prices in order to keep bioethanol competitive with fossil fuels [7–14].

Bioethanol process consists in the biochemical transformation of fermentable sugars by yeasts [15–17]. This process requires controlled

conditions to prevent contaminant levels above a certain level. Nonetheless, bioethanol processing plants may be not capable to promote sterilization of raw materials and coadjutants, making the process susceptible to bacterial and wild yeast contamination [18,19]. It is known that microbial contamination has been a limiting factor for better performance of the process, despite all the techno-scientific structure developed by the bioethanol industry [16,17]. The aggravating contamination factor in fermentation of must for bioethanol production is the shift in the metabolism of sugars [19]. Bacterial contamination in concentration above 10^7 colony forming units (CFU) per mL may result in reduction from 1% to 5% of the process yield [20–22]. For instance, in Brazilian distilleries loss of approximately 20,000 l/day of bioethanol are predicted when contamination reaches 10^7 – 10^8 CFU per mL [23]. These losses are caused by the stress and consequent decrease in yeast cells viability [23–25]. Stressed yeast cells with reduced viability, will be weak competitors for substrate and micro-nutrients [24]. In addition, the losses are related to the synthesis of bacterial co-products such as organic acids [19,23,26], proteinaceous compounds and cyclic peptides [24], hydroxylated fatty acids [24]. Another important reason for the decrease in bioethanol production yield is the competition between yeasts and microbial contaminants for space in the fermentation environment [19]. In extreme cases, the reduction in yield of bioethanol production can reach 30% resulting in huge economic losses [27–29]. Microbiological contamination also poses operational difficulties due to the production of gums [30,31],

* Corresponding author.

E-mail address: and@unicamp.br (A.S. Sant'Ana).

and necessity to use acids, antibiotics and antifoam agents [32,33]. This in turn culminates with the increase in production costs and changes in quality of the final product [24]. Thus, given its importance, in this article the impact and significance of microbial contaminants during fermentation of must for bioethanol production are reviewed.

2. An overview of bioethanol processing

2.1. Raw materials

Chemically, the energy formed in oxidation reactions of fermentable carbohydrates can be used for both yeast growth (and increase of biomass) and partial anaerobic oxidation, resulting in the production of ethanol and CO₂ [34]. Biochemically, fermentation is an anaerobic catabolic process that does not involve the respiratory chain or cytochromes [15,16]. During fermentation, sugar molecules are broken within the cell by enzymatic action and converted in energy with production of ethanol and carbon dioxide [35]. Bioethanol (i.e., ethanol derived from fermentation of plant materials) is produced by the abundant availability of fermentable sugars present in must obtained from specific raw materials [15,36]. Although any fermentable organic matter can be used to produce bioethanol, several factors may restrict the application of some raw materials in the process, such as the suitability of the crop for the local farming practices, environmental and food security aspects [8]. In addition, restrictions for the application of some raw materials for bioethanol production may be related to the need to carry out pretreatment of lignocellulosic feedstock before fermentation [8,16]. The main concerns with the need to apply these treatments rely on their high cost considering that is necessary to develop technologies that avoid the synthesis of cytotoxic compounds for fermenting yeasts, such as furfural, hydroxymethylfurfural, phenols, formic acid, acetic acid, levulinic acid [37–40].

The amount of fermentable sugars in the must for bioethanol production is intrinsically related to the process productivity, as the fermentable sugars will be metabolized by the yeast cells [41]. In addition to the sugars, yeast cells demand other chemical elements for the maintenance of their physiological processes [15]. Carbon, hydrogen, oxygen, nitrogen, phosphorus, potassium, sulfur, magnesium, iron, zinc, as well as vitamins and other growth factors in small concentrations are essential components in raw materials needed for the fermentation process [15,42].

In order to be economically viable, the raw material used for bioethanol production should result in high rates of fermentable sugars, high yield and low production cost per hectare [43]. In addition, it should not favor the synthesis of inhibitory compounds during the process [39], providing an adequate environment for growth of fermenting yeast [33]. Furthermore, the obtainment of fermentable substrates from raw materials should involve simple and low cost operations, such as milling, pre-treatments, among others [44–46].

Several sources may serve as raw materials for bioethanol production [43]. These sources are classified into three categories according to availability of fermentable sugars, and different technologies may be needed to be applied to obtain fermentable substrates [43,47]. Saccharides or sugar-rich raw materials have abundant amount of available sucrose, such as beets, sweet sorghum stalk, fruit juices, and sugarcane [35]. For these raw materials, bioethanol production includes selection of raw materials, extraction of sugar by milling or diffusion, and treatments for cleaning and reduction of microbial load [48]. Subsequently, the fermentation, rectification and dehydration steps take place, resulting in the anhydrous alcohol [47,48] (Fig. 1).

Another class of raw materials that can be used for bioethanol production and that present large amounts of starch, include cassava, sorghum grain, potatoes, babassu mesocarp, and cereals such as corn, rice and barley, among others [43]. In this case, for the fermentation process, starch should be subjected to saccharification by thermal and enzymatic treatment. Once starch is converted into fermentable sugars,

the process follows the same steps of saccharides-rich raw materials [47,48] (Fig. 1).

The cellulosic materials are the third class of raw materials used in fermentation processes [8,44]. Eucalyptus, quince, sawdust, bagasse, rice hulls, and many other agro industrial residues [49,50] are examples of these raw materials which present high amounts of lignocellulosic compounds. The technology for bioethanol production using cellulosic materials comprises the physicochemical treatment, delignification procedures to separate cellulose and hemicellulose fractions, and the acid and/or enzymatic treatment for cellulose saccharification [35,47,49] (Fig. 1). In addition to common crops such as corn and sugarcane, algae and microorganisms are gaining relevance as adjuncts for bioethanol production [51–53]. Because of the wide range of raw materials with potential use for bioethanol production, the technologies have been classified by generation (1st to 4th) [54–59].

2.2. Bioethanol processing technologies from sugarcane must

Corn (*Zea mays*) and sugarcane (*Saccharum* spp. L) are the most used raw materials for bioethanol production worldwide [15,60]. In this article, a focus will be given on the bioethanol production from sugarcane considering the importance of this raw material in Brazil, which is the world largest sugarcane ethanol producer.

Fig. 2 illustrates the production process of bioethanol from sugarcane juice/molasses. The first stages of processing are cleaning and preparation of the raw material for obtaining the juice rich in sucrose. This step can be conducted through dry cleaning or cleaning with water [48]. Although cleaning with recycled water may be applied, it should be noticed that it results in losses of fermentable sugars from the sugarcane to the water and that this process also results in an increased microbial contamination of the obtained sugarcane juice for fermentation [48,61]. Because of these limitations, cleaning of sugarcane with water has been replaced by dry cleaning using mechanical removal of vegetable particles through the application of fans, and separation of mineral contaminants in special tables with roles [48,61].

After the cleaning process, the sugarcane cells are disrupted by leveling (rotary knives), chippers (oscillating knives) and shredders (rotary hammer) to reduce the particle size and improve sucrose extraction [48,61]. Sucrose extraction can be achieved by pressing or diffusion. Milling is performed by one or more mills that break the cells through compression [48]. Sucrose diffusion takes place in the counter-flow of the processed sugarcane with water at 70–80 °C pumped by centrifugal pumps [61].

Once sugarcane juice is obtained, it is sieved in rotating and static sieves and further added of sulfur dioxide (SO₂) and limewater [calcium hydroxide, Ca(OH)₂]. The mixture is heated to catalyze the flocculation and sedimentation of impurities [63]. In addition, this is done to degrade starch and proteins, and to facilitate gas removal. The sugarcane juice is then decanted to remove colloids, organic and inorganic non-fermentable molecules, and emulsified lipids [63]. The fermentable sugar content is adjusted by the addition of sugarcane molasses and sugar wastes (sugar not intended for human consumption) [15]. Thus, the sugarcane must is obtained, which is a substrate rich in sucrose and reducing sugars of plant origin, suitably diluted to undergo alcoholic fermentation [59,63].

The industrial fermentation occurs in three distinct stages: preparation (pre-fermentation or preliminary phase), fermentation *per se* (tumultuous phase) and post-fermentation (complementary phase) [17,36,64]. The pre-fermentation phase is characterized by the lag phase of yeasts cells after their inoculation in a ratio of 20% v/v with sugarcane must. This phase is characterized by a slow and gradual increase in temperature with tiny carbon dioxide release. The aim of this phase of fermentation is to obtain large amount of cells with maximum fermentation power within about five hours [36,64]. Further, the tumultuous phase, which lasts about ten hours takes place. This phase is characterized by a rapid increase in temperature,

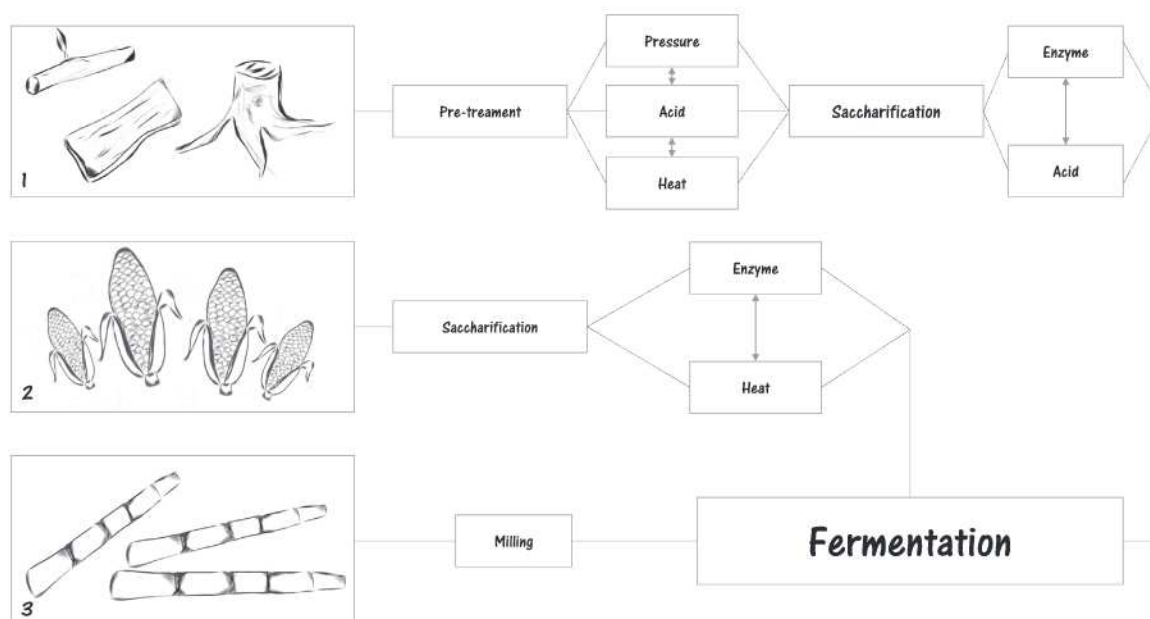


Fig. 1. Overview of the processes for bioethanol production from: (1) lignocellulosic raw materials, (2) starchy raw materials and (3) sugar-rich raw materials.

release of high amounts of carbon dioxide, increase of acidity, decrease in must density due to the formation of alcohol and equivalent consumption of sugars [36,64]. The complementary phase, that lasts about seven hours, is characterized by a continued carbon dioxide release and slow and steady decrease in temperature [36,64]. The fermented must called “wine” obtained a complex composition of liquid, solid and gaseous components and should contain small amounts of sugars [36].

For the optimization of bioethanol production by fermentation, bioreactors that favor the maintenance of physicochemical conditions and yeast cells integrity are needed [65]. From the 50 s, both the reactors (also called bioreactors and biological or biochemical reactors) and the fermentation processes have been modified to reach this purpose [65]. The reactors for ethanol fermentation can work in three operational modes: semi-continuous, fed batch or continuous phases

[65].

In Brazil, which is a major global producer of bioethanol from sugarcane, fed-batch and continuous fermentation are the most commonly used processes [6,66]. The first is still dominant in the majority (83%) of bioethanol plants [5]. In contrast, the continuous fermentation process represents about 17% of the production of bioethanol [5,65,67–69]. The fed-batch fermentation consists of feeding the bioreactor with fermentable substrate under controlled conditions. In this process, the fermentation broth is supplemented with one or more substrates for maintenance of the yeast strains and of the product up to the end of the fermentation [15,36,63]. The supplementation of the fermentation broth with nutrients can occur intermittently or continuously [65,69]. Thus, fermentation process becomes more flexible, making it possible to apply different feeding rates and to control nutrients added, favoring the metabolic pathway of interest

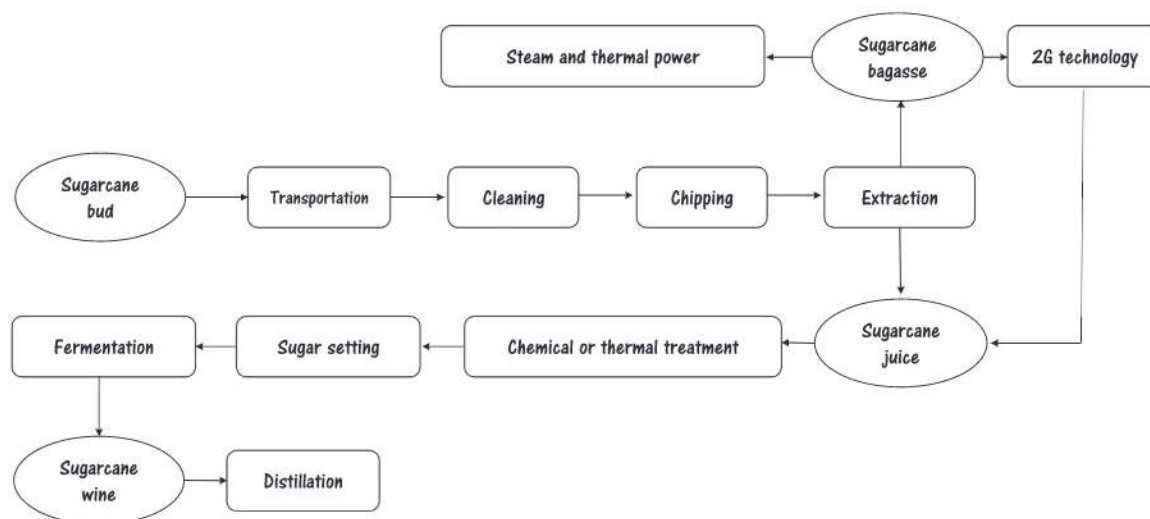


Fig. 2. Flowchart of bioethanol processing from sugarcane. After harvesting, sugarcane buds are transported to the sugar and bioethanol plant. Sugarcane buds are cleaned, cut and mixed with water. Then, the fragments are crushed between rollers in the milling tandem and the juice is subjected to chemical (SO_2 e CaO) and thermal (105°C) treatments. This treatment results in flocculation and decantation of non-sugar residues. Molasses are obtained if the clarified juice is heated. The must for bioethanol production can be prepared with the clarified juice, molasses or a mixture of both to reach approximately 18°Brix . In the fermentation vats, yeasts are added and the fermentation takes place at 30°C for 12–18 h. After this period, the fermented must (wine) is centrifuged for separation of wine and yeast cells. The wine is destined to distillation while the yeast cells can be recycled through the application of acid washing. The sugarcane bagasse can be burnt for steam or electricity production. In addition, sugarcane bagasse can be used for second-generation ethanol production.

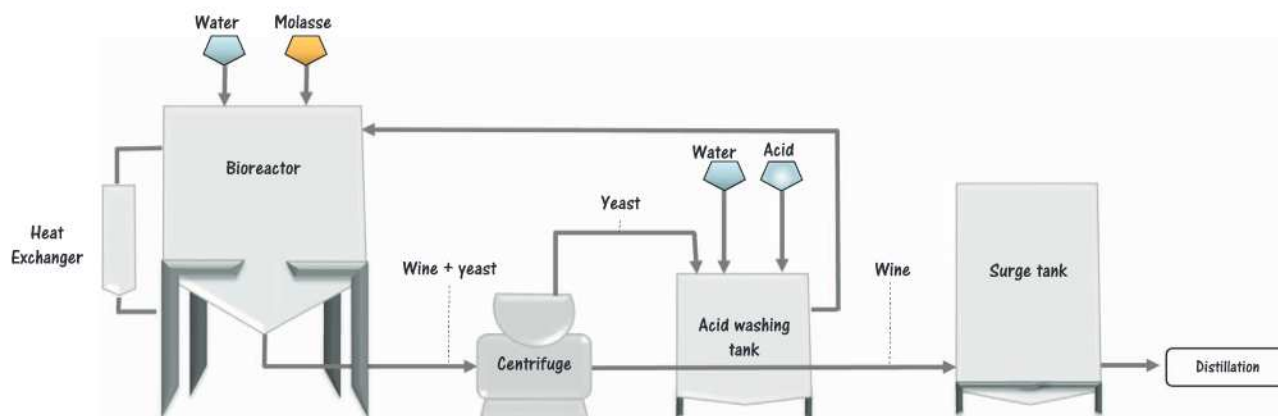


Fig. 3. Yeast cells recycling (acid washing process). The process consists of applying an acid washing treatment (sulfuric acid solution pH=2.0–3.0) in the concentrated yeast cells, following agitation for 1.0–1.5 h. After acid washing, the yeast cells are centrifuged and hydrated. These washed cells are ready for use in a new fermentation process.

[65,69,70]. When the concentration of essential nutrients is suitable and viable yeast cells are present, a great productivity is obtained as ethanol production is favored by minimizing the substrate inhibiting effects [71]. Furthermore, in the fed-batch process, successive batches can be performed in the same container due to strict control of yeast viability and traceability of all components involved in the batch process [70,72].

A great advance in ethanol production occurred with the use of cell recycle in the process [5,25]. The "Melle-Boinot" process was created in the 30 s by Firmino Boinot (*Les Usine de Melle*), France [5,15,16]. The process consists of yeast cell reuse multiple times (recycling) preceded by their separation from wine to be distilled using continuous centrifuges [15,16]. Before their reuse, the yeast cream (concentrate of yeast cells) is subjected to a decontamination process often performed with organic acids (acid washing) [15,33,65,68]. At the end of harvest season, the yeast may be recycled many times 400–600 times (Fig. 3), depending on yeast cell viability and bacterial contamination [16].

In Brazil, the implementation of the continuous process was delayed due to low productivity problems found in the first plant established in the country [63]. In addition, the high cost of implementation and greater susceptibility to bacterial contamination, opposes the efficiency of the well-established Melle-Boinot process [5,63,69]. Even with lower acceptance, the continuous process is referred to as a natural evolution of the fed-batch process, even though this technology has not been modern since some industrial facilities have processed beet molasses in France in the 30 s [69]. The continuous process consists of constantly feeding a culture medium under a constant flow rate with the maintenance of the reaction volume through removal of the fermented juice [65,68,73]. The continuous process presents greater fermentation capacity, leads to uniform fermentation broth, lower labor costs, and allow the implementation of advanced automation systems. Despite that, the microbial contamination and spontaneous genetic mutations in yeast can compromise entire batches, affecting yield [68,69,73]. The use of continuous process involves the reduction with fixed capital in 57–71% in comparison to the batch system when cell recycle and operation under vacuum are applied [69].

The bioethanol production is finished with the distillation process, which enables the separation of liquid mixtures to obtain higher bioethanol concentrations [74]. The distillation is performed with the vaporization and subsequent condensation of the fermented must, which originally presents 7–12% by volume of ethanol, and 88–93% by volume of water [3,74]. A purification process is of fundamental importance as the fermented must can also contain glycerol, higher alcohols, furfural, acetic aldehyde, acids, and solids such as sugarcane fragments, non-fermentable sugars, and gases such as CO₂ and SO₂ [3].

This operation is only feasible due to the different volatility of the components in the solution [36]. When the fermented must is subjected to such process, two fractions are obtained, the phlegm (main distillate) and vinasse. The vinasse is the result of distillation of fermented must and its alcohol level must be zero [3,36,74]. However, all fermented must substances accumulate in the vinasse, including volatile compounds [3]. For the bioethanol industry, continuous distillation in columns is applied [36,74]. The distillation column is comprised of trays or plates that act as a simple distillation apparatus [36]. The fermented must presenting higher alcohol levels is brought to boil in the upper plate, generating concentrated vapor [36]. Thus, the column temperature decreases from the bottom to the top, while the alcohol level increases proportionally [36].

Hydrous alcohol is a binary mixture with 96° GL at the end of the distillation process [36]. Alcohol is formed of an azeotropic mixture incapable of being separated by distillation, which can be subjected to other processes to achieve the anhydrous level [3]. Currently, two methods can be used to obtain anhydrous ethanol: Azeotropic Distillation and Extractive Distillation. Azeotropic distillation, also called Melle-Guinot, consists of adding a third component to the phlegm to form an azeotrope product with a lower boiling point [3]. Benzene has been replaced by cyclohexane due to its environmental and occupational health issues [3]. The principle of this technique is to obtain a mixture of water with the third component with the lowest boiling point used in distillation, which is removed at the top of the column, while the product containing approximately 99.3% alcohol is recovered at the bottom portion of the column [3]. Despite the possibility to recover and reuse the component added, the process is considered too energetic [3]. The Extractive Distillation, also called *Mariller technique*, is not widely applied by bioethanol processing plants due to its high cost of implementation. Nonetheless, the long-term cost-benefit and the best quality of the ethanol produced have motivated investments in the application of extractive distillation [3]. The simplest extractive distillation method uses monoethylene glycol (MEG) or glycerin as a phase separator, which carry water to the bottom of the column, allowing the recovery of anhydrous ethanol vapors at its top [3].

2.3. Yeasts in sugarcane must for bioethanol production

Yeasts are the most important microorganisms for production of bioethanol through fermentation [35]. Yeasts are unicellular fungi, with ovoid, elliptical or rounded shaped cells and rigid cell wall, with the same eukaryotic organelles found in other higher cells [35,75]. Most yeasts in nature belong to the subdivision of Ascomycetes and Deuteromycetes (Fungi imperfect) and a limited number belong to Basidiomycetes [75,76]. Yeasts have asexual reproduction via budding,

binary fission and sexual reproduction by forming spores [35,75,77]. In nature, yeasts have wide distribution, being found in flowers, fruits, soil, rivers, seas, in insects and mammals [75]. Most yeasts present optimum growth temperature from 20 to 30 °C, pH 3.2–6.0 and high osmotic tolerance [15,35,36,64,77].

The facultative respiration allows the use of two distinct pathways for sugar assimilation [15,19,78]. The yeasts able to perform both respiration and fermentation are called facultative aerobic [19]. For both processes, sucrose is cleaved by glycolysis to pyruvic acid by an ordered sequence of catalyzed enzymatic reactions [78]. The difference of aerobic and anaerobic processes lies on the fate of pyruvic acid in the metabolic pathway and the energy result of this route [78]. In the presence of oxygen, pyruvic acid is destined to the Krebs cycle and converted into biomass, carbon dioxide and water, while each glucose molecule generates 38 ATP molecules [78]. Under anaerobic conditions, the enzymes pyruvate-decarboxylase and alcohol-dehydrogenase use pyruvic acid as substrate for the synthesis of ethanol and water, yielding only 2 ATP molecules [15,78]. In total, 12 ordered sequential reactions occur, from sucrose breakdown to ethanol synthesis [15,18]. These reactions may be affected by several factors such as pH, temperature, inhibitors, and substrate concentration [15,18,19,78].

In addition to the bioethanol and biomass, yeasts present alternative metabolic pathways for synthesis of secondary products. These products can be directly and indirectly related to adaptation and survival as well as can be produced aerobically and anaerobically [24,79]. The yield of these pathways includes cell biomass production (nucleic acids, lipids, and proteins), glycerol, succinate, higher alcohols, organic acids and others [24,33,63]. According to the equation described by Gay Lussac, the theoretical yield is 0.511 g of ethanol per gram of glucose used as substrate [78]. However it is known that under industrial conditions, yield reaches a maximum value of about 90% when production conditions are exceptional [15,25].

There are many yeasts genera able to synthesize ethanol, particularly *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, and *Pichia* [35]. *Saccharomyces cerevisiae* is the most widely used for fermentation processes [18], which presents the following important characteristics: i) high capacity to hydrolyze sucrose, the most widely used substrate for industrial production of bioethanol [17,33]; ii) selective permeability of the cytoplasmic membrane [17–19]; iii) high resistance to stress conditions (pH, osmolality, temperature), and survival in the presence of up to 18% ethanol [17–19,33,43]; iv) rapid growth in the presence of O₂ and substrate, and production of ethanol under anaerobiosis [17,33,43].

Bioethanol is produced through sugarcane must fermentation by natural selection (native dominant yeast strain) or intentionally added specific yeast strain [5,17,25,33,74]. In the first case, yeasts have the ability of withstand the physicochemical conditions and microbial communities present in the fermentation process and dominate the ecological interactions [74,80]. Thus, by natural selection, the most adapted strains survive and predominate in the process [33,81–83]. These yeasts are able to dominate the fermentation process because they tend to organize chromosomes and change their genetic features, providing survival advantages against other yeasts [84]. Nonetheless, the predominance of these yeasts can be disturbed any time yeasts displaying flocculation capacity [18], higher glucose and ethanol resistance [5,33], and ability to express the Killer factor are present during sugarcane must fermentation [85]. On the other hand, strains that do not exhibit the advantageous combinations of variables for the fermentation process are rapidly eliminated or replaced dynamically and continuously by the most resistant and adapted strains [5,16,17,25,33].

The use of intentionally added yeasts to the fermentation process can be advantageous because these strains may have superior resistance to stress factors such as acidity, temperature, osmolality, and ethanol concentration when compared to non-selected yeast strains [5,23,33,86]. Moreover, these strains commonly present high, better

biomass production, and lower or similar glycerol synthesis rate when compared to non-selected yeast strains [33,85,87,88]. Despite this, the search for better strains or engineering of strains currently in use has been a noticeable challenge [18,81]. In this scenario, the use of molecular biology comprises an important tool aiming to select better strains or to engineer (improve) strains in use [82,89].

For decades, yeast identification was based on morphological and physiological approaches [15]. Although very useful for the development of yeasts taxonomy, these techniques are time consuming and not always conclusive [25]. In this scenario, uncertainty played a major role making it difficult to monitor and type species and strains present in the fermentation processes [25,33,90,91].

Molecular techniques have revolutionized the identification and typing of microorganisms. The application of nucleic acid fragments techniques allowed distinction of different strains present in the fermentation vats, and favored the development of studies on new genetic resources present during sugarcane must fermentation [15,25,33,86]. Karyotyping electrophoresis, analysis of microsatellites, mitochondrial DNA (mtDNA) polymorphism, DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), and low weight RNA analysis molecular (LMW-RNA) are techniques to be considered in technology of microbial fermentation [15,90,92]. Some of these can be simple, quick, and effective techniques for the quality control of fermentation processes [25,89,92].

Genetic studies on fermentative yeasts are also extremely important because they can serve as valuable tools aiming to breed specific yeast strains. The understanding of the mechanism leading to increased resistance of *S. cerevisiae* towards UBP15, THI12, CLA4, DIT1 and MTC7 gene shutdown was possible by through the discovery of heat- and ethanol-resistant strains [18,42]. Despite this, the effects of random mutagenesis techniques are also considered for the exploration of different phenotypes [93,94]. Among the techniques, the multiple exposure to ultra violet (UV), and the protoplasmic fusion called *Genome Shuffling* have stood out. Conversely, the strains obtained by mutagenesis often present difficulties to compete with wild strains when applied industrial scale [15,93–95].

2.4. Microbial contaminants during sugarcane must fermentation for bioethanol production

Several factors such as environmental conditions, quality and practices applied to the raw material, and the reuse of yeast cells in numerous times during season can influence on the level of contamination of sugarcane must by wild yeasts and bacteria [5,25,66]. This in turns will affect the performance and preservation of yeast's fermentation parameters, which may influence process parameters and yield [24,25,33,79,86].

2.5. Wild yeasts

Classic and molecular studies on sugarcane juice, dilution water, yeast cream, recycled and acid washed yeast, and fermented must have revealed the presence of *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Schizosaccharomyces*, *Kloeckera*, *Dekkera*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, and *Yarrowia* [24,45,85,89,96–99].

The development and predominance of *Saccharomyces cerevisiae*- and non-*Saccharomyces*-wild strains with lower productivity, flocculation, foaming, pseudo hyphae formation, biofilm and invasive growth, is undesirable for the sugar-bioethanol industries [17,24,62,89,100]. *Dekkera bruxellensis* is an example of detrimental species. In fed-batch fermentation, *D. bruxellensis* together with *S. cerevisiae* causes reduction in pH of the broth, adversely affecting the efficiency of ethanol production by *S. cerevisiae* [5,24]. An increase in investment in materials such as anti-foaming agents, steam, dispersants, and antimicrobials is required for processes facing contamination problems

[21,97,101,102]. Despite the problems caused by contamination of fermentation process with wild yeasts, it should be highlighted that these yeasts may present relevant characteristics for industrial uses [25,33]. For instance, mutants and wild yeasts isolated from fermentation processes have been applied with excellent results in many countries, not only in the bioethanol industry, but also in beverages and bakery industries [5,15,25,33,103]. Isolation and breeding of yeasts is gaining more space in the bioethanol sector [5,33,44,86]. Such approach is an important strategy to ensure complete substrate fermentation, higher yields, and adaptation to stressful and more profitable processes [42,85,86,104]. Characteristics such as high efficiency in ethanol synthesis, linked to the high tolerance to osmotic factors, temperature, acidity and other stressing factors arising from must processing are of great interest to producers [17,33,42,86]. In contrast, these strains must present low metabolic shift for production of biomass, glycerol, and other metabolites, otherwise such yeasts are considered contaminants [3,62,85]. Although the wild yeasts are seen as contaminants and dangerous to the bioethanol production, when selected they can present interesting characteristics [5,17,33,86,92]. Thus, wild yeasts can also serve for understanding the genetic machinery that enables survival under the environmental and ecological stress of the sugarcane must fermentation for bioethanol production [17,18,86,92].

2.6. Bacteria

The physicochemical characteristics of the raw material and manufacturing process (78–86% water, 10–20% sucrose 0.1–2% reducing sugars 0.3–0.5% ash, and 0.5–1.0% nitrogenous compounds/mineral micronutrients, pH in the range of 4.5–5.5, and temperature from 26 to 35 °C) favor the establishment of various bacteria [15,24,30,36,97,105]. The presence of different bacterial contaminants in the fermentation process has been reported by Desonghe [106] and Guichard [107]. Even with so many advances in the bioethanol industry, it is not feasible to work with sterile sugarcane must and under aseptic conditions [13,23,60,101]. Contaminants can originate from either farm or the pipes of processing plants [24,36].

Both sugarcane as raw material as its products (mixed or clarified sugarcane juice, syrup, filter juice, and final molasses), and other sources such as washing and dilution water may represent important contamination sources of the fermentation process [108]. The wastes and the plant environment can constitute micro-niche for the development of a wide variety of microorganisms [108]. Sugarcane transported from the field to the processing plant can carry microbiota attached externally to the stem, roots, and rhizoids, or endophytically to the stem [109–111]. The mineral levels of the impurities in sugarcane vary from 0.3% to 1.6% by mass, and considering the variety and abundance of microorganisms in the soil, it can be assumed that this is a relevant source of microbial introduction to the process [30,61].

Healthy sugarcane stems contain about 10^1 – 10^8 bacteria per gram [112]. The massive presence of contaminants in the field can be correlated with pest infestations during harvest and transportation that can facilitate contamination [113]. Manual cutting results in stems with a smaller exposure area for the penetration of microorganisms when compared to the mechanical technique [109]. Thus, from the microbiological point of view, the former should be preferred instead of the latter [109]. Nevertheless, it is known that the mechanical harvesting of raw sugarcane for certain purposes was prioritized to produce second-generation bioethanol [59]. It avoids the burning of straw sugarcane used to facilitate manual harvesting, resulting in higher recovery of lignocellulosic material, reducing the demand for human resources and also results in the standardization of harvest [61,114–116].

The storage of the harvested stem also represents process losses [113]. When the raw material is not immediately processed in

industrial plants, the stored sugarcane presents accentuated spoilage, with losses of 6–11% sugars due to the increased contaminant levels [109]. These contaminants are mainly *Leuconostoc mesenteroides* and *L. dextranicum* in the first 92 h of storage, with consequent production of gum, and later with predominance of *Lactobacillus* [112,117]. In addition, further spoilage can occur in the summer due to the temperature rise inside the stem and higher vulnerability to microbial establishment [109,117,118]. Some authors have shown the predominance of the genera *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* and *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Escherichia* and *Aerobacter* in sugarcane stems [112,119,120]. In the non-thermally processed sugarcane juice, the microorganisms found were *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* and *Micrococcus* [121,122]. In clarified, pasteurized and pre-cooled sugarcane juice, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Bacillus* have predominated [121].

Sugarcane, as well as transient microbiota, has several endophytic microorganisms that can be carried by sugarcane fragments not filtered in the process, or dragged along with the juice extracted in milling operations. Representative endophytes in sugarcane are *Burkholderia*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Bacillus* and *Gluconacetobacter* [111,117,123,124].

The microbiota found in the unprocessed sugarcane can be transferred to the crude juice and further persist throughout the process [102]. The concentration of these contaminants can increase in prolonged periods between cutting and milling operations, or due to poor cleaning of the mill, filters, pumps and pipes [113]. The washing of sugarcane prior to milling, to partially remove external contaminants, may result in an increase of about 10–20 times the microbial community when performed using adequate procedures and treated water [125–127]. Thus, the quality of both the washing water and dilution water is very important for a proper microbiological fermentation [109].

Studies on fermented sugarcane must have shown a predominance of Gram-positive microorganisms, which can represent up to 98% contaminants [30,102,128]. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Sporolactobacillus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* have been found as the main genera [105,112,121,125,129,130]. In sugarcane syrup, the presence of *Bacillus* and *Clostridium* was observed, emphasizing the osmotic resistance of these genera [131], while *Lactobacillus* strains have been found when yeast recycle is performed by centrifugation [112,132].

Advances in molecular biology and microbial identification techniques have also favored the assessment of contaminants in the fermentation process [102,128]. Through the use of PCR based on repetitive sequences (repPCR), amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), and 16S and PHES (ribosomal RNA) sequences, it has been reported the predominance of *Lactobacillus*, *Oenococcus* and *Weissella*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Acetobacter*, *Staphylococcus*, *Lactococcus* and *Streptococcus* in sugarcane juice and molasses [116,125]. Analysis of the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and quantitative PCR (qPCR) of samples collected from the centrifuge plate, wall fermenter, heat exchanger, water pipes, molasses, treated yeast, and yeast starters revealed the presence of the genera *Alicyclobacter*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Lactobacillus* and *Streptococcus*, but the predominance of *Lactobacillus* [67]. The microbiological contamination patterns in sugar and bioethanol industry can vary, although the genera *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* have stood out (Table 1).

In general and according to the data, the main contaminants of bioethanol production from sugarcane must fermentation are the lactic acid bacteria (LAB) [21,67,97,102,109,112,117,130,133–137]. Such contaminants reduce yeast cell viability by competition for nutrients

Table 1

Bacterial contaminants found in different sampling points throughout the bioethanol processing.

Microorganisms	Sugarcane buds (surface) ¹	Sugarcane (endophytic contaminants) ²	Sugarcane (must) ³	Molasse ⁴	Recycled yeast ⁵	Wine ⁶	Vat and centrifuge ⁷	Heat exchanger and pipes ⁸
<i>Acetobacter</i>			✓			✓		✓
<i>Acromobacter</i>			✓					
<i>Aerobacter</i>	✓							
<i>Alycyclobacillus</i>			✓	✓		✓		
<i>Azospirillum</i>		✓						
<i>Bacillus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Burkholderia</i>		✓						✓
<i>Clostridium</i>				✓				
<i>Corynebacterium</i>	✓							
<i>Enterobacter</i>	✓	✓						
<i>Enterococcus</i>						✓		
<i>Escherichia</i>	✓							
<i>Erwinia</i>	✓	✓						
<i>Flavobacterium</i>	✓		✓					
<i>Gluconacetobacter</i>		✓						
<i>Halomonas</i>				✓	✓	✓	✓	✓
<i>Herbaspirillum</i>		✓						
<i>Klebsiella</i>	✓	✓	✓					
<i>Lactobacillus</i>			✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Lactococcus</i>			✓		✓	✓	✓	✓
<i>Leuconostoc</i>	✓		✓			✓		
<i>Micrococcus</i>			✓			✓		
<i>Oenococcus</i>			✓			✓		
<i>Paenibacillus</i>			✓					
<i>Pantoea</i>		✓						
<i>Pediococcus</i>			✓	✓	✓	✓		
<i>Pseudomonas</i>	✓	✓				✓	✓	
<i>Sporolactobacillus</i>						✓		
<i>Staphylococcus</i>			✓	✓	✓	✓		
<i>Streptococcus</i>			✓			✓	✓	
<i>Tatumella</i>			✓					
<i>Xanthomonas</i>	✓							
<i>Weissella</i>			✓			✓		

References: 1 [30,112,119,120], 2 [85,110,111,123,124], 3 [30,112,121,122,130], 4 [67,131,140], 5 [67,112,130,132], 6 [2,105,109,112,121,129,130,137], 7–8 [67]

and by the deleterious effects of acids and other active compounds derived from the bacterial metabolism [19,138]. In bioethanol corn processing plants, *Lactobacillus* are also the most representative bacterial contaminant. Some authors also suggest *Acetobacter* and *Enterobacter* as important contaminants of ethanol fermentation [24,102,112,128].

The LAB are generally non-motile and non-sporeforming, catalase negative, and stand out by producing lactic acid as the major product of fermentative metabolism [75]. LAB exhibit anaerobic profile, ability to rapidly grow, and can survive in ethanol production plants, being tolerant to high temperatures (30–45 °C) and low pH [75,102,138]. LAB account for a large natural group of non-sporeforming bacteria consisting of rod- and cocci-shaped cells [22,75]. Due to lack of porphyrins, cytochromes, and absence of oxidative phosphorylation, the lactic acid bacteria can obtain energy only by substrate-level phosphorylation [75,78]. These microorganisms are aerotolerant bacteria, and are classified into homofermentative when the single fermentation product is lactic acid or heterofermentative when other metabolic products are formed [21,22,75,139,140].

Lactobacillus are rod-shaped LAB that present cells with variable length, thickness and curvature. *Lactobacillus* are predominantly homofermentative strains, and in general resistant to low pH, low oxygen concentrations, and high ethanol concentrations, justifying their prevalence in ethanol production [24,75]. The genus *Leuconostoc* present as cocci when occurring alone, and a little more elongated when in pairs or short chains, are heterofermentative [75,139]. Some species can produce polysaccharides like dextran and levan in the presence of sucrose and fructose favoring the formation of bacterial biofilms and yeast flocculation [141,142]. Bacteria of the genus *Lactococcus* have spherical or ovoid cells, while *Streptococcus* are round cells, forming long and short chains, or grouped in pairs, and

may present in capsules in log and stationary phases [75,139,143].

The genera *Bacillus* and *Staphylococcus* are also Gram-positive and catalase positive bacteria [75]. *Bacillus* genera present rod-shaped cells and aerobic or facultative aerobic metabolism [75,139]. These are endospore-producing microorganisms, and present relevant production of secondary metabolites such as enzymes and antibiotics [75].

The great microbial diversity in sugarcane juice and during fermentation process indicate that different intrinsic and extrinsic factors govern the fermentation process as a whole. Among factors leading to the great microbial diversity in sugarcane juice and during fermentation process, the following could be highlighted: i) microbial composition of soil, ii) differences in sugarcane varieties, iii) harvest technologies, iv) occurrence and prevalence of pests and diseases, and v) transportation and storage conditions [5,25]. All these factors will influence the microbiological state of the raw material at the time of processing, such as clean or dirty, wet or dry, burnt, spoiled, with or without roots, or perforated by insects [63,102,113,144]. Other factors including humidity and room temperature, handling, cleaning methods, and sampling techniques can explain the large microbial diversity during bioethanol processing [67,145,146]. Thus, the magnitude of bioethanol processing imparts unique characteristics for each production unit [63,102,144]. Consequently, each processing plant should improve and standardize the most susceptible steps to microbial contamination [102,128]. They should also regularly monitor the process to take preventive and corrective decisions in order to obtain better results in terms of yield and productivity [15,25].

2.7. Negative aspects of microbial contamination during sugarcane must fermentation for bioethanol production

Microbial contamination in bioethanol processing plants account

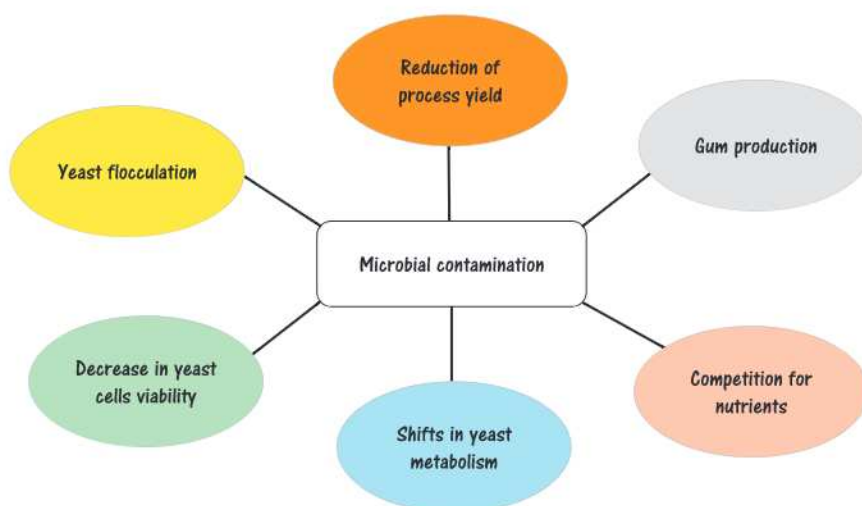


Fig. 4. Negative aspects of microbial contamination during fermentation process for bioethanol production.

for numerous losses due to the presence of bacterial contaminants in their equipment [102]. The cost of aseptic processing is high and the routes of entrance of microbial contaminants are diverse [15,22]. Thus, bacterial contamination is a cause of great concern to the sugar-bioethanol sector [24,30,97].

Recent data have shown that bacteria can lead to 1.5–5% losses in yield, depending on the fermentation conditions due to metabolic shift in sucrose [20–22]. In some cases, the reduction of yield can reach 30%, leading to a loss of commercial viability of the processing plant [27–29,32,129]. Other aspects of extreme concern arising from bacterial contamination in the fermentation vat are the formation of gums, toxins, and other secondary compounds, as well as yeast flocculation and foaming [23,24,147] (Fig. 4).

The main sucrose deviation routes in the bioethanol industry occurs due to the formation of lactic and butyric acids, produced mainly by the species *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* and *L. leishmanii*, *Streptococcus lactis*, and *Clostridium pasteurianum*, *C. saccharobutyricum* [112]. In production steps such as milling and sieves, in which there is contact with oxygen, the acetic fermentation by *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianum*, *A. acetosum*, *A. kuntzeianum* and *A. suboxydans* can take place [109,112].

The formation of gum increases sugarcane juice viscosity and can cause clogging in pipes, centrifuges, and heat exchangers. *Bacillus*, *Aerobacter* and *Streptococcus* produce levan gum whereas *Leuconostoc mesenteroides* produces dextran gum [109,112,148].

Yeast flocculation can decrease fermentation rate and hinder centrifugation operations, since the yeast sediments and remains in the bottom of the fermentation vats [24,97,109,142,149]. In addition, yeast flocculation favor losses due to metabolism deviation resulting in the formation of gum, acids, and toxins, which culminated with reduction of yeast cells viability that negatively affect productivity [24,97,109,118,142,149]. In spite of the fact that some *S. cerevisiae* species naturally express flocculin, cell-cell interactions and the activity of bacterial contaminants have also found to stimulate flocculation [63,118,149,150]. Flo1, Flo5, Flo9, and Flo10 proteins promote cell adhesion in response to the sugar concentration in the substrate for fermentation [149]. The phenomenon of flocculation can also occur in the absence of cell division and under defined environmental conditions involving the presence of divalent cations, usually calcium, which binds to anionic groups of the yeast cells [18,151]. Flocculation by the interaction between yeast cells is due to the activation of surface lectins, responsible for the strong interaction to the N-glycosylated mannans of the adjacent cell [18,152]. The interaction with starchy polysaccharides and the direct contact with bacteria can also be flocculation factors [31,118,149,152,153]. *Sporolactobacillus* and

Lactobacillus bacteria are important in inducing yeast flocculation, especially *Lactobacillus fermentum*, often isolated from flocculated vats [18,118,138]. From the ecological point of view, the ability of some bacteria to stimulate flocculation hinders yeast cell growth and nutrients capture from the environment, favoring the establishment of bacteria [118,148]. The bacteria and yeast metabolism can also promote flocculation [118,149,152]. Some alcohols such as, including n-propyl, n-butyl, iso-butyl, 1,3-butylene glycol and ethanol, have been shown to stimulate yeast flocculation at concentrations above 0.5% [154].

Apart from their influence in yeast flocculation, several authors have stated that the acids produced by bacteria are responsible for the lower yeast cell viability and reduction in bioethanol production yield [112,155]. The non-dissociated forms of acids are capable of diffusing through the cell membrane, thus affecting fermentation [24]. Within the cell, they dissociate releasing H^+ ions; acidifying the cytoplasm, altering cellular homeostasis, decreasing specific growth rate and increasing the lag phase [24]. This phenomenon can be illustrated by the activity of acetic acid, which is a metabolic product of yeasts and bacteria and that can present toxicity up to thirty times greater than ethanol [23,138,140]. In synergy with ethanol, acetic acid may confer non-selective antibacterial activity, and significantly affect yeast performance [23,97,138,140]. However, the effect of acids on the yeast viability is controversial [138,150,156,157].

2.8. Interaction between yeasts and lactic acid bacteria during sugarcane must fermentation for bioethanol production

There are many queries about the interactions between yeasts and lactic acid bacteria during sugarcane must fermentation for bioethanol production [19,138,157]. The conclusions about the drastic reduction of the yeast viability passes from competition for trace nutrients as thiamine, vitamins, and amino acids such as glutamic acid, or the action of compounds not yet identified [19,23,157]. However, from the microbial ecology point of view, what are these compounds and what is their relevance on the evolutionary history of these two microbial groups? The knowledge of the ecological interactions within the fermentation vat can offer great returns for the bioethanol industry [18,19,24,138]. This type of approach may indicate the need of new technologies for control and maintenance of the fermentative community, resulting in increased yield of the final product [18,19,24,138].

Both lactic acid bacteria and yeasts have developed physiological mechanisms for survival [19,24,138,157]. Because of the close relationship between lactic acid bacteria and yeasts, antagonistic mechanisms are evident [19,24]. In this context, literature highlights the

production of lactic acid, butyric acid, and acetic acid, diacetyl (2,3-butanedione), hydroxylated fatty acids and reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) by lactic acid bacteria so as to affect yeast growth [24]. Diacetyl, reuterin, and hydroxylated fatty acids act mainly on the inhibition of ethanol production [24,79]. Diacetyl is produced by many acid lactic bacteria species, while Gram-negative bacteria and yeasts are more sensitive to this metabolite. Reuterin is a broad-spectrum antibiotic affecting Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, and yeasts, especially the genera *Aspergillus*, *Fusarium*, *Torulopsis*, *Candida* and *Saccharomyces* [24,79]. On the other hand, some *Lactobacillus* species can produce broad-spectrum fatty acids and peptides for yeast metabolism [24,79]. Despite the intense competitive interaction, it is believed that there is a considerable dependence of the lactic acid bacteria for nutrients derived from yeast [24,26,79]. These nutrients would include amino acids, small peptides, vitamins, or certain types of sugars that are deemed to favor their co-existence [24,26,79].

The stress caused by contamination favors the production of secondary metabolites by yeasts [18,19]. In this way, glycerol and succinic acid are the most important compounds produced in great quantities [19,79,158]. Glycerol is closely correlated with the redox and osmotic balance within the cell [159], whereas the succinic acid acts mainly on the suppression of lactic acid bacteria growth [5,158]. In this competitive environment, the synergy between ethanol and succinic acid enhances the antibacterial activity, favoring yeast viability and permanence in the process [22,118,158]. As seen, numerous survival strategies employed by lactic acid bacteria and yeasts in the fermentation environment have been reported [24,79]. Currently, the question that remains is whether it would be possible to define intra- and interspecific communication routes between bacteria and yeasts.

2.9. Concluding remarks

Several approaches for the control and reduction of microbial contaminants during fermentation of must for bioethanol production exist, such as use of peroxide and sulphite¹, application of antibiotics and disinfectants [97,101,102,158,160], as well as recent methods based on the application of bacteriophages and lytic enzymes [32,161]. Despite their advantages, it should be stressed that the application of these technologies will not address the needs of bioethanol industry considering that the addition of these ingredients will lead to increase in costs of production. Given this, bioethanol industry should seek approaches that do not aim to reduce drastically the load of microbial contaminants [19,138]. Nonetheless, for these approaches succeed, gaining insights on the mechanisms of interactions between yeasts and bacteria during fermentation of must for bioethanol production should be mandatory.

Bioethanol production technology undergoes an exciting phase focused on the access to new raw materials, different processing techniques, and yeast strains selected by the particular needs of each process. All these changes will introduce new challenges for bioethanol processing plants to control microbial contaminants that may influence fermentation of must for bioethanol production.

Even though bioethanol processing is highly dependent on proper yeast growth and ethanol production in a non-sterile environment, few studies have focused on the assessment of the structure of the microbial community and succession during each processing step of processing and their impact on bioethanol production and yield. Studies involving metagenomics, metatranscriptomics, metabolomics and other “omics” will be highly needed and useful to explain the mechanisms underlying microbial interaction throughout bioethanol production chain that impact on process yield. This knowledge will become much more crucial for better development of the process, control of contaminants and for increase in the yield and competitiveness of bioethanol production plants.

Compliance with ethical standards

Funding

This study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant CNPq 302763/2014-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflict of interest

R.P. Brexó and A.S. Sant'Ana declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Acknowledgements

The authors would like to thank the support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant CNPq 302763/2014-7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support.

References

- [1] National Center for Biotechnology Information. Ethanol. PubChem Compd Database. (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>); 2004.
- [2] Carvalho GG, Monteiro RABA. influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. FAZU Rev 2011;8:47–54.
- [3] Machado CMM, Abreu FR e. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. Política Agríc 2006;15:64–78.
- [4] Milanez AY, Faveret Filho PSC, Da Rosa SES. Perspectivas para o etanol brasileiro. BNDES Set 2008;27:18. <http://dx.doi.org/10.4067/S0049-34492008000200016>.
- [5] Lopes ML, Paulillo SC, de L, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. Braz J Microbiol 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>.
- [6] Freitas LC, Kaneko S. Ethanol demand under the flex-fuel technology regime in Brazil. Energy Econ 2011;33:1146–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ene-co.2011.03.011>.
- [7] de Barros MM, Szklo A. Petroleum refining flexibility and cost to address the risk of ethanol supply disruptions: the case of Brazil. Renew Energy 2015;77:20–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2014.11.081>.
- [8] Walter A, Rosillo-Calle F, Dolzan P, Piacente E, Borges, da Cunha K. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. Biomass Bioenergy 2008;32:730–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.01.026>.
- [9] Puri M, Abraham RE, Barrow CJ. Biofuel production: prospects, challenges and feedstock in Australia. Renew Sustain Energy Rev 2012;16:6022–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.06.025>.
- [10] García AE, Carmona RJ, Lienqueo ME, Salazar O. The current status of liquid biofuels in Chile. Energy 2011;36:2077–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2010.06.005>.
- [11] Tao J, Yu S, Wu T. Review of China's bioethanol development and a case study of fuel supply, demand and distribution of bioethanol expansion by national application of E10. Biomass Bioenergy 2011;35:3810–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.06.039>.
- [12] Qiu H, Sun L, Huang J, Rozelle S. Liquid biofuels in China: current status, government policies, and future opportunities and challenges. Renew Sustain Energy Rev 2012;16:3095–104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.02.036>.
- [13] Gholadian B. Liquid biofuels potential and outlook in Iran. Renew Sustain Energy Rev 2012;16:4379–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.05.013>.
- [14] Osei G, Arthur R, Afrane G, Agyemang EO. Potential feedstocks for bioethanol production as a substitute for gasoline in Ghana. Renew Energy 2013;55:12–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2012.12.012>.
- [15] Amorim HV, Leão RM. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia, 1st ed. Piracicaba: Fermentec; 2005.
- [16] Amorim HV, Lopes ML, De Castro Oliveira JV, Buckridge MS, Goldman GH. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. Appl Microbiol Biotechnol 2011;91:1267–75. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>.
- [17] Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC, Gombert AK. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry?. Appl Microbiol Biotechnol 2013;97:979–91. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4631-x>.
- [18] Carvalho-Netto OV, Carazzolle MF, Mofatto LS, Teixeira PJ, Noronha MF,

- Calderón LAL, et al. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Micro Cell Fact* 2015;14:13. <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-015-0196-6>.
- [19] Dong S-J, Lin X-H, Li H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. *Int J Biochem Cell Biol* 2015;68:33–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.08.010>.
- [20] Pimentel J, James DW. Fermentation of carbohydrate. November 11, US Patent. 8883470, n.d.; 2014.
- [21] Narendranath NV, Hynes SH, Thomas KC, Ingledew WM. Effects of *Lactobacilli* on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:4158–63.
- [22] Narendranath NV, Ingledew WM, Kelsall DR, Austin GD, Kluhspeis C, editors. *Bacterial contamination and control in ethanol production* 4th ed.. alcohol Textb; 2003. p. 287–98.
- [23] Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, De Amorim HV, Eggleston G, Basso LC. Homo- and heterofermentative *Lactobacilli* differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 2014;105:169–77. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-013-0063-6>.
- [24] Beckner M, Ivey ML, Phister TG. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* 2011;53:387–94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03124.x>.
- [25] Borges EP, Lopes ML, Bernardino C, Godoy A, Ré FE, Cherubin RA, et al. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar Ind (Zuckerind)* 2015;4:209–16.
- [26] Paramithiotis S, Gioulatos S, Tsakalidou E, Kalantzopoulos G. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem* 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.001>.
- [27] Alcarde VE. Evaluation of parameters affecting yeasts and bacteria flocculation isolated from industrial alcohol fermentation process. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 2001.
- [28] Ngang JJE, Letourneau F, Villa P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;31:125–8. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00262448>.
- [29] Neto PO, Futoshi Y. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Rev Microbiol* 1997;28:25–31.
- [30] Costa OYA, Souto BM, Tupinambá DD, Bergmann JC, Kyaw CM, Kruger RH, et al. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2015;42:73–84. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1533-1>.
- [31] Andrietta GS, Steckelberg C, Andrietta R. Bioethanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Construindo a História Dos Prod Nat; 2006, p. 1–16.
- [32] Worley-Morse TO, Deshusses MA, Gunsch CK. Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages. *Biotechnol Bioeng* 2015;112:1544–53. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.25586>.
- [33] Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 2008;8:1155–63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>.
- [34] Lima I da R, Aluizio de Abreu Marcondes. Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira. Curitiba - PR.: Editora da UFPR; 2002.
- [35] Cereda MP, Vilpoux OF. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. *Fundação Cargill* 2003;3.
- [36] Borzani W, Schmidell W, Lima U, de A, Aquarone E. *Biotechnology Industrial - Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Blucher 2001.
- [37] Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol* 2006;129–132:496–508. <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:130:1:496>.
- [38] Stenberg K, Tengborg C, Galbe M, Zacchi G. Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol* 1998;71:299–308. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199804\)71:4<299::AID-JCTB858>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199804)71:4<299::AID-JCTB858>3.0.CO;2-Z).
- [39] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol* 2000;74:25–33. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).
- [40] Ruth L. Bio or bust? The economic and ecological cost of biofuels. *EMBO Rep* 2008;9:130–3. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.embo.2008.6>.
- [41] Nobre TDP, Horii J, Alcarde AR. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência Tecnol Aliment* 2007;27:20–5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100004>.
- [42] Cavalheiro A, de A. Analysis of mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae* aiming the improvement in the ethanol resistance and production. São Paulo, Brazil: University of São Paulo – USP; 2013.
- [43] Sánchez ÓJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol* 2008;99:5270–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.013>.
- [44] Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, Stojiljkovic M, Foulquié-Moreno MR, Thevelein JM. Looking beyond *Saccharomyces*: the potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res* 2015;15. <http://dx.doi.org/10.1093/femsyr/fov053>.
- [45] Pereira GDA, Gomes G, Rozolem A, de Nóbrega G, Barcellos F, Rodrigues E. Isolation, identification and screening of hydrolytic enzymes producing phylloplane yeasts. *BMC Proc* 2014;8:261. <http://dx.doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-P261>.
- [46] Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:151. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-151>.
- [47] Macedo M. De. Álcool etílico da cachaça ao cereal. Icone 1993.
- [48] Rein P. Cane sugar engineering. Veri Albert Bartsens 2007.
- [49] Rajee O, Fabian KQS, Shen LJ, Hao KL, Gabriel TCK, Ann TK, et al. Potential and technological advancement of biofuels. *Int J Adv Sci Tech Res* 2014;4:12–29.
- [50] Nogueira L, Seabra J, Best G, Leal M, Poppe M. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES; 2008.
- [51] Harun R, Yip JWS, Thiruvengadam S, Ghani WAWAK, Cherrington T, Danquah MK. Algal biomass conversion to bioethanol-a step-by-step assessment. *Biotechnol J* 2014;9:73–86. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201200353>.
- [52] John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour Technol* 2011;102:186–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.139>.
- [53] Li K, Liu S, Liu X. An overview of algae bioethanol production. *Int J Energy Res* 2014;38:965–77. <http://dx.doi.org/10.1002/er.3164>.
- [54] Demirbas A, Fatih Demirbas M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manag* 2011;52:163–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>.
- [55] Demirbas MF. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Appl Energy* 2009;86:S151–S161. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.043>.
- [56] Dragone G, Fernandes B, Vicente A, Teixeira J. Third generation biofuels from microalgae. In: Méndez-Vilas A, editor. *Current research, technology and education. Topics in applied microbiology and Microbial biotechnology*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center; 2010. p. 1355–66.
- [57] Lennartsson PR, Erlandsson P, Taherzadeh MJ. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresour Technol* 2014;165:3–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>.
- [58] Dias MOS, Junqueira TL, Jesus CDF, Rossell CEV, Maciel Filho R, Bonomi A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy* 2012;43:246–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2012.04.034>.
- [59] Dias MOS, Junqueira TL, Cavalet O, Cunha MP, Jesus CDF, Rossell CEV, et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresour Technol* 2012;103:152–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.120>.
- [60] Lyons TP, Jacques KA, Kelsall DR. The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries, 3rd ed.. Nottingham, UK: Nottingham University Press; 1999.
- [61] Dias MO, de S. Development and optimization of first and second generation bioethanol and electricity production processes from sugarcane. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 2011.
- [62] Andrietta MGS, Andrietta SR, Steckelberg C, Stuppiello ENA. Bioethanol – Brasil, 30 years of Proalcool. *Int Sugar J* 2007;109:195–200.
- [63] De Oliva-Neto P, Dorta C, Flavia A, Carvalho A, Gomes De Lima VM, Fernandes D, et al. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. *Formatex* 2013;371–9.
- [64] Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos: princípios e Aplicações*. Nobel 2009.
- [65] Porto LM. Industrial process modeling of continuous alcoholic fermentation in cascade bioreactors. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 2006.
- [66] Basso L, Basso T, Rocha S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. *Biofuel Prod – Recent Dev Prospect* 2011;1530:85–100. <http://dx.doi.org/10.5772/959>.
- [67] Campana FB. Temporal and spatial monitoring of bacterial contamination in bioethanol production: a molecular characterization by T-RFLP and quantitative detection by qPCR of community-formers biofilms. *ESALQ – Univ São Paulo* – USP 2012.
- [68] Godoy A, Amorim HV, Lopes ML, Oliveira AJ. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *Int Sugar J* 2008;110:175–81.
- [69] Viegas MC. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 2003.
- [70] Carvalho JCM, Sato S. Fermentação Descontínua. In: Schmidell W, editor. *Biotechnol. Ind. II Eng. Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher; 2001. p. 193–204.
- [71] McNeil B, Harvey LM. *Fermentation – a practical approach*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1990.
- [72] Borges PCS. Otimização Dinâmica da Fermentação Alcoólica no Processo em Batelada Alimentada. Uberlândia, Brazil: Federal University of Uberlândia; 2008.
- [73] Facciotti MCR. Fermentação Contínua. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W, editors. *Biotechnol. Ind. II Eng. Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher; 2001. p. 223–46.
- [74] Alcarde AR. Cachaça. Ciência, tecnologia e arte. Blucher 2014.
- [75] Madigan MT, Martinko JM, Stahl D, Clark DP. *Brook biology of microorganisms*, 13th ed. Benjamin Cummings; 2010.
- [76] Stratford M. Food and beverage spoilage yeast. In: Querol A, Fleet GH, editors. *Yeasts food beverages*. Berlin: Springer; 2006. p. 335–79.
- [77] Fleet GH. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res* 2008;8:979–95. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>.
- [78] Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Artmed 2014.
- [79] Ivey M. Transcriptome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under bacterial contamination and lactic acid stress during ethanolic fermentation. Raleigh, USA: NC State University; 2010.
- [80] de Souza Liberal AT, da Silva Filho EA, de Moraes JOF, Simoes DA, de Moraes MA.

- Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett Appl Microbiol* 2005;40:19–23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01618.x>.
- [81] Filho EA, da S, de Melo HF, Antunes DF, Santos SKB, dos, Resende A, do M, Simões DA, et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2005;32:481–6. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-005-0027-6>.
 - [82] da Silva-Filho EA, Brito dos Santos SK, do Monte, Resende A, Falcão de Moraes JO, de Moraes MA, Simões DA. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 2005;88:13–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-004-7283-8>.
 - [83] Branco P, Viana T, Albergaria H, Arneborg N. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int J Food Microbiol* 2015;205:112–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.015>.
 - [84] Lopes ML. Study of chromosomal polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 strain) used in the industrial process of ethanol producing. Rio Claro, Brazil: São Paulo State University; 2000.
 - [85] Reis VR. Characterization of wild yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermentative processes for ethanol production. ESALQ – Univ São Paulo – USP 2011.
 - [86] Lopes ML, Paulillo SC, de L, Cherubin RA, Godoy A, Neto HIB, de A. Amorim HV de. Tailored yeast strains selected for ethanol production: The process driven selection (e-book), 1st ed.. Piracicaba: Fermentec Tecnologias em Açúcar e Alcool Ltda; 2015.
 - [87] Abreu-Cavaleiro A, Monteiro G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains. *Braz J Microbiol* 2013;44:665–71. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000300001>.
 - [88] Furlan RMC. Yeast selection from the biodiversity of Brazilian distilleries for high ethanol content fermentation. ESALQ – Univ São Paulo – USP 2012.
 - [89] Basílio ACM, De Araújo PRL, De Moraes JOF, Da Silva Filho EA, De Moraes MA, Simões DA. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol* 2008;56:322–6. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-007-9085-5>.
 - [90] Ratón TO. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Ibero Micol* 2004;21:15–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.001>.
 - [91] Senses-Ergul S, Ágoston R, Belák Á, Deák T. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int J Food Microbiol* 2006;108:120–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.014>.
 - [92] Tosin C, Andrietta SR, Andrietta M, da GS. Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *J Inst Brew* 2015;121:343–8. <http://dx.doi.org/10.1002/jib.237>.
 - [93] Zheng DQ, Wu XC, Tao XL, Wang PM, Li P, Chi XQ, et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresour Technol* 2011;102:3020–7.
 - [94] Andrette RO, Arruda-Neto JDT, Basso TO, Basso LC, Cavalcante-Silva E, Bittencourt-Oliveira MC, et al. Use of radiation in strains of *Saccharomyces cerevisiae*: a new technique for industrial applications. *Adv Biosci Biotechnol* 2013;4:346–51. <http://dx.doi.org/10.4236/abb.2013.43045>.
 - [95] Apacé. Intensive Field trial of ethanol/petrol blend in vehicles. Executive. Dugong, Australia: Apacé Research Ltd; 1998.
 - [96] Neder RN. Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana: posição sistemática e valor industrial. ESALQ – Univ São Paulo – USP 1975.
 - [97] Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:401–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>.
 - [98] Abbott DA, Hynes SH, Ingledew WM. Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005;66:641–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-004-1769-1>.
 - [99] De Souza Liberal AT, Basílio ACM, Do Monte Resende A, Brasileiro BTV, Da Silva-Filho EA, De Moraes JOF, et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol* 2007;102:538–47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x>.
 - [100] Figueiredo CM. Análise molecular da floclação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil. *Fed Univ St Catarina* 2008.
 - [101] Chang IS, Kim BH, Shin PK. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1–6.
 - [102] Lucena BTL, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, Azevedo V, et al. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* 2010;10:298. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-10-298>.
 - [103] Stroppa CT, JGLF Alves, de Figueiredo, Castro ALF, Parâmetros CC. cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. *Cienc Agrotecnologia* 2009;33:1978–83. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542009000700048>.
 - [104] Cabrini KT, Gallo CR. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Sci Agric* 1999;56:207–16.
 - [105] Nolasco-Junior J. Development of thermal Process Optimized for sugarcane juice in alcoholic fermentation. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 2005.
 - [106] Desonghe G. *Traité complet de la fabrication de l'alcool et des levures*. Lille 1889;2:554–70.
 - [107] Guichard P. *Traité De Distillerie*. Microbiologie Du Distillateur. Technologi. J.B. baillière et fils - Encyclopedie industrielle; 1896.
 - [108] Sharmin F, Wakelin S, Huygens F, Hargreaves M. Firmicutes dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. *Sci Rep* 2013;3:3107. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03107>.
 - [109] Naves RF, de Sousa Fernandes F, Gomes Pinto O, Faleiro Naves PL. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. *Enciclopédia Biosf* 2010:6.
 - [110] James EK. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res* 2000;65:197–209. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00087-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00087-8).
 - [111] Oliveira ALM, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JI. The effect of inoculating endophytic N2-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil* 2002;242:205–15. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016249704336>.
 - [112] Gallo CR. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 1989.
 - [113] Mutton MJR. Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial. Perdas açúcares do campo ao Prod. Final. Simpósio Int. da STAB, Águas de São Pedro; 2003, p. 3.
 - [114] Wang L, Quiceno R, Price C, Malpas R, Woods J. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: looking forward. *Renew Sustain Energy Rev* 2014;40:571–82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.212>.
 - [115] Hassuani S, J., Leal MRL V., Macedo I. Biomass power generation. Sugar cane bagasse and trash. 1st ed. Piracicaba: PNUD – Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. CTC – Centro de Tecnologia Canavieira; 2005.
 - [116] Pippo WA, Luengo CA, Alberteris LAM, Garzone P, Cornacchia G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: current situation and environmental aspects. *Waste Biomass Valoriz* 2011;2:1–16. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-010-9048-0>.
 - [117] Neto PO. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. UNICAMP 1995.
 - [118] Ludwig KM, Oliva-Neto P, Angelis DF De. Quantificação da floclação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência Tecnol Aliment* 2001;21:63–6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612001000100014>.
 - [119] Duncan CL, Colmer AR. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. *Appl Microbiol* 1964;12:173–7.
 - [120] Tilbury RH. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: Can JG, editor. *Lact. acid Bact. beverages food*. London: Academic Press; 1975. p. 171–7.
 - [121] Silva N. Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 1988.
 - [122] Pederson CS, Hucker GJ. The significance of bacteria in sugar mills. *Meetg Assoc Tech Azucar Cuba*; 1946, p. 225–30.
 - [123] Rennie RJ, Freitas JR, de, Ruschel AP, Vose PB. Isolation and identification of N2-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Can J Microbiol* 1982;28:462–7.
 - [124] Perin L, Baldani JI, Reis VM. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. *Pesqui Agropecu Bras* 2004;39:763–70. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204x2004000800006>.
 - [125] Naves RF, Fernandes F, de S, Pinto OG, Naves PLF. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. *Biosfera* 2010:1–16.
 - [126] Serra GE, Cereda MP, Feres RJ, Bertozzo MT, Vicente AT. Contaminação da fermentação alcoólica “floclação do fermento”. *Bras Açucareiro* 1979;93:26–31.
 - [127] Stroppa CT. Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 1998.
 - [128] Li Q, Heist EP, Moe LA. Bacterial community structure and dynamics during corn-based bioethanol fermentation. *Micro Ecol* 2016;71:409–21. <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0673-9>.
 - [129] Rodini M. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. ESALQ – Univ São Paulo – USP 1985.
 - [130] Rosales SYR. Contaminantes bacterianos da fermentação alcoólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro, Brazil: São Paulo State University; 1989.
 - [131] Bevan D, Bond J. Microorganism in field and mill – a preliminary survey. *Conference Queensl. Soc. sugar cane Technol.*, Brisbane; 1971, p. 137–43.
 - [132] Neto PO. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo de batelada alimentada. Campinas, Brazil: State University of Campinas – UNICAMP; 1990.
 - [133] Gallo CR, CANHOS VP. Efeitos do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana da fermentação alcoólica. *Stab Açúcar Alcool Subprodutos* 1991;29:35–7.
 - [134] Lushia W, Heist P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. *Ethanol Prod Mag* 2005;11:80–1.
 - [135] Mäkanjuola DB, Sprinuiui DG. Identification of lactic acid bacteria isolated from different stages of malt whisky distillery fermentations. *J Inst Brew* 1984;90:13–9. <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1984.tb04226.x>.
 - [136] Reis VR. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. *Ciência Tecnol*

- Aliment 2011;1:81.
- [137] Lucena BT. Diversidade genética de bactérias lácticas presentes em destilarias de álcool combustível nos Estados da Paraíba e Pernambuco. Federal University of Pernambuco; 2010.
- [138] Rich JO, Leathers TD, Bischoff KM, Anderson AM, Nunnally MS. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresour Technol* 2015;196:347–54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.071>.
- [139] Holt JH. Manual of determinative bacteriology, 9th ed.. Williams Wilkins: Springer; 1994.
- [140] Costa VM. Metabolites profile excreted by *Lactobacillus* isolated from industrial ethanol production process concerning D(–) and L(+) lactic acid optical isomers. *ESALQ – Univ São Paulo – USP* 2006.
- [141] Skinner-Nemec KA, Nichols NN, Leathers TD. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production [electronic resource]. *Biotechnol Lett* 2007;29:379–83. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0159-0>.
- [142] Leathers TD, Bischoff KM, Rich JO, Price NPJ, Manitchotpisit P, Nunnally MS, et al. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresour Technol* 2014;169:45–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.065>.
- [143] Schleifer KH, Ludwig W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. *Genera Lact. Acid Bact.*, Springer; 1995, p. 7–18.
- [144] Camolez MA, MMJR. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. *Stab – açúcar Alcool Subprodutos* 2005;23:6–9.
- [145] Lima UA, Goldoni JS, Cereda MP, Souza LG. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Bras Açucareiro* 1974;83:21–7.
- [146] Solomon S. Post-harvest deterioration of sugarcane. *Sugar Tech* 2009;11:109–23. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-009-0018-4>.
- [147] Makanjuola DB, Tymon A, Springham DG. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzym Micro Technol* 1992;14:350–7. [http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90002-6](http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(92)90002-6).
- [148] Gilliland RB. The flocculation characteristics of brewing yeasts during fermentation. *Proc Eur Brew Conv* 1951:35–58.
- [149] Soares EV. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J Appl Microbiol* 2011;110:1–18. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x>.
- [150] Bony M, Barre P, Blondin B. Distribution of the flocculation protein Flop, at the cell surface during yeast growth: the availability of Flop determines the flocculation level. *Yeast* 1998;14:25–35. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980115\)14:1<25::AID-YEA197>3.0.CO;2-C](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<25::AID-YEA197>3.0.CO;2-C).
- [151] Phillip GZ, Richard CH. The isolation and characterization of flocculent yeasts. *Biol. Res. Ind. yeast III*, CRC press; 1987, p. 185–96.
- [152] Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* 2006;60:5–15. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05072.x>.
- [153] Santos MT, Yokoya F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *J Ferment Bioeng* 1993;75:151–4.
- [154] Eddy AA. Flocculation characteristics of yeast. I. Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inst Brew* 1955;6:307–12.
- [155] Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM. Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J Am Soc Brew Chem* 2001;59:187–94. <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-59-0187>.
- [156] Bayrock D, Ingledew WM. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2001;27:39–45. <http://dx.doi.org/10.1038/sj/jim/7000159>.
- [157] Bayrock DP, Ingledew WM. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity?. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2004;31:362–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-004-0156-3>.
- [158] Dorta C, Oliva-Neto P, De-Abreu-Neto MS, Nicolau-Junior N, Nagashima AI. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World J Microbiol Biotechnol* 2006;22:177–82. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-005-9016-1>.
- [159] Scanes MLA, Hohmann SKT, Prior BA. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South Afr J Enol Vitic* 1998;19:17–24.
- [160] Madaleno LL, Minari GD, De Annunzio FR, De Carvalho MR, Bossa Júnior GR, Sales DC, et al. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. *Científica* 2016;44:226. <http://dx.doi.org/10.15361/1984-5529.2016v44n2p226-234>.
- [161] Roach DR, Khatibi PA, Bischoff KM, Hughes SR, Donovan DM. Bacteriophage-encoded lytic enzymes control growth of contaminating *Lactobacillus* found in fuel ethanol fermentations. *Biotechnol Biofuels* 2013;6:20. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-20>.

CAPÍTULO 2

REVISÃO

O *QUORUM SENSING* DESEMPENHA ALGUM PAPEL NAS INTERAÇÕES MICROBIANAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR?

REVIEW

MICROBIAL INTERACTIONS DURING SUGAR CANE MUST FERMENTATION FOR BIOETHANOL PRODUCTION: DOES QUORUM SENSING PLAY A ROLE?

Artigo aceito para publicação na revista:

Critical Reviews in Biotechnology

Brexó, R. P., Sant'Ana A. S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? (2017). Crit Rev Biotechnol. Epub ahead of print. DOI: 10.1080/07388551.2017.1332570 .



REVIEW ARTICLE



Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role?

Ramon Peres Brexó and Anderson de Souza Sant'Ana

Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

ABSTRACT

Microbial interactions represent important modulatory role in the dynamics of biological processes. During bioethanol production from sugar cane must, the presence of lactic acid bacteria (LAB) and wild yeasts is inevitable as they originate from the raw material and industrial environment. Increasing the concentration of ethanol, organic acids, and other extracellular metabolites in the fermentation must are revealed as wise strategies for survival by certain microorganisms. Despite this, the co-existence of LAB and yeasts in the fermentation vat and production of compounds such as organic acids and other extracellular metabolites result in reduction in the final yield of the bioethanol production process. In addition to the competition for nutrients, reduction of cellular viability of yeast strain responsible for fermentation, flocculation, biofilm formation, and changes in cell morphology are listed as important factors for reductions in productivity. Although these consequences are scientifically well established, there is still a gap about the physiological and molecular mechanisms governing these interactions. This review aims to discuss the potential occurrence of quorum sensing mechanisms between bacteria (mainly LAB) and yeasts and to highlight how the understanding of such mechanisms can result in very relevant and useful tools to benefit the biofuels industry and other sectors of biotechnology in which bacteria and yeast may co-exist in fermentation processes.

ARTICLE HISTORY

Received 28 August 2016
Revised 26 February 2017
Accepted 2 April 2017

KEYWORDS

Bioethanol; yeast; lactic acid bacteria; microbial interactions; quorum sensing

Introduction

Climate changes and energy crises related to depletion of fossil fuels, highlight biofuels topical importance. The use of regional and abundant raw materials and agro industrial waste emphasizes the role of these renewable and sustainable fuels in the world's energy matrix [1–3]. Bioethanol stands out in this context taking into consideration enhanced global demand and increased investments in the sector [4–6]. Brazil is the world's second largest ethanol producer, using a successful large-scale bioprocess with low environmental impact [7–11].

In order to minimize the energy gap in the synthesis of biomass, cell recycling is often used in bioethanol production in Brazil (Melle-Boinot) [9,12–14]. In spite of being a well-established process, it is known that raw materials, the mild heating conditions applied to the fermentation broth (i.e., sugar cane must, for instance) and cell recycling may result in microbial survival or introduction of microbial contaminants that will further grow during fermentation. The growth of these microbial contaminants commonly results in several losses to the sugar-alcohol industry [9,15–18].

Lactic acid bacteria (LAB) and wild yeasts are the most important microbial contaminants in the bioethanol industry [18–20]. The main negative effect of the presence of these contaminants is the reduction in viability and fermentative capacity of the ethanol-producing yeast, leading to reduction of the final yield of the process [9,18,19,21–25]. Therefore, it seems the microbial interactions play an important role in the fermentation dynamics [23,26–29]. It is known that the main modulating factors of population dynamics during fermentation are selective pressure due to competition for nutrients, pH reduction, and synthesis of high levels of ethanol and organic acids [19,25,28]. Nonetheless, cell-cell interaction and the production of small extracellular metabolites derived from enzymes was found to contribute to this complex network of interactions between yeasts and bacteria during fermentation [30–33]. Despite the existence of reports on the consequences of microbial interactions during bioethanol production, there is still little knowledge of the molecular mechanisms involved in the process [9,16,30,31,33–35]. The production of extracellular low molecular

weight metabolites by yeasts and bacteria at the end of exponential growth phase and the action of these intra- and interspecific molecules suggests the potential existence of quorum sensing (QS) among microorganisms involved in fermentation [31,36–39]. QS describes the mechanisms used by microorganisms to understand environmental changes and consequently for them to apply specific strategies in order to adapt these changes in time and space [40].

The system of communication or interaction between microorganisms occurs through small diffusing extracellular molecules. These molecules are synthesized under specific physiological conditions, due to modifications in the environment and/or depend on the stage of microbial growth. These molecules accumulate extracellularly and become active only when a peak of concentration is reached (quorum). Once this peak is reached, these molecules are then identified by specific receptors. Cellular responses can be at genetic, physiological, metabolic, and structural levels [40–44]. Therefore, understanding the mechanisms of action of these molecules in the eco-physiological process of feedstock fermentation may constitute a very useful tool to ensure the process is better controlled. A few examples of the advantages of this understanding could be the increase in ethanol yields due to the control of populations interactions and the induction for the synthesis of bioactive and organoleptic compounds in the case of the production of fermented beverages [45–47].

Given the above facts, this review aims to discuss the microbial interactions and their impacts during fermentation in bioethanol production. Even though microbial communication via QS is an important concept, knowledge of the role of signaling molecules during industrial processes is still superficial. Studies with QS in fermentations are scarce and simultaneously inhibitory strategies—quorum quenching (QQ)—and related technologies are almost nonexistent. Therefore, this review takes advantage of data available in the literature to build hypotheses on the correlations between the modulating effects of microbial responses via QS and their potential applications in feedstock fermentation processes.

Microbiota in bioethanol fermentation

Ecological benefits of biofuels and the possibility of using regional and abundant raw materials in the process give prominence to bioethanol among other fuels [11,48,49]. The bioethanol production process consists of biochemical transformation of fermentable sugars by yeasts that produce ethanol as a secondary metabolite [50]. This process requires controlled conditions to

ensure adequate productivity and the standard process conditions are: 45–60% sucrose plus 5–20% glucose/fructose, nitrogen 100–300 mg L⁻¹, phosphorus 50–250 mg L⁻¹, potassium 700–1200 mg L⁻¹, magnesium 100–200 mg L⁻¹, in addition to small concentrations of calcium and sulfur in the must [7,13]. Temperature should also be controlled and maintained between 32 and 35 °C [13]. These conditions, besides favoring ethanol production, also allow the development of LAB and wild yeasts [7,13,49,51,52].

Even with all technical and scientific knowledge gained by the sugar-alcohol industry, microbial contamination is still a challenge. Bioethanol processing plants and distilleries face difficulties in sterilizing raw materials and other components, making the process susceptible to the growth of microbial contaminants such as LAB and wild yeasts [9,16–18,28,53]. A controlled fermentation should not present populations of microbial contaminants in the must above 10⁵ CFU mL⁻¹. Microbial counts above 10⁷ CFU mL⁻¹ may result in significant losses to bioethanol production process. In extreme cases, losses caused by yield reduction may lead to loss of commercial viability [23,28,54–56]. Additionally, the metabolic deviation of sugars to produce acids, gums and toxins consists of major microbial contamination aggravating conditions during feedstock fermentation for bioethanol production [50]. These bacterial metabolites besides making less substrate available for alcoholic fermentation, decrease yeast viability, and increase the production of glycerol and other byproducts, resulting in even greater losses in yield and productivity [57]. More information about microbial contamination and the main problems caused by microbial contaminants during feedstock fermentation for bioethanol production can be found in Brexó and Sant'Ana [50].

It is shown in Figure 1, chemicals, antibiotics, as well as new methods based on the application of enzymes and bacteriophages have been proposed for the control of bacterial contamination in bioethanol processes [58–60]. Despite this, these alternatives are known to increase of the production cost, to contribute to the establishment of more resistant bacteria and may also compromise the final product's quality [28,50,58,61]. Therefore, the challenge for the bioethanol industry is to find an eco-friendly, economical, easy to implement method that also does not result in the promotion of microbial resistance [58].

Among the natural strategies described in the literature, LABs produce lactic acid, butyric acid, acetic acid, gum, diacetyl, hydroxylated fatty acids, and reuterin affecting yeast development and performance [50]. In contrast, yeasts produce ethanol, succinic acid, and

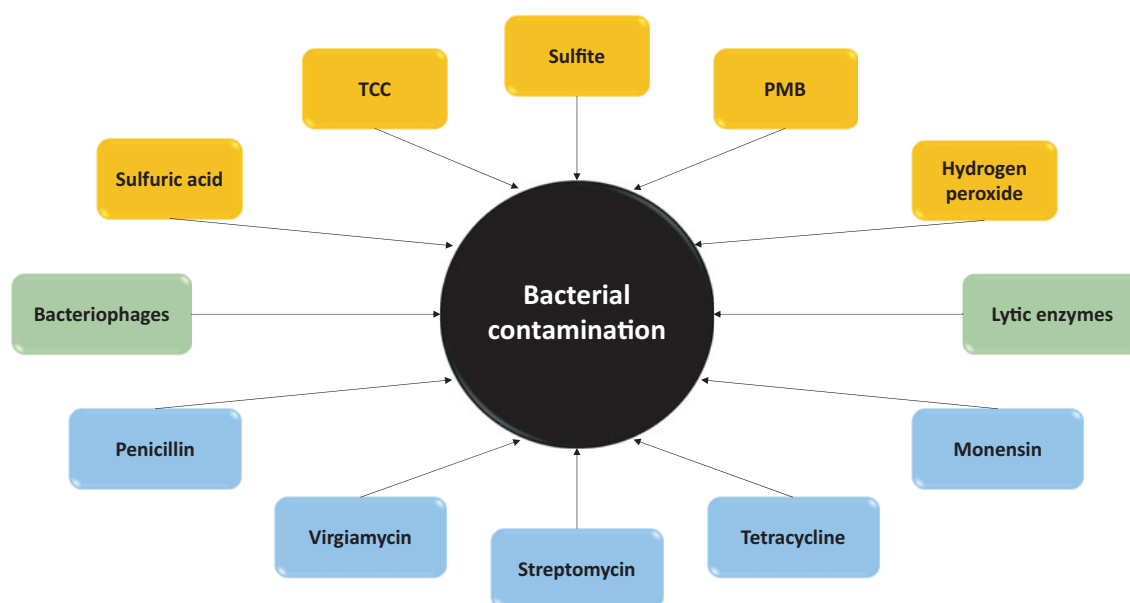


Figure 1. Some strategies proposed and used for microbial control in the bioethanol process. Yellow boxes indicate antiseptic compounds, blue boxes indicate antibiotics and green boxes indicate new strategies for bacterial control. TCC: 3,4,4'-Trichlorocarbaniide; PMB: Potassium metabisulfite.

peptides and are capable of affecting the growth of LAB [50]. An important enquiry results from the several mentioned survival strategies employed by bacteria and yeasts in order to withstand competition during fermentation. Would it be possible to affirm that these survival strategies are based on QS mechanisms?

Is there QS in fermentation vats?

Quorum sensing

The term QS was presented by Fuqua *et al.* [62] to refer to "intercellular communication (cell-to-cell). Initially, the term had to do with a mechanism used by bacteria to comprise environmental variations and, subsequently, apply specific strategies that permit them to adapt to environmental stress in time and space" [40,63]. However, the concept of cellular communication among bacterial populations was developed a few decades in advance. Since the early 1950s, researchers describe and recognize findings of genetic matters in *Streptococcus pneumoniae*, studies with bioluminescence in *Vibrio* and biologically active molecules (also called pheromones), even when not identified with analytical precision and using QS action. Besides, the term has been expanded to other groups of microorganisms, such as yeasts and filamentous fungi [37,64,65].

Quorum sensing is conducted through a communication system by small and diffuse molecules aiming at signalization that were firstly called "pheromone" [64]. Currently, they are called auto-inducer molecules (AI) or cell-to-cell signal molecules (CCSM) [40,41,66].

These molecules are produced within a specific growth stage under specific physiological conditions or environmental changes. These molecules also accumulate in extracellular environments, only acting after reaching a peak of concentration (*Quorum*) and being identified by specific receptors. The cellular responses are of genetic, physiological, metabolic, and structural levels [37,40,43,66].

Auto-inducers can be associated with: (i) improvements in the access to nutrients or environmental niches [67,68]; (ii) the optimization of cellular ability for morphological modification, such as the formation of biofilm, reproduction, and sporulation [66,68,69]. In addition, these auto-inducers are associated with: (iii) the generation of defense responses against eukaryotic hosts or competitive organisms, as an expression of virulence factors [67,68,70]; and (iv) adaptation mechanisms to survive in hostile environments that restrict growth, such as the production of bacteriocins and other molecules that favor a certain class of microorganisms [66,67,68,70]. Currently, three main categories of auto-inducers are known: (i) auto-inducer 1 (AI-1) N-acyl-homoserine lactones that modulates gram-negative bacteria; (ii) auto-inducer 2 (AI-2) furanosyl borate diester; and (iii) signal peptides [68,67,71–76]. Other molecules with auto-inducer properties are reported in the literature, including the higher alcohols produced by yeasts [77,78]; gamma-butyrolactone by *Streptomyces* [79]; palmitic acid methyl ester (3OH PAME) by *Ralstonia Solanacearum* [80]; 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) by *Pseudomonas aeruginosa*

[81]; cyclic dipeptides such as diketopiperazine and other molecules with signaling effects [77,82].

Studies indicate that auto-inducers such as peptides, AI-2 (furanosyl borate diester), and higher alcohols can be of great relevance to the fermentation environment since they are produced by microorganisms actively found in this process. AI-2 derives from the recycled S-adenosyl-L-homocysteine to homocysteine, being produced and universally recognized by Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. Auto-inducer peptides (AIP) are molecules that modulate the group of Gram-positive bacteria. Higher alcohols produced by yeasts and LAB seem also to be capable of modulating yeasts and other microorganisms from the fungi Kingdom [37,41,43,66,68,67,78,83–86].

Usually, auto-inducer secretions occur at a basal level by a group of carrying cells during bacterial growth, not being associated with primary metabolism. Molecules disseminate and accumulate in the environment until reaching the *quorum* level [43]. Peptides synthesized by Gram-positive bacteria are examples of these signalers that, after post-translational intracellular modifications, are transported to the external environment. Once the *quorum* level is reached, these peptides interact with membrane receptors that lead to changes in the gene expression of cells. The response represents a contextually appropriate genetic program, in which the signal capture occurs via kinases present in the cellular membrane that are capable of recognizing peptides and transferring this signal to the internal environment by several phosphorylations. This in turn results in the regulation of target gene expression [37,87,88].

In order to be considered a QS molecule, these metabolites need to be diffusive in the extracellular environment and as such their removal is possible by washing and centrifugation [32,66,89]. These metabolites can act by changing cell morphology and other phenotypic characteristics. They can also be produced in all growth temperature ranges [90]. Such molecules are called “auto-inducers” because sometimes genes that are associated with the process of synthesis and reaction trigger their particular expression, occurring without any external intervention [41,66,90,91].

Quorum sensing can also be named “diffusion sensing” or “compartment sensing”. These names are also used according to variance of the *quorum* rate to lead gene expression response. This deviation is associated with the production and extrusion rate of signaling molecules, as seen in populations in stationary phase. In other words, the response is most closely related to association between the environmental properties and molecular information than with population density itself, which could also be called “*quorum molecular*

sense” [40,43,92,93]. From this point of view, QS is better defined as a singular class of diffusion in which the response threshold is achieved, integrated with biotic and abiotic factors of a particular environment [93].

As a biological mechanism, modulation via QS offers heterogeneity of response even in isogenic populations found in homogeneous environments. In this case, this process is known as bi-stability of response (“bistability”) [94], being represented by the variation of response, which indicates the multifactorial complexity between QS signaling and response. Several regulatory networks are involved in this complex circuit, and even identical cells can process the same information in different levels. To study the QS, despite the fact that information and reception can represent processes that were already recognized, the interpretation and contextualization of information is a complex subject in which microbial knowledge is still remote from being totally understood [86,89,94].

Gaining knowledge on ecological interactions in microbial communities can be a powerful tool for the future of alcoholic fermentation. The inhibition of the QS (QQ) in bacteria that contaminate fermentation processes can be applied to work in the neutralization and stagnation of organic acids, toxins, and gums production [95–97]. In circumstances in which preventive strategies are not appropriate to safeguard the productivity and the efficiency of the process, the induction of inhibitory mechanisms via QS can be a feasible measure. In these cases, the direct production of biocides and antibiotics could be stimulated via QS, even if a small deviation in energy metabolism of bioethanol production is observed.

The subsequent QS systems addressed will focus on microbial communication mechanism in a generic way, but specially focused on mechanisms involving *Saccharomyces*, LAB, and *Bacillus*. This approach was selected considering the great importance of *Saccharomyces* during fermentations for bioethanol fuel production and the significant participation of LAB and *Bacillus* as microbial contaminants of the process.

QS in yeasts

The QS for prokaryote organisms is widely described in literature while few are available for Eukaryotes [43,78,98–100]. Great relevance is mainly given to studies on virulence and biofilm formation in *Candida albicans*, which are the causative agent of candidiasis [90,101,102]. The most common signalers described for this yeast are higher alcohols and some cyclic peptides named auto-antibiotics or auto-inducers because they

are capable of delaying or inhibiting the development of *C. albicans* [44,90,101–104].

Higher alcohols, also known as 'fusel oils', present several functions in the modulation sensing eukaryotic microorganisms such as yeasts and filamentous fungi [44]. The development of the germination tubes and apoptosis in *Aspergillus nidulans* and *Fusarium graminearum*, morphological changes in *Aspergillus niger*, bio-film formation and the regulation of protection against oxidative stress, amongst other roles in *Candida albicans*, are some of the responses stimulated by these alcohols [44,103,105,106].

The QS effects of these alcohols in *S. cerevisiae* are not new. Eddy (1955) reported the flocculation of yeasts used in the brewing industry in the presence of lower alcohols at concentrations higher than 0.5% (w/v) [107]. These effects were also observed with *n*-propyl, *n*-butyl, isobutyl, and 1,3-butylene glycol. This supports the theory that cellular metabolic products can also induce flocculation (named class 2 and 3), which can occur when the concentration of a particular metabolic product reaches a certain critical value [107,108].

Higher alcohols are originated during the Ehrlich pathway, which involves the catabolism of amino acids such as phenylalanine and tryptophan. In this process, amino acids undergo oxidative removal from the NH₂ group, forming the intermediate α -keto acid, which is converted into aldehyde by decarboxylation. The formation of higher alcohols occurs through aldehyde reduction, depending on the oxidative state of the cell [109,110].

The definition of fusel alcohol, also called fusel oil, or "potato oil", gives the idea of "horrible liquid" or liqueur, a term that came from German [111]. These compounds received this name because they were "less-desirable" co-products originating from alcoholic fermentation, which consists of a mixture of several higher alcohols. However, some of these alcohols may also present beneficial properties, such as the 2-phenylethanol, which contributes a pleasant rose aroma to wines, and tyrosol, described as an antioxidant and active in cardiovascular protection [109,110,112]. The 3-methyl-1-butanol (isoamyl alcohol), 2-methyl-1-propanol (isobutyl alcohol), 2-methyl-1-butanol, 2-phenyl-ethanol, and 3-(2-hydroxyethyl) indole (triptofol) are examples of aromatic alcohols.

The production of aromatic alcohols is favored during prolonged fermentations with low concentrations of nitrogen in an assimilable form, long time intervals between fermentation and distillation, and high cell density [111]. The synthesis of these QS molecules is self-regulated, i.e., the presence of these alcohols in the environment stimulates specific genes that transcribe

enzymes required for the synthesis of alcohol, resulting in a positive *feedback loop* [84,105,111].

The main *S. cerevisiae* QS-specific-species responses, stimulated by higher alcohols, are: (i) stimulus to individual (unicellular) morphological transition to a filamentous form in diploid cells; (ii) invasive growth of haploid cells; (iii) growth inhibition; (iv) stationary phase induction [44,105,110,112–114]. As shown in Figure 2, these responses may hinder centrifugation operations and decrease the fermentation rate.

The induction of the development of filaments from unicellular individuals takes place through cell elongation, resulting in mycelial formation. This effect is due to the action of higher alcohols such as tryptophol and phenylethanol derived from tryptophan and phenylalanine, respectively. These higher alcohols are active at concentrations above 20 μ M and when tryptophan and phenylalanine are concomitantly present in the environment, the development of filaments is enhanced [115,116]. In summary, the response to cellular elongation occurs in the modulation of the gene *Flo11p*, producing glycosylphosphatidylinositol (GPI), a flocculin protein attached to cell surface that is essential for the development of filaments. This mechanism takes place under nutritional stress, especially nitrogen. Therefore, it is believed that mycelial formation corresponds to the increase in the foraging area to optimize the absorption of nutrients [78,105,106]. The flocculation of yeasts can be caused by the action of flocculins and by filamentous growth stimulated by these alcohols. In fact, this has already been demonstrated for *n*-propyl alcohol, *n*-butyl, isobutyl, and 1,3-butylene glycol to the level of 0.5% in the medium [107,108].

The invasive growth in haploid cells is stimulated by phenylethanol that acts synergistically with tryptophol [105]. This effect may not be relevant for alcoholic fermentation, despite the belief that this mechanism eases access to nutrients to the inside of fleshy fruits and similar environments [117]. This mechanism may be involved in the epiphytic presence of yeasts with sugar cane stalks, enabling the introduction of wild yeasts into the sugar cane must.

Phenylethanol, tyrosol, and tryptophol are three aromatic alcohols able of modifying the response to transcription factors (Cat8p and Mig1p) related to enzymes operating because of a glucose deficiency [84,106]. The increase or decrease of ammonium ions stimulates or inhibits the production of higher alcohols such as tryptophol and phenylethanol. These findings (regarding the concentration of carbon and nitrogen sources in the substrate) supports the theory on the development of filaments in *S. cerevisiae* in response to nutritional constraints. The expression of Flo surface glycoprotein

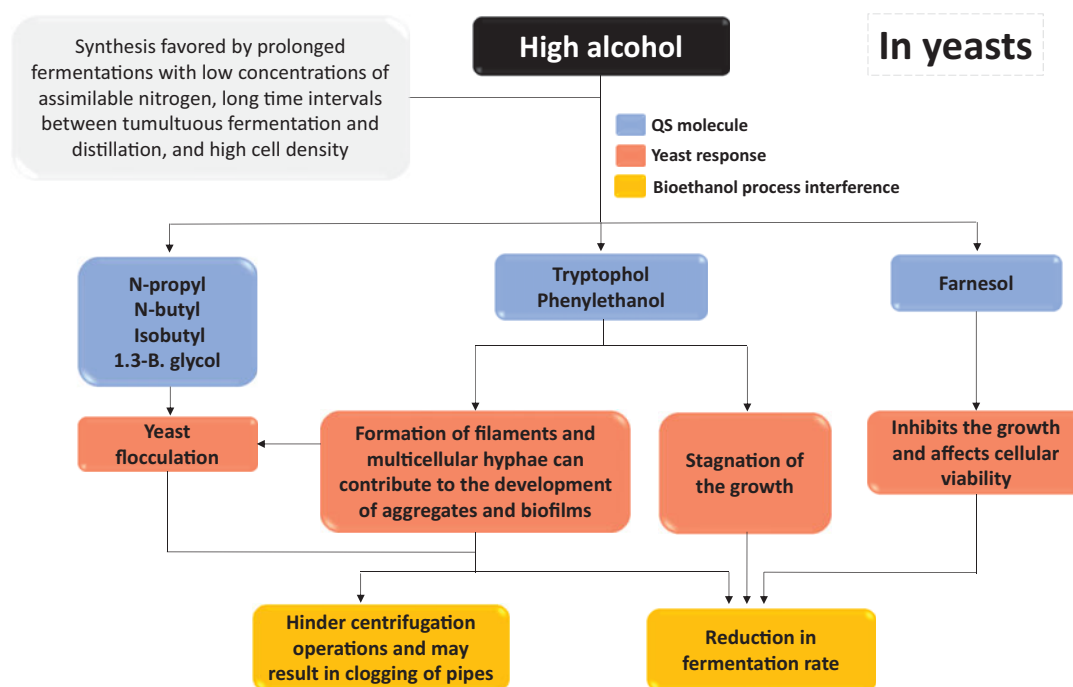


Figure 2. Diagram of high alcohol (fusel) like QS molecule in yeast and the response in bioethanol production environment. In blue different high alcohols are shown, in red the quorum sensing response in yeast, and in yellow the interference response in bioethanol process.

during formation of filaments and formation of multicellular hyphae can contribute to the development of aggregates and biofilms. Finally, these events will further facilitate *S. cerevisiae* access to nutrients [84,105,118].

Farnesol, in concentrations above 25 μM , completely inhibits the growth in *S. cerevisiae* without compromising cellular viability [44]. This alcohol acts by suppressing cell cycle genes that encode the histone acetyltransferase (HAT2) and DNA ligase (CDC9). Metabolically, farnesol is linked to the decrease of the diacylglycerol levels inside the cell, inactivating the protein kinase C that regulates cell proliferation and growth, being related to the stagnation of the G1 phase of the cell cycle of yeasts. Furthermore, this alcohol induces the formation of oxygen reactive species (ROS) by inhibiting the signaling mechanism of phosphatidylinositol type, which also inhibits the mitochondrial electron transport chain [77,92,113,118].

Quorum sensing stimulated by aromatic alcohols induces stationary phase in *Saccharomyces*. In this yeast, more than half of up-regulated genes by tryptophol and phenylethanol, are predominantly expressed at stationary phase. Such information suggests that these alcohols contribute to the stagnation of the growth curve through the physiological modulation of cells [78,105]. Nonetheless, researchers are still not sure if aromatic alcohols are capable of inducing the stationary phase. Wuster and Babu [84] pointed out that there is

an association amid 53 to 64% of transcribed genes in the stationary phase and those induced by QS. Regardless of the overlap observed, the responses were found to be distinct.

In addition to the synthesis of aromatic alcohol by yeasts, cell release of small peptides (2–10 KDa) with antimicrobial action can be a mechanism triggered by QS. These small molecules present expressive concentrations and activities at the end of the exponential phase of fermentation. Antimicrobial peptides (AMPs) synthesized by *S. cerevisiae* can act differently depending on the yeasts and bacteria, suggesting the existence of a species-specific effect. The antagonistic activity of these molecules can be favored by cell–cell contact [32]. These molecules secreted into the environment change intracellular pH and the permeability of the membrane, causing stagnation in cell growth or the loss of cell viability [32,33]. The identification of these small peptides revealed they originate from a protein named glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), an enzyme that acts on the glycolytic pathway [31–33]. For fermentation, this process supports the survival and persistence of *S. cerevisiae* strains during natural succession [16,25]. The high concentration of yeasts (*quorum*), and the depletion of sugars in the environment at the end of the exponential phase (*sensing*) can favor the synthesis of these small peptides through lysis by the GAPDH. Hypothetically, this mechanism can result from the feedback caused by glucose

reduction. In response, nutritional depletion stimulates genetic changes to maintain homeostasis. In this context, enzymes of glucose metabolism stored inside the cells can serve as a source of energy and therefore, be a target of proteolysis, generating AMPs. As a result, only strains able to express intracellular proteases capable of cleaving proteins (such as GAPDH) and producing bioactive peptides will persist during fermentation and further dominate the microbiological succession.

QS in Gram positive bacteria

AIPs may contain 5–34 linear, cyclic amino acids [37,67,119]. AIPs are structurally modified during their synthesis and are processed from a precursor protein. The AIPs are reported in LAB and *Bacillus* [36,37,43,68,69,119,120] and are known to expressively act in intra-specific communication in Gram-positive bacteria. Therefore, because of the countless importance of Gram-positive bacteria as contaminants of feedstock fermentation, this topic will address the class of AIP and their potential impact in the production of bioethanol. The signal peptides can act in competence and gene transformation processes, and in the regulation of antibiotic and lantibiotic biosynthesis, sporulation, and biofilm formation [36,37,43,67,72,83,119–121].

There are three different families of AIPs classified according to their chemical structures. The first one is the class of lantibiotic oligopeptides molecules, characterized by the existence of lanthionine mediated by the thioether macrocyclic function and dehydrated amino acids, as found in the nisin produced by *Lactococcus lactis*. The second family comprises modified peptides with thiolactone hydrochloride, such as staphylococcal AIP-1. These peptides are produced in a similar manner to lantibiotics, regardless of the fact that these peptides present cyclical thiolactone or cyclical lactone in their structure. The third family is typical in *Bacillus*, which presents the tryptophan isoprenylating residue probably containing the ComQ protein. This group of inducers are involved in the development of competence in some species of *Bacillus* [43,69,82,86,120].

The process of AIP synthesis starts inside the bacterial cell. Molecules are primarily synthesized in a precursor protein that is enzymatically modified and cleaved. As a result, these steps generate the processed AIP. This small signaling molecule is usually transported to the outside of cells via ABC transport protein complexes (ATP-binding cassette) [120]. The signaling can occur both in extracellular and intracellular environments. When the small signaling molecule reaches the threshold in the extracellular environment, the signal is detected. The detection occurs by interaction with the

transmembrane kinase protein with a two component signaling system. The response occurs with autophosphorylation of residues conserved in histidine (H) of kinase protein that activates the phosphorylation cascade. This cascade finishes in response regulatory protein (RRP). The phosphorylation of response regulator protein allows activities on the DNA and the expression of target genes controlled by QS. In intracellular environment, when the threshold is reached, the peptide is transported to the bacterial cell through an oligopeptide transport system (OTS). Once inside the cell, peptic molecules activate transcription regulators or inhibit the action of aspartyl-phosphate phosphatase (APP). APP modifies the state of phosphorylation of regulators modulating the expression of target genes [76,120,122].

In the transformation process, the bacterial cells is capable to capture and assemble the intact DNA from the environment into their genetic material. However, this phenomenon only occurs when the bacterial cell produces competence factors (proteins that confer the ability for them to incorporate exogenous DNA) [123]. Quorum sensing control can allow microorganisms to assimilate the exogenous genetic material only under favorable conditions, with the highest probability of competence observed in the presence of heterologous DNA. This mechanism is called competence stimulated by peptides, which is a strategy that also promotes the acquisition of a genetic material repository that can be exploited to repair chromosomal damage and mutations [37,72].

The fed-batch fermentation process is widespread and established in several counties, such as in Brazil [7]. The several fermentation cycles that follow this model favor the establishment of transitional microbial communities in the process [25]. Considering the intense population dynamics, it is clear that the acquisition of genes via QS is a very clever evolutionary strategy for both transient and persistent species such as those present in biofilms. In this case, besides promoting the preservation of species under adverse conditions, this transformation leads to a greater physiological diversity that hampers the implementation of effective strategies to control microbial contaminants and to reduce their negative impacts. Sporulation also promotes the maintenance and resistance of bacteria in systems modulated by QS [37].

In some species of *Bacillus*, when under unfavorable environments such as nutritional depletion, the bacterial cell undergoes asymmetric division, resulting in a resistant and dormant spore [37]. This phenomenon occurs via a peptide called competence and sporulation factor (CSF). The differentiation between transformation and sporulation consists in the intracellular

concentration of CSF. At low concentrations, this peptide stimulates competence, while in high concentrations the transformation is inhibited, inducing sporulation [83,123,124]. It is possible to support that the adaptive strategy driven by CSF initially prioritizes the survival of the species by searching in the environment for favorable genes and incorporating them by transformation. When this strategy does not offer enough contribution to the preservation of life, the accumulation of CSF stimulates sporulation.

The formation of biofilms, as stimulated by QS, can become a chronic problem for sugar and bioethanol production plants, because it can act as a reservoir that continuously reintroduces microbial contaminants [125–127]. Biofilms can be described as organized communities of microbial cells surrounded by a self-produced polymeric matrix made of exopolysaccharides generally adhered to an inert surface. This complex structure with defined architecture allows bacterial communities to survive in sessile and protected environments [41,128,129].

A multivariate complex induced by the interaction between environmental and genetic factors regulates the establishment and development of biofilms. The synthesis of biofilms initially occurs by secretion and reception of QS molecules, production of extracellular polymeric matrix, colonization, inert surface fixation, and maturation. The QS system, used by communities present in biofilms, can influence the quality and metabolic properties, ensuring robust and stable maintenance of functionalities needed for the survival of the microbial population present [125,130,131].

Despite being a protected system, biofilm interferes in the success of QS mechanisms. For Gram-positive bacteria, the production of active signal peptides represents a process of high energetic cost [96]. In biofilms, production, stability, distribution, and efficiency of signal peptides can be influenced by several chemical, physical, and nutritional factors. Besides, these small molecules can have limited diffusion or present high interaction with polysaccharides, proteins, among other components found in the matrix [96,132].

Even with these limitations, the presence and the activity of Gram-positive bacteria is common in biofilms. *L. plantarum* is a biofilm-producing species commonly found in studies about the contaminants in feedstock fermentations [21,129,133]. The two-component regulator named *lamD* (*Lactobacillus agr-like module D*) is responsible for encoding the thiolactone cyclic AIP associated with the process of adherence and biofilm formation by this bacterium. The cells that are adhered to the biofilm present higher resistance to acids and bioethanol, comprising an environment of bacterial persistence

considering the conditions in the fermentation process [122,134]. In a QS-driven process, bacteria can form biofilms in pipes resulting in the continuous contamination of the must, which may also lead to problems in cleaning and sanitization of fermentation vats and clogging of pipes. This in turn certainly results in increases in costs of the process [122,125,131,134].

In bacterial contaminants, bacteria also synthesize peptides that exhibit remarkable bactericidal activities [86,135,136]. These are potent and broad-spectrum peptides, consisting of different sizes, compositions, and different amino acid sequences. In addition, secretion and processing mechanisms, post-translational modifications, and antimicrobial activity can also be different. These peptides can present biological activities individually or in combination with other peptides. They can also show specificities to a certain group of microorganisms, a broad spectrum of action or even present antimicrobial activities against closed-related species [86,119,137].

From the evolutionary point of view, the QS confers benefits by stimulating the joint response in a microbial community. In the case of antimicrobial peptides, the positive effect only occurs when the extracellular product exceeds a specific concentration, i.e., the bactericidal activity is only observed under synchronous activity of a group of cells [43,67]. Bacteriocins act in the formation of pores in the membrane of target cells and the dissipation of protons, ATP, loss of nutrients and metabolites result in microbial inactivation. To form a pore, bacteriocins interact electrostatically with anionic lipids from the target membrane, forming trans-membrane pores from peptides [36,67,120,137].

Antimicrobial peptides can be organized into three classes [137]. Class I bacteriocins are peptides called lantibiotics. Lantibiotics are small molecules that are stable when exposed to heat and composed of one or two peptides. They feature extensive post-translational changes, forming lanthionine. The modification occurs with the cyclization of the peptide together with the dehydration of cysteine from a reaction with serine or threonine residues. This reaction results in a molecule of thioether containing amino acids (known as lanthionine). Bacteriocins of class I are divided into: type A (elongated molecules) and type B (globular molecules) [137,138]. In class II, there are linear and unmodified peptide bacteriocins that are also small and stable at heat molecules. The following bacteriocins are also included in this class: active bacteriocins against *Listeria* called 'pediocin-like bacteriocins' (class IIa), two-peptides bacteriocins (class IIb), circular bacteriocins, and others (class IIc) [137,139]. Classes I and II are the most prevalent among LAB. Class III bacteriocins are large

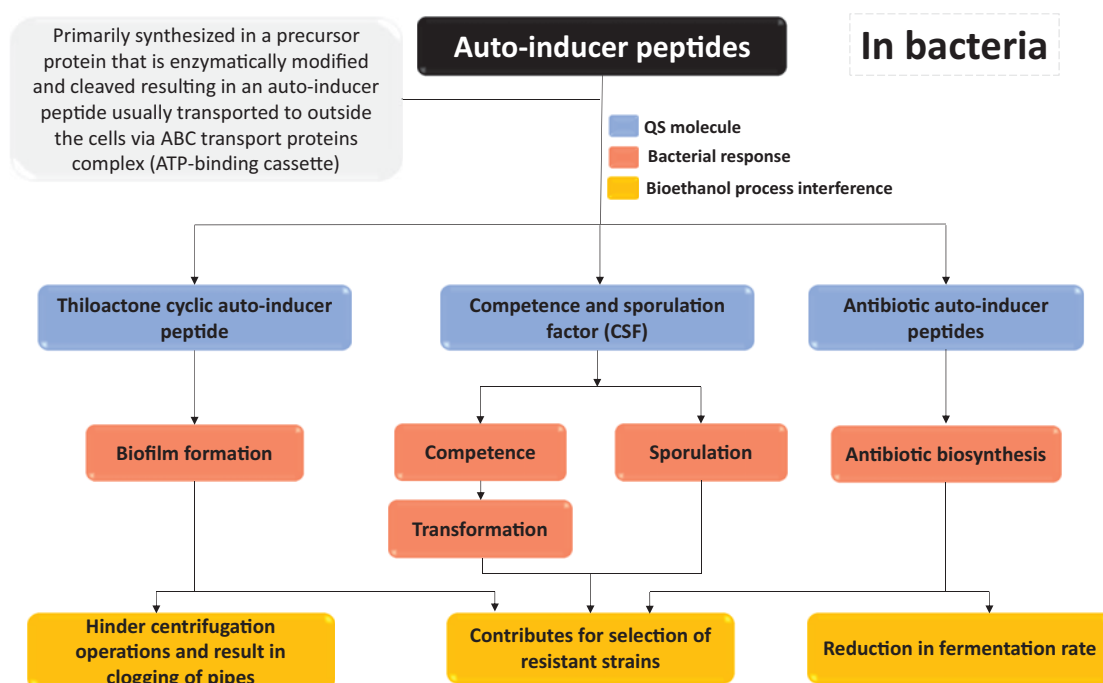


Figure 3. Diagram of AIP's in bacteria, some QS responses and their implication in bioethanol production environment. In blue different AIPs are shown, in red the quorum sensing response, and in yellow the interference response on bioethanol process.

and thermolabile molecules. They are proteins of lytic action, such as hydrolase [36,43,67,72,137,139,140].

Nisin is a bacteriocin of class I most known for presenting a wide spectrum of activities and effective applications in the food industry [141]. The biosynthesis of nisin is an exemplary case of QS in LAB. The transcript production can be reestablished with the addition of small quantities of nisin to the culture environment during growth [36,82]. This is a self-regulated process, in which this special case of QS is consisted of NisR regulator response and sensor histidine kinase NisK that activates the transcription of target genes [36,82,120]. Besides nisin, lactine F, bacteriocin S, sakacine, and other bacteriocins are produced by *Lactobacillus* [142–144]. The addition of bacteriocins in fermentation experiments showed a decrease in the population of lactobacilli (with consequent decrease of lactic acid production), and a significant increase in bioethanol production [145]. When assessing the effect of microbial interactions during feedstock fermentation for bioethanol production and the impossibility of working in sterile conditions, molecular control seems to be an interesting alternative. The expression of bacteriocins with effective action on LAB during fermentation can be very important for the bioethanol production plants. The retroactive effect of the production of bacteriocins (a molecule stimulating its own synthesis) may pave the way for synthetic biology to develop new microbial strategies to control microbial contaminants. Antibiotic and chemical strategies favor the increase of process

costs and does not completely solve the problem, as it contributes to the development of resistant contaminants [51,58]. Through a QS approach, strategies may be developed to use strains that present modulation sensing aiming at maintaining microbial contaminants in the fermentation vats at minimal population levels [50]. This would favor the ecological balance necessary needed for increasing the yield in the production of bioethanol through the use of molecular compounds produced by the endogenous microbiota present in the fermentation vats.

Figure 3 presents a diagram of AIP's in bacteria, some QS responses and their implication in bioethanol production environment.

Concluding remarks and further research

Because of the importance of bioethanol in the energy matrix and in the world's scene on biofuels and nature conservation, any improvement in the fermentation process will result in large-chain benefits. Thus, scientific knowledge on microbial interactions and their technological impact is still a very significant niche to be explored.

In order to take effect, scientific and industrial knowledge should be lined up. Through laboratory-scale fermentations it is possible to clarify and assess several parameters of interest to the industry (kinetics, yield, productivity). However, only detailed and insightful studies on the microbial interactions and molecular

mechanisms using tools known as “omics” together with computational intervention will allow the final establishment of the negative consequences of microbial contaminants on the bioethanol production process. This integration among technical, environmental and economic factors will shed light on the relevance of QS studies as important industrial tools.

Hypothetically, QS can be a beneficial tool for maintaining the ecological balance present in fermentation vats for the production of bioethanol through: (i) metabolism deviation of aromatic alcohols for bioethanol synthesis; (ii) induction for the synthesis of antimicrobial compounds by certain microbial groups in stages of processing in which high prevalence of contaminants is observed; (iii) the production of ethanol and the reduction of biomass synthesis (maintenance of stationary phase); and (iv) development of QQ strategies as an inhibitory mechanism for the formation of spores and biofilms during the process.

In this context, synthetic biology will be of great importance, by modulating the control of the genetic mechanisms over extracellular environmental dynamics. This scientific field will be capable of providing microorganisms and mechanisms of particular relevance to beyond the biofuels, food, chemicals, and pharmaceuticals industries.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq) (Grant #302763/2014–7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support of this project.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors acknowledge the financial support of 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq) (Grant #302763/2014–7) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support of this project.

References

- [1] Carere CR, Sparling R, Cicek N, et al. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. *Int J Mol Sci*. 2008;9:1342–1360.
- [2] Rajee O, Fabian KQS, Shen LJ, et al. Potential and technological advancement of biofuels. *Int J Adv Sci Tech Res*. 2014;4:12–29.
- [3] Sims REH, Mabey W, Saddler JN, et al. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresour Technol*. 2010;101:1570–1580.
- [4] RFA. Global Ethanol Production [Internet]. Renewable fuels association: alternative fuels data center; 2015. Available from: <http://www.afdc.energy.gov/data/10331>
- [5] RFA. World fuel ethanol production [Internet]. Renewable Fuels Association; Alternative Fuels Data Center; 2014. Available from: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/world/>
- [6] UNICA. Produção brasileira de álcool anidro e hidratado. Unica data. União da Indústria de cana-de-açúcar; 2016. Available from: <http://www.unica.com.br>
- [7] Amorim HV, Leão RM. Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Industriais F-ST, editor. Piracicaba (BR): Fermentec; 2005. p. 448.
- [8] Andrietta GS, Steckelberg C, Andrietta R. Bioetanol: Brasil, 30 anos na vanguarda. *Construindo a História Dos Prod Nat*. 2006;7:1–16.
- [9] Basso LC, De Amorim HV, De Oliveira AJ, et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2008;8:1155–1163.
- [10] Vianna CR, Silva CLC, Neves MJ, et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: Trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol*. 2008;93:205–217.
- [11] de Freitas LC, Kaneko S. Ethanol demand under the flex-fuel technology regime in Brazil. *Energy Econ*. 2011;33:1146–1154.
- [12] Andrietta MGS, Andrietta SR, Steckelberg C, et al. Bioethanol: Brazil, 30 years of Proalcool. *Int Sugar J*. 2007;109:195–200.
- [13] Basso L, Basso T, Rocha S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: Bernardes MAS, editor. *Biofuel production recent development prospects*. Vol. 1530. Rijeka (Croatia): InTech; 2011. p. 85–100.
- [14] Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, et al. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:979–991.
- [15] Liberal ATS, Basílio ACM, Resende AM, et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol*. 2007;102:538–547.
- [16] Filho EA, da S, de Melo HF, Antunes DF, et al. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005;32:481–486.
- [17] Basílio ACM, de Araújo PRL, de Moraes JOF, et al. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol*. 2008;56:322–326.
- [18] Lucena BT. Genetic diversity of lactic bacteria present in alcohol fuel distilleries in the states of Paraíba and Pernambuco [thesis]. Federal University of Pernambuco; 2010.

- [19] Skinner KA, Leathers TD. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004;31:401–408.
- [20] Lacerda ICA, Gomes FCO, Borelli BM, et al. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16s rRNA gene sequence analysis. *Braz J Microbiol*. 2011;42:650–657.
- [21] Gallo CR. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica (Determination of the bacterial microbiota of must and alcoholic fermentation vats) [thesis]. State University of Campinas; 1989.
- [22] Mäkanjuola DB, Tymon A, Springham DG. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme Microb Technol*. 1992;14:350–357.
- [23] Narendranath NV. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: Ingledew WM, Kelsall DR, Austin GD, Kluhspies C, editors. *The alcohol textbook*. 4th ed. Nottingham (UK): Nottingham University Press; 2003. p. 287–298.
- [24] Bayrock DP, Ingledew WM. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2004;31:362–368.
- [25] Tosin C, Andrietta SR, Andrietta M, d GS. Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *J Inst Brew*. 2015;121:343–348.
- [26] Bayrock D, Ingledew WM. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2001;27:39–45.
- [27] Paramithiotis S, Gioulatos S, Tsakalidou E, et al. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem*. 2006;41:2429–2433.
- [28] Beckner M, Ivey ML, Phister TG. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol*. 2011;53:387–394.
- [29] Sue T, Obolonkin V, Griffiths H, et al. An exometabolomics approach to monitoring microbial contamination in microalgal fermentation processes by using metabolic footprint analysis. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:7605–7610.
- [30] Albergaria H, Arneborg N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:2035–2046.
- [31] Branco P, Francisco D, Chambon C, et al. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:843–853.
- [32] Kemsawasd V, Branco P, Almeida MG, et al. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachanea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2015;362:1–8.
- [33] Branco P, Viana T, Albergaria H, et al. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *Int J Food Microbiol*. 2015;205:112–118.
- [34] Narendranath NV, Hynes SH, Thomas KC, et al. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63:4158–4163.
- [35] Dorta C, Oliva-Neto P, De-Abreu-Neto MS, et al. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World J Microbiol Biotechnol*. 2006;22:177–182.
- [36] Kuipers OP, De Ruyter PGGA, Kleerebezem M, et al. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol*. 1998;64:15–21.
- [37] Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:165–199.
- [38] Costa VM. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(–) e L(+) do ácido láctico (Metabolics profile excreted by *Lactobacillus* isolated from industrial ethanol production process concerning D(–) and L(+) Lactic Acid optical isomers) [thesis]. ESALQ-University of São Paulo; 2006.
- [39] Di Cagno R, De Angelis M, Calasso M, et al. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *J Proteomics*. 2011;74:19–34.
- [40] Winzer K, Hardie KR, Williams P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:216–222.
- [41] Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell*. 2006;125:237–246.
- [42] Camilli A, Bassler BL. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. 2006;311:1113–1116.
- [43] Williams P, Winzer K, Chan WC, et al. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007;362:1119–1134.
- [44] Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi—a review. *Med Mycol*. 2012;50:337–345.
- [45] Zupan J, Avbelj M, Butinar B, et al. Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *J Agric Food Chem*. 2013;61:2496–2505.
- [46] Fleet G. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 2003;86:11–22.
- [47] Ivey M, Massel M, Phister TG. Microbial interactions in food fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:141–162.
- [48] Ruth L. Bio or bust? The economic and ecological cost of biofuels. *EMBO Rep*. 2008;9:130–133.
- [49] Dias MODS, Maciel Filho R, Mantelatto PE, et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environ Dev*. 2015;1:17.
- [50] Brexó RP, Sant'Ana AS. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renew Sustain Energy Rev*. 2017;73:423–434.

- [51] Borzani W, Schmidell W, Lima U, de A, et al. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo (BR): Blucher; 2001. p. 593.
- [52] Facciotti MCR. Fermentação Contínua. In: Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W, editors. *Biotecnologia Industrial II: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher; 2001. p. 223–46.
- [53] de Souza Liberal AT, da Silva Filho EA, de Moraes JOF, et al. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett Appl Microbiol*. 2005;40:19–23.
- [54] Ngang JJE, Letourneau F, Villa P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1989;31:125–128.
- [55] Gallo CR, Canhos VP. Efeitos do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana da fermentação alcoólica. *stab*. 1991;29:35–37.
- [56] Alcarde VE. Avaliação de parametros que afetam a floculação de leveduras e bacterias isoladas de processos industriais de fermentação alcoolica (Evaluation of parameters affecting yeasts and bacteria flocculation isolated from industrial alcohol fermentation process) [thesis]. State University of Campinas; 2001.
- [57] Camolez MA, Mutton MJR. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. *stab*. 2005;23:6–9.
- [58] Muthaiyan A, Limayem A, Ricke SC. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Prog Energy Combust Sci*. 2011;37:351–370.
- [59] Worley-Morse TO, Deshusses MA, Gunsch CK. Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages. *Biotechnol Bioeng*. 2015;112:1544–1553.
- [60] Roach DR, Khatibi P. a, Bischoff KM, et al. Bacteriophage-encoded lytic enzymes control growth of contaminating *Lactobacillus* found in fuel ethanol fermentations. *Biotechnol Biofuels*. 2013;6:20.
- [61] Rich JO, Leathers TD, Bischoff KM, et al. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresour Technol*. 2015;196:347–354.
- [62] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*. 1994;176:269–275.
- [63] Hense BA, Kuttler C, Müller J, et al. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5:230–239.
- [64] Karlson P, Lüscher M. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature*. 1959;183:55–56.
- [65] Even-Tov E, Omer Bendori S, Valastyan J, et al. Social evolution selects for redundancy in bacterial quorum sensing. *PLoS Biol*. 2016;14:e1002386.
- [66] Bassler BL. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*. 2002;109:421–424.
- [67] Waters CM, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:319–346.
- [68] Skandamis PN, Nychas G-JE. Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:5473–5482.
- [69] Henke JM, Bassler BL. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol*. 2004;14:648–656.
- [70] Taga ME, Bassler BL. Chemical communication among bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(Suppl):14549–14554.
- [71] Lade H, Paul D, Kweon JH. N-Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–25.
- [72] Lyon GJ, Novick RP. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*. 2004;25:1389–1403.
- [73] Lyon GJ, Muir TW. Chemical signaling among bacteria and its inhibition. *Chem Biol*. 2003;10:1007–1021.
- [74] Smith D, Wang J-H, Swatton JE, et al. Variations on a theme: diverse N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. *Sci Prog*. 2006;89:167–211.
- [75] Antunes LCM, Ferreira RBR. Intercellular communication in bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2009;35:69–80.
- [76] Reading NC, Torres AG, Kendall MM, et al. A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol*. 2007;189:2468–2476.
- [77] Hogan DA. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*. 2006;5:613–619.
- [78] Sprague GF, Winans SC. Eukaryotes learn how to count: quorum sensing by yeast. *Genes Dev*. 2006;20:1045–1049.
- [79] Rumjanek NG, Fonseca MCC da, Xavier GR. Quorum sensing em sistemas agrícolas: Comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. *Rev Biotecnol Cienc e Desenvolv*. 2004;33:35–50.
- [80] Flavier AB, Ganova-Raeva LM, Schell MA, et al. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxy-palmitic acid methyl ester. *J Bacteriol*. 1997;179:7089–7097.
- [81] Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem Biol*. 2007;14:87–96.
- [82] Sturme MHJ, Kleerebezem M, Nakayama J, et al. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;81:233–243.
- [83] Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. 1999;2:582–587.
- [84] Wuster A, Babu MM. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Mol BioSyst*. 2009;6:134–141.

- [85] Gori K, Knudsen PB, Nielsen KF, et al. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Res. 2011;11:643–652.
- [86] Monnet V, Juillard V, Gardan R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. Crit Rev Microbiol. 2014;42:339–351.
- [87] Reading NC, Sperandio V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2006;254:1–11.
- [88] Withers H, Swift S, Williams P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. Curr Opin Microbiol. 2001;4:186–193.
- [89] Long T, Tu KC, Wang Y, et al. Quantifying the integration of quorum-sensing signals with single-cell resolution. PLoS Biol. 2009;7:e1000068.
- [90] Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol. 2001;67:2982–2992.
- [91] Keller L, Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nat Rev Microbiol. 2006;4:249–258.
- [92] Ivey M. Transcriptome analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under bacterial contamination and lactic acid stress during ethanolic fermentation [Thesis]. New York State University; 2010.
- [93] Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? Trends Microbiol. 2002;10:365–370.
- [94] Weber M, Buceta J. Dynamics of the quorum sensing switch: stochastic and non-stationary effects. BMC Syst Biol. 2013;7:6.
- [95] Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: an overview. Biotechnol Adv. 2013;31:224–245.
- [96] Du Y, Li T, Wan Y, et al. Signal molecule-dependent quorum-sensing and quorum-quenching enzymes in bacteria. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2014;24:117–132.
- [97] Fetzner S. Quorum quenching enzymes. J Biotechnol. 2015;201:2–14.
- [98] Bassler BL, Miller MB. Quorum sensing. The prokaryotes. Heidelberg: Springer; 2013. p. 495–509.
- [99] Williams TCC, Aversch NJHJH, Winter G, et al. Quorum-sensing linked RNA interference for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab Eng. 2015;29:124–134.
- [100] Tocheva EI, Ortega DR, Jensen GJ. Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. Nat Rev Microbiol. 2016;14:535–542.
- [101] Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2009;299:1–8.
- [102] Alem MAS, Oteef MDY, Flowers TH, et al. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. Eukaryot Cell. 2006;5:1770–1779.
- [103] Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, et al. Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. Science. 1969;163:192–194.
- [104] Madhani HD. Quorum sensing in fungi: Q&A. PLoS Pathog. 2011;7:10–12.
- [105] Chen H, Fink GR. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. Genes Dev. 2006;20:1150–1161.
- [106] Cottier F, Mühlischlegel FA. Communication in fungi. Int J Microbiol. 2012;2012:1–9.
- [107] Eddy AA. Flocculation characteristics of yeasts: iii. General role of flocculating agents and special characteristics of a yeast flocculated by alcohol. J Inst Brew. 1955;61:318–320.
- [108] Gilliland RB. The flocculation characteristics of brewing yeasts during fermentation. Proceedings of the European Brewery Convention; Brighton, England; 1951. p. 35–58.
- [109] Hazelwood LA, Daran J-M, van Maris AJA, et al. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Appl Environ Microbiol. 2008;74:2259–2266.
- [110] Mas A, Guillaumon JM, Torija MJ, et al. Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. Biomed Res Int. 2014;2014:1–7.
- [111] Patil AG, Koolwal SM, Butala HD. Fusel oil: Composition, removal and potential utilization. Int Sugar J. 2009;104:51–58.
- [112] Dickinson JR. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae*-a review. Folia Microbiol (Praha). 2008;53:3–14.
- [113] Machida K, Tanaka T, Fujita K, et al. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Bacteriol. 1998;180:4460–4465.
- [114] Machida K, Tanaka T, Yano Y, et al. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. Microbiology. 1999;145:293–299.
- [115] Lorenz MC, Cutler NS, Heitman J. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell. 2000;11:183–199.
- [116] Ceccato-Antonini SR, Sudbery PE. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. Braz J Microbiol. 2004;35:173–181.
- [117] Sidari R, Caridi A, Howell KS. Wild *Saccharomyces cerevisiae* strains display biofilm-like morphology in contact with polyphenols from grapes and wine. Int J Food Microbiol. 2014;189:146–152.
- [118] Hogan DA. Quorum sensing: alcohols in a social situation. Curr Biol. 2006;16:R457–R458.
- [119] Aggarwal C, Federle MJ. Peptide pheromones and their protein receptors: cellular signaling in Gram-positive bacteria. In: Molecular Life Sciences. New York: Springer; 2014. p. 1–14.
- [120] Kleerebezem M, Quadri LE, Kuipers OP, et al. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Mol Microbiol. 1997;24:895–904.
- [121] Di Cagno R, De Angelis M, Calasso M, et al. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation

- with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *Proteomics*. 2010;10:2175–2190.
- [122] Sturme MHJ, Nakayama J, Molenaar D, et al. An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. *J Bacteriol*. 2005;187:5224–5235.
- [123] Turgay K, Hahn J, Burghoorn J, et al. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J*. 1998;17:6730–6738.
- [124] Lazazzera BA, Grossman AD. The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol*. 1998;6:288–294.
- [125] Skinner-Nemec KA, Nichols NN, Leathers TD. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Biotechnol Lett*. 2007;29:379–383.
- [126] Bischoff KM, Liu S, Leathers TD, et al. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*. 2009;103:117–122.
- [127] Leathers TD, Bischoff KM, Rich JO, et al. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresour Technol*. 2014;169:45–51.
- [128] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318–1322.
- [129] Campana FB. Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes (Temporal and spatial monitoring of bacterial contamination [thesis]. ESALQ-University of São Paulo-USP; 2012.
- [130] Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? *Curr Opin Microbiol*. 2002;5:254–258.
- [131] Kubota H, Senda S, Nomura N, et al. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng*. 2008;106:381–386.
- [132] Li Y-H, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)*. 2012;12:2519–2538.
- [133] Neto PO. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada (Influence of contamination by lactic acid bacteria in the alcohol fermentation of the fed-batch process) [thesis]. State University of Campinas-UNICAMP; 1990.
- [134] Sturme MHJ, Francke C, Siezen RJ, et al. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2007;153:3939–3947.
- [135] Magnusson J, Schnürer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:1–5.
- [136] Turovskiy Y, Kashtanov D, Paskhover B, Chikindas ML. Quorum sensing: fact, fiction, and everything in between. *Adv Appl Microbiol*. 2007;62:191–234.
- [137] Eijssink VGH, Axelsson L, Diep DB, et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002;81:639–654.
- [138] Willey JM. Donk WAVD. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:477–501.
- [139] Vuyst L, De, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2007;13:194–199.
- [140] Camu N, De Winter T, Verbrugghe K, et al. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73:1809–1824.
- [141] Krivorotova T, Cirkovas A, Maciulyte S, et al. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocoll*. 2016;54:49–56.
- [142] Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia*. 2012;2:50–56.
- [143] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 2012;11:95–105.
- [144] Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. *Food Control*. 2013;32:134–142.
- [145] Peng J, Zhang L, Gu Z-H, et al. The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol*. 2012;55:128–134.

CAPÍTULO 3

LEVEDURAS EM FERMENTO CAIPIRA DA PRODUÇÃO DE
CACHAÇA ARTESANAL E DE BAGAÇO DE MALTE DA
CERVEJARIA: BIODIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO
FENOTÍPICA PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS

YEASTS IN WILD FERMENT FOR CACHAÇA PRODUCTION AND IN BREWER'S
SPENT GRAIN: BIODIVERSITY AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION FOR
BIOTECHNOLOGICAL PURPOSES

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology”

Leveduras em fermento caipira da produção de cachaça artesanal e de bagaço de malte da cervejaria: caracterização fenotípica para fins biotecnológicos

Ramon P. Brexó¹, Luciana R. Brandão², Rafael D. Chaves¹, Ruann J. S. Castro¹, Adriano G.
Cruz³, Carlos A. Rosa², Anderson S. Sant’Ana^{1#}

¹Departamento de ciência de alimentos, Faculdade de engenharia de alimentos, Unicamp

²Departamento de microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

³ Instituto Feral de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, IFRJ

#Autor correspondente: Prof. A. S. Sant’Ana: and@unicamp.br_Rua Monteiro Lobato, 80.
Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Neste estudo, as leveduras foram isoladas de fermento caipira da produção de cachaça artesanal em diferentes estágios, e de bagaço de malte cervejeiro. Por metodologia tradicional dependente de cultivo foram isoladas 134 leveduras. Através da identificação moléculas foi possível agrupá-las em 6 gêneros e 10 espécies distintas. Estas leveduras foram caracterizadas através de uma série de ensaios fenotípicos. A formação de ascósporos foi observada em setenta e três *Saccharomyces cerevisiae*, três *Torulaspora delbrueckii* e uma *Wickerhamomyces anomalus*. Apenas três *S. cerevisiae*, uma *Clavispora lusitaniae* e uma *Pichia kudriavzevii* foram capazes de crescer a 45 °C, e somente a cepa *S. cerevisiae* LMQA SNR 70 apresentou eficiente característica *Killer*. A actidiona nas concentrações de 50 e 100 mg.L⁻¹ apresentou ação seletiva contra *Candida parapsilosis*, enquanto que a natamicina inibiu o crescimento de todas as cepas nas mesmas concentrações. Os testes qualitativos e quantitativos da atividade amilolítica, pectinolítica, celulolítica e xilanolítica teve maior relevância dentre as cepas não-*Saccharomyces*, com destaque para a resposta multienzimática das cepas *W. anomalus* LMQA CSC 43 e *T. delbrueckii* LMQA BSG 6. Em adição, os testes quantitativos revelaram que 23,13% das cepas apresentam atividade exoenzimática em meio nutricionalmente escasso. O perfil fenotípico mostrou que 16,4% das cepas expressaram duas ou mais características estudadas. Além disso, os dados obtidos destacaram a representatividade de dois terços de leveduras não-*Saccharomyces* apresentando características fenotípicas de interesse biotecnológico, ressaltando a importância dos estudos que abragem maior diversidade biológica.

Palavras-chave: *Saccharomyces*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora*, Microencapsulação, Ascósporo, *Killer*, Natamicina, Actidiona, Amilase, Pectinase, Celulase, Xilanase

1. Introdução

As leveduras são amplamente reconhecidas pela contribuição nas fermentações de alimentos e bebidas, biocatálise, produção de proteínas heterólogas, biocontrole e biorremediação, entre outras aplicações de interesse econômico [1, 2]. A diversidade de cepas convencionais (*Saccharomyces*) e não-convencionais (não-*Saccharomyces*) vem apresentando cada vez mais relevância para a melhora e diversificação de produtos e processos [1–5]. A necessidade inerente por inovações vem estimulando a busca por leveduras a partir de ambientes distintos tais como processos de fermentação espontâneos e resíduos agroindustriais.

Dentre os processos de fermentação espontâneos pode-se destacar a produção artesanal da cachaça. A cachaça é uma bebida típica brasileira produzida pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado. O produto final tem gradação alcoólica entre 38 a 48 % v/v quando aferido sob a temperatura de 20 °C [6]. A produção artesanal da cachaça tem como princípio o uso do inóculo caipira que consiste em uma complexa comunidade microbiana proveniente do ambiente e da matéria-prima [7]. As características inerentes do processo (temperatura, alta competição microbiana, variações osmóticas, concentração de etanol, entre outras) são fortes fatores de seleção natural [7–10]. Em oposição, os resíduos agroindustriais são nichos que em suma apresentam baixa disponibilidade de nutrientes de fácil assimilação [11, 12]. Desta forma, estes nichos favorecem seleção de metabolismo e padrões regulatórios diversificados condizentes com a oferta nutricional [2]. O bagaço de malte cervejeiro (BSG) é um resíduo cervejeiro abundante de baixo valor comercial [13]. Este resíduo é composto principalmente por polissacarídeos não-amiláceos e proteínas, representando aproximadamente 85 % dos resíduos gerados pelas cervejarias [14–16].

Considerando-se que a produção artesanal da cachaça e o bagaço de malte cervejeiro apresentam características que favorecem a seleção de fenótipos de relevância biotecnológica, a prospecção de leveduras a partir destes ambientes pode permitir a seleção de cepas com características específicas para o processamento de novas matérias-primas, desenvolvimento de novos bioprocessos e geração de novos produtos, mais rentáveis, eficientes e ambientalmente sustentáveis [1, 2, 5, 7, 17–20].

Dentre as características relevantes para permitir a aplicação de novas cepas de leveduras em processos diversos e desenvolvimento de novos produtos, pode-se citar fatores relacionados à competição, sobrevivência e capacidade de metabolismo de determinados compostos. Por exemplo, sabe-se que a expressão de proteínas Killer representa um

diferencial para o estabelecimento e domínio de cepas de leveduras em processos fermentativos [21, 22]. Esta é uma característica altamente relevante já que a inviabilidade de um processamento estéril pode propiciar o desenvolvimento de um ambiente fermentativo competitivo e hostil, como se observa em processos de fermentação para produção de bioetanol [23].

Além disso, as fermentações industriais também são beneficiadas pelo uso de leveduras resistentes ao calor. Leveduras termofílicas podem ser aplicadas em processo de fermentação em batelada de material lignocelulósico com temperaturas na faixa de 40 – 55° C, e em processos integrados de sacarificação e fermentação de matéria amilácea [24, 23, 74]. Esta característica favorece o elevado metabolismo de açúcar, permite a redução dos gastos com resfriamento das dornas e restringe significativamente as chances de contaminação da dorna [24, 74].

A utilização de componentes das células das leveduras para microencapsulação representa atualmente um importante foco da prospecção de leveduras. Os ascósporos de leveduras vêm sendo investigados como agentes na microencapsulação de moléculas ativas com seletividade diferenciada [30–32].

A síntese de exoenzimas por leveduras também é um atributo de relevância biotecnológica. As enzimas amilase, pectinase, celulase e xilanase produzidas por leveduras podem ser aplicadas em diversos setores industriais [25, 26]. Entretanto, o custo de produção ainda é o principal fator limitante. A possibilidade da produção utilizando resíduos sólidos industriais e agroindustriais pode ser considerada estratégica para redução de custo da produção destas enzimas [12, 26, 27]. Além disso, leveduras que produzem estas enzimas apresentam a capacidade de acentuar características sensoriais em bebidas e poderiam ser aplicadas diretamente em processos de fermentação [28, 29].

Considerando-se todos os aspectos mencionados anteriormente, fica evidente a importância de se prospectar leveduras que apresentem fenótipos específicos que permitam sua aplicação em processos ou resultem em novos produtos biotecnológicos. Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar a diversidade de leveduras provenientes da produção de cachaça artesanal e no bagaço de malte cervejeiro (BSG). Após sua identificação a nível de espécie, as cepas isoladas foram avaliadas quanto ao perfil *killer*, capacidade de formação de ascósporos, desenvolvimento em temperaturas elevadas, resistência aos antifúngicos natamicina e actidiona (ciclohexamida) e produção de exoenzimas (amilase, pectinase, celulase e xilanase).

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

Foram utilizadas amostras de bagaço de malte provenientes de uma indústria cervejeira e do fermento caipira da produção de cachaça artesanal oriundo de um alambique, ambos localizados no estado de São Paulo, Brasil.

O bagaço cervejeiro ou “*dreche*” foi obtido por peneiramento do mosto por meio de peneiras que utilizam como elementos filtrantes as próprias cascas do malte processado. A etapa de filtração foi realizada para a remoção do resíduo dos grãos de malte do mosto pronto.

Na cachaçaria foram coletadas amostras do preparo do fermento caipira com 24 horas (Country Sstarter Culture – CSC), do fermento caipira pronto (Starter No Recycled - SNR) com 12 dias e do fermento caipira reciclado (Starter Recycled Cells - SRC) também denominado de pé-de-cuba com 42 dias. O reciclo de células do fermento é realizado com a fração de aproximadamente 1/10 do volume basal da fermentação antecessora (rica em leveduras sedimentadas).

Todas as amostras coletadas foram mantidas sob refrigeração (5 °C) por no máximo 8 horas até o momento das análises. Uma breve descrição do processo usado para fabricação da cachaça pode ser encontrada no material suplementar (**Apêndice**).

2.2. Isolamento e preservação das leveduras

Para o isolamento das leveduras, foram feitas diluições seriadas preparadas na proporção 1:9 em água peptonada 0,1 % (Acumidia, Lansing, EUA) estéril. As diluições foram realizadas a partir de 10 mL das amostras do fermento caipira, do fermento sem reciclo de células e do fermento reciclado. A amostragem do resíduo de malte, foi utilizado 25 g do resíduo úmido em 225 mL de água peptonada 0,1 % (Acumidia, Lansing, EUA) estéril.

Alíquotas de 0,1 mL foram plaqueadas por espalhamento em superfície em três placas de Agar extrato de malte (MEA) [20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), 20 g.L⁻¹ agar (Kasvi, Curitiba, Brasil), 1 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Inlab, São Paulo, Brasil). Posteriormente, as placas foram incubadas por 7 dias a 25°C [30, 31].

Após a incubação, as colônias foram selecionadas de acordo com cor, textura, superfície, elevação e o arranjo de suas bordas [32]. As diferentes cepas foram denominadas de acordo com a origem, sendo:

LMQA CSC + (N°) para as cepas provenientes do fermento caipira;

LMQA SNR + (N°) para as cepas provenientes do fermento sem reciclo de células;

LMQA SRC + (N°) para as cepas provenientes do fermento com reciclo de células;

LMQA BSG + (N°) para as cepas isoladas das amostras de bagaço de malte cervejeiro.

Os isolados foram cultivadas em caldo extrato de malte (MEB) [20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), 1 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA)] suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Inlab, São Paulo, Brasil). Antes do congelamento, 30 % v/v de glicerol estéril (Dinâmica, Diadema, Brasil) foi adicionado como criopreservante [30, 31]. Todas as leveduras isoladas foram armazenadas em duplicata sob congelamento à -80°C.

2.2.1. Triagem e identificação das cepas de leveduras

A identificação das leveduras isoladas foi realizada pela equipe do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras (UFMG) em três etapas: *i*) triagem em YCB-lisina, *ii*) triagem de *Saccharomyces cerevisiae* por PCR *fingerprint* e *iii*) sequenciamento das cepas para identificação a nível de espécie.

2.2.1.1 Triagem em meio YCB - lisina

A triagem em meio base de carbono para levedura (YCB) com lisina [11,7 g.L⁻¹ YCB (Difco, Detroit, USA), 0,56 g.L⁻¹ lisina (Merck, Darmstadt, Germany) , 20 g.L⁻¹ agar (Kasvi, Curitiba, Brasil)] foi realizada para todas as cepas. Este teste inicial teve como objetivo diferenciar cepas *Saccharomyces* de não-*Saccharomyces*. As cepas não-*Saccharomyces* são capazes de desenvolver na presença de lisina, permitindo a distinção com as cepas *Saccharomyces* [33].

2.2.1.2 PCR *fingerprint*

O PCR *fingerprint* foi utilizado para agrupar as cepas de *Saccharomyces* através da semelhante no perfil de bandas, sendo consideradas pertencentes à mesma espécie. Foi utilizado a metodologia descrita por Lima et al., (2013). As reações foram realizadas com volume total de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão para PCR Mg-free (10X), 1 µL de 2 mM de desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), 1 µL de cada primer (GTG)₅ na concentração de 10 pmol, 5 µL de DNA padrão (DNA template), e 2 µL de 1 U. µL⁻¹ de Taq DNA polimerase (Fermentans, USA). A amplificação foi realizada com a desnaturação durante 5 minutos a 95 ° C, seguida de 40 ciclos de 93° C por 45 segundos, 50° C por 60 segundo, e 72°C por 60 segundos, seguido pela extensão final sob a temperatura de 72°C durante 6 minutos. Os fragmentos amplificados de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4 % m/v. A corrida ocorreu com o gel embebido em tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X, a 90 volts durante 210 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e observado em transluminador UV.

2.2.1.2 Sequenciamento das cepas para identificação a nível de espécie.

Ao final das etapas *i* e *ii*, todas as leveduras com padrões distintos no PCR fingerprint e as cepas capazes de crescer em meio com lisina foram submetidas ao sequenciamento da região ITS-5.8S através dos iniciadores ITS1 e ITS4, e os domínios D1/D2 do gene LSU rRNA utilizando-se os iniciadores NL1 e NL4 [32]. Esta etapa da análise foi realizada pelo Instituto René Rachou - Fiocruz Minas. A metodologia de amplificação pode ser encontrada em Lachance et al. (1999) [34]. A concentração, limpeza e sequenciamento das amostras foi realizado em um sistema de sequenciamento automatizado (ABI 3130 Genetic Analyzer) usando BigDye v3.1 e POP7 polymer (Life Technology). As sequências foram obtidas em sequenciador automático Amersham MegaBACE 1000 utilizando o protocolo padronizado do Instituto Nacional do Câncer do Rio de Janeiro (INCA, Rio de Janeiro, Brasil).

As sequências obtidas foram comparadas com o GenBank database usando o BLAST tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [35]. Os gaps foram excluídos da análise, e a robustez das relações com as sequências depositadas foi calculada com 1000 bootstrap pseudoreplicados.

2.3. Caracterização fenotípica das leveduras

As cepas de leveduras foram inoculadas em meio ágar extrato de malte (MEA), e incubadas durante 5 dias a 30 °C. Posteriormente, uma colônia pura das cepas de leveduras foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL caldo extrato de malte (MEB) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol seguindo-se incubação a 30 °C por 48 horas. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3,836 × g na temperatura de 5 °C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). O procedimento de lavagem com 10 mL de água peptonada 0,1 % (Acumidia, Lansing, EUA) e centrifugação foi repetido por três vezes e o sobrenadante resultante foi descartado. As células foram suspensas com água peptonada 0,1 % e a concentração ajustada por espectrofotometria com comprimento de onda de 580 nm (Beckman DU-640 Spectrophotometer, Beckman Coulter, EUA) de acordo com a necessidade de cada teste descrito a seguir.

2.3.1. Atividade *Killer*

A atividade *killer* das cepas de leveduras isoladas foi testada em meio de cultura Extrato de Levedura Peptona Dextrose (YEPD) [10 g.L⁻¹ extrato de levedura (Kasvi, Padova, Italy), 20 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA), 20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ ágar (Kasvi, Curitiba, Brasil)] em tampão citrato-fosfato [586 mL solução aquosa de ácido cítrico (Synth, Diadema, Brasil) e 21,0 g.L⁻¹ em 414 mL de solução aquosa de fosfato monopotássico (KH₂PO₂) (Dinâmica, Diadema, São Paulo)] (pH 4,5 – 4,7) suplementado com 3% de azul de metileno (Ecibra, São Paulo, Brasil) [37]. Cepas sensíveis à atividade *killer*, *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 e *Candida glabrata* Y55 (Coleção de Micro-organismos, DNA e Células da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG / WDCM 1029) foram usadas como indivíduos resposta à atividade *Killer*.

Para determinação da atividade *killer*, um volume de 0,1 mL da suspensão de cada cepa sensível na concentração de 10⁵ UFC.mL⁻¹ ($A_{580\text{ nm}} = 0,4$) foi inoculado individualmente em YEPD suplementado com azul de metileno por plaqueamento em superfície. As placas foram mantidas semiabertas durante 30 minutos em cabine de segurança biológica (Pachane PA-

PCR-4-ECO, Piracicaba, Brasil) para a absorção do inóculo. Em seguida, 3 μL da suspensão de cada cepa na concentração de 10^5 UFC.mL^{-1} ($A_{580 \text{ nm}} = 0,4$) foram plaqueadas sobre as cepas sensíveis previamente inoculadas. Após 48 horas de incubação, a coloração azul conferida pelo azul de metileno foi usado como indicativo da redução da viabilidade e morte das células sensíveis ao fator *killer*. O resultado da expressão da atividade *killer* foi evidenciada pela formação de um halo de coloração azul os redor das colônias testadas [37, 38].

2.3.2. Produção de ascósporos e coloração de Wirtz-Conklin

A capacidade de produção de ascósporos foi avaliada em meio acetato de potássio agar (PAA) [10 g.L^{-1} acetato de potássio (Synth, Diadema, Brasil), 1 g.L^{-1} extrato de levedura (Kasvi, Padova, Italy), 0.5 g.L^{-1} glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L^{-1} agar (Kasvi, Curitiba, Brasil)] [39]. Um volume de 0,1 mL da suspensão de células ajustada a concentração de 10^6 UFC.mL^{-1} ($A_{580 \text{ nm}} = 0,5$) foi inoculado por espalhamento em superfície, seguindo-se incubação por 7 dias a 25°C .

A capacidade de absorção e armazenamento de compostos exógenos foi analisado através da coloração de Wirtz-Conklin. As cepas crescidas em acetato de potássio foram fixadas na lâmina com água estéril (passando a lâmina sobre a chama até a completa evaporação da água e adesão das células ao vidro) e coradas com solução aquosa de Verde Malaquita (Dinâmica, Diadema, Brasil) (5.0 % w/v) e Safranina (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) (0.25 %) de acordo com a metodologia de Wirtz-Conklin [40]. As lâminas foram analisadas sob aumento de 100 vezes no microscópio Micro Nikon® Eclipse Ni equipado com Câmera Nikon® DS - Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan).

2.3.3. Capacidade de multiplicação na presença de antifúngicos e em diferentes temperaturas

A capacidade de multiplicação das leveduras em meio de cultura sólido foi avaliada por testes independentes, utilizando dois antifúngicos e três diferentes temperaturas. Os experimentos foram realizados em MEA suplementado com Natamax® (DuPont™ Danisco®, Sumaré, Brasil) e Actidione (ciclohexamida) (Inlab, São Paulo, Brasil). Este antifúngicos foram escolhidos pela capacidade de inibição diferencial entre as espécies de levedura, sendo

aplicáveis em teste *in vitro* para análise de contaminantes em processos industriais. As concentrações de 50 e 100 mg.L⁻¹ analisadas neste trabalho foram estabelecidas com base em dados da literatura [41–45].

A determinação da capacidade de multiplicação à 37 °C, 45 °C e 50 °C foi realizada em MEA não suplementado. Estes níveis de temperatura foram selecionados considerando a sensibilidade média das leveduras ao calor e as temperaturas observadas em processos biotecnológicos, como a fermentação de bebidas artesanais e de etanol combustível em regiões tropicais a que podem facilmente atingir temperaturas superiores a 42 °C em função da atividade metabólica e ao calor ambiente [29, 46, 47].

A metodologia para avaliação de multiplicação na presença de antifúngicos e em diferentes temperaturas consistiu no plaqueamento de 10 µL da suspensão de células na concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹ ($A_{580\text{ nm}} = 0,5$) em três placas distintas. Todas as placas foram incubadas durante 5 dias à 30 °C, e o crescimento evidenciado a partir da formação de colônia visível.

2.3.4. Triagem qualitativa e quantitativa da capacidade de produção de exoenzimas

Todas as leveduras isoladas foram avaliadas quanto à sua capacidade de produção extracelular das enzimas: celulase, pectinase, amilase, xilanase. Para os experimentos, pectina cítrica (Inlab, São Paulo, Brasil), xilana (Sigma, St. Louis, EUA), carboximetilcelulose (Fluka, Buchs, Switzerland) e amido solúvel (Anidrol, Diadema, Brasil) foram usados como substrato.

2.3.4.1. Avaliação qualitativa da produção de enzimas

Os testes qualitativos de produção das enzimas pelas leveduras foram realizados em meio sólido constituído de 10 g.L⁻¹ substrato, 6,7 g.L⁻¹ base de nitrogênio para leveduras (YNB) (Difco, Milan, Italy), 15 g.L⁻¹ agar (Kasvi, Curitiba, Brasil) [48]. As placas de Petri (90 mm de diâmetro) contendo o meio de cultura foram demarcadas com 16 quadrantes. Cada quadrante foi inoculado com 10 µL da suspensão contendo 10⁶ UFC.mL⁻¹ ($A_{580\text{ nm}} = 0,5$) de cada levedura. Este procedimento foi repetido para cada levedura em três placas diferentes contendo o mesmo substrato. Todas as placas foram incubadas a 30 °C durante 4 dias [48].

Após a incubação, os meios contendo pectina e amido foram corados por sublimação com solução de iodo-iodeto de potássio [250 g.L^{-1} de KI (Synth, Diadema, Brasil) e 200 g.L^{-1} I (Synth, Diadema, Brasil)]. A sublimação consiste em depositar 3 mL da solução de iodo-iodeto de potássio na tampa da placa de Petri, e fechar com o meio de cultura de ponta-cabeça em temperatura ambiente. O iodo da solução volatiliza e interage com o substrato presente no meio de cultura, tornando-o arroxeadado. Entretanto, ao redor das cepas produtoras da enzima é possível evidenciar a formação de um halo incolor, branco ou amarelado, devido a ação enzimática sobre o substrato.

Os meios com xilana e carboximetilcelulose foram revelados durante 20 minutos com solução aquosa de vermelho do congo 5% (Dinâmica, Diadema, Brasil) e em seguida lavados com solução salina de NaCl 1M (Synth, Diadema, Brasil). Neste caso, há a visualização de halo translucido ao redor da colônia produtora da enzima, e o restante do meio contendo o substrato integro corado em rosa. Foram consideradas positivas as cepas formadoras de halo em mais de uma placa.

2.3.4.2. Avaliação quantitativa da produção de enzimas

Foram selecionadas para a quantificação da produção enzimática em meio líquido todas as cepas positivas nos ensaios qualitativos (Figura 3). Os experimentos para a quantificação da atividade enzimática foram realizados em triplicata em tubo de ensaio contendo volume final de 50 mL. Visando a investigação da atividade enzimática em ambiente nutricionalmente restrito, o meio de cultura foi composto de $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ do substrato (mencionado no item 2.3.4) e $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ de peptona (Acumidia, Lansing, EUA). O meio foi inoculado na proporção 20% v/v de suspensão de células de leveduras na concentração de 10^6 UFC/mL ($A_{580 \text{ nm}} = 0,5$), e submetido a incubação durante 5 dias a 30°C .

O sobrenadante contendo a enzima (caldo enzimático) foi obtido através da centrifugação do meio de cultura a $8,000 \times g$ durante 10 minutos a 5°C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA) [28]. A reação enzimática (enzima – substrato) foi realizada em triplicata em tubo de ensaio ($25 \times 150 \text{ mm}$) entre 0,5 mL do sobrenadante e 0,5 mL da solução 1% substrato em tampão acetato [295 mL ácido acético glacial ($11,55 \text{ mL.L}^{-1}$ em 705 mL acetato de sódio tri-hidratado (Dinâmica, Diadema, Brasil) $27,20 \text{ g.L}^{-1}$] a 37°C por 60 minutos.

A atividade enzimática foi estimada através da reação do ácido dinitrossalicílico (DNS) e os agentes redutores formados pela reação enzimática de acordo com a metodologia de Miller [49] (Material suplementar). A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a síntese 1 μmol do produto por minuto sob as condições testadas. A atividade enzimática foi estabelecida pela alteração da absorbância decorrente da interação dos agentes redutores (produto) da reação enzimática com o ácido dinitrossalicílico (DNS). A conversão da absorbância para concentração dos agentes redutores liberados pela ação enzimática foi realizada através das respectivas curvas-padrão. As curvas previamente analisadas apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 0,9934 para glicose (Synth, Diadema, Brasil), 0,9765 para xilose (Sigma, St. Louis, EUA), e 0,9765 para o ácido poligalacturônico (Sigma, St. Louis, EUA) (Material suplementar).

2.4. Análises estatísticas

Os testes qualitativos foram realizados em triplicata e a característica fenotípica associada para as cepas que apresentaram resposta positiva em duas ou três replicatas. A avaliação quantitativa da produção de enzimas em meio líquido também foi conduzida em triplicata e os resultados representados pela média das três determinações com o desvio padrão correspondente (média $\pm$ desvio padrão). Os dados experimentais da determinação quantitativa da atividade enzimática foram analisados pela análise de variância ANOVA. A diferença significativa entre os dados com distribuição normal foi determinada através do teste paramétrico Scott-Knott, e teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação dos dados não-normais. As diferenças entre os resultados foram consideradas significativas nos casos em que o p-valor foi igual ou menor que 0,05. Estas análises foram realizadas no software Assistat versão 7.7 pt – software grátis (Campina Grande, Brasil) [50].

3. Resultados

3.1. Composição das espécies de leveduras isoladas das amostras de fermento da produção de cachaça artesanal e do bagaço de malte cervejeiro

As amostras analisadas apresentaram as seguintes contagens de leveduras em log (média $\pm$ desvio padrão): fermento caipira (CSC) $7,6 \pm 0,21$ UFC.mL⁻¹; fermento não reciclado (SNR) $9,3 \pm 0,38$ UFC.mL⁻¹; fermento reciclado (SRC) $8,73 \pm 0,17$ UFC.mL⁻¹, e bagaço de malte (BSG) $2,3 \pm 0,3$ UFC.g⁻¹.

Foram isoladas 134 cepas de leveduras com base nas diferenças morfológicas das colônias em ágar extrato de malte (MEA). Na **Tabela 1** é mostrada a composição de espécies isoladas de cada amostra. A identificação pelo sequenciamento da região ITS-5.8S e os domínios D1/D2 do gene LSU rRNA (28S) resultou em 6 diferentes gêneros com a seguinte abundância: 63,4 % *Saccharomyces*, 14,9 % *Torulaspora*, 8,2 % *Candida*, 7,5 % *Wickerhamomyces*, 4,5 % *Pichia* e 1,5 % *Clavispora*.

Das 134 leveduras, 51 (38,06 %) foram isoladas do fermento caipira (**CSC**) – *S. cerevisiae* (n=37), *W. anomalus* (n=6), *T. delbrueckii* (n=5), *P. manshurica* (n=2) e *C. parapsilosis* (n=1); 41 (30,59 %) leveduras isoladas fermento não reciclado (**SNR**) – *S. cerevisiae* (n=28), *T. delbrueckii* (n=5), *W. anomalus* (n=3), *P. manshurica* (n=3), *C. pseudointermedia* (n=1) e *C. aaseri* (n=1); 34 (25,37 %) da fermentação com o fermento reciclado (**SRC**) – *S. cerevisiae* (n=19), *T. delbrueckii* (n=6), *C. parapsilosis* (n=5), *W. anomalus* (n=1) e *C. intermedia* (n=3), totalizando 126 isolados provenientes da produção da cachaça. As 8 (5,98 %) leveduras restantes foram isoladas do bagaço de malte cervejeiro (**BSG**) – *T. delbrueckii* (n=4), *C. lusitaniae* (n=2), *S. cerevisiae* (n=1) e *P. kudriavzevi* (n=1).

3.2. Atividade Killer

Somente a cepa *S. cerevisiae* LMQA SNR 70 apresentou a capacidade de inibir a multiplicação de *S. cerevisiae* NCYC 1006 e *C. glabrata* Y55. As cepas *S. cerevisiae* LMQA CSC 27, 28, 32, *W. anomalus* LMQA CSC 30, 41, 43, 44, *T. delbrueckii* LMQA SNR 90, 95, BSG 7, 8 foram capazes de inibir a cepa *C. glabrata* Y55. Enquanto que as cepas *S. cerevisiae* LMQA CSC 6, 17, 18, 22, 23, 24, LMQA SNR 78, 79, 80, LMQA SRC 140, 142, 143, *W.*

anomalus LMQA SNR 71, LMQA SRC 138, *T. delbrueckii* LMQA CSC 19, *C. parapsilosis* LMQA CSC 13 e *P. manshurica* LMQA CSC 20 causaram a inibição da cepa *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006.

Tabela 1- Relação dos gêneros e espécies de leveduras isoladas das amostras de bagaço de malte cervejeiro e do fermento da produção artesanal de cachaça.

GÊNERO	ESPÉCIE	Bagaço de malte Cervejeiro (BSG)	CACHAÇA		
			Fermento Caipira Inicial (CSC)	Fermento Sem Reciclo de Células (SNR)	Fermento Com Reciclo de Células (SRC)
<i>Candida</i>	<i>aaseri</i>	–	–	1	–
	<i>pseudointermedia</i>	–	–	1	–
	<i>intermedia</i>	–	–	–	3
	<i>parapsilosis</i>	–	1	–	5
<i>Clavispora</i>	<i>lusitaniae</i>	2	–	–	–
<i>Pichia</i>	<i>kudriavzevii</i>	1	–	–	–
	<i>mansurica</i>	–	2	3	–
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	1	37	28	19
<i>Torulaspora</i>	<i>delbrueckii</i>	4	5	5	6
<i>Wickerhamomyces</i>	<i>anomalus</i>	–	6	3	1

3.3. Formação de Ascósporos

A coloração de Wirtz-Conklin evidenciou que os ascósporos foram capazes de incorporar e armazenar o corante Verde Malaquita ($C_{23}H_{25}ClN_2$, $364.917 \text{ g.mol}^{-1}$), sendo visualizados na cor azul, enquanto que as células vegetativas (cepas não produtoras de ascósporos) foram coradas em vermelho pela absorção do contra corante Safranina ($C_{20}H_{19}ClN_4$, 350.85 g/mol). Além disso, foi possível diferenciar os ascos das células vegetativas pela morfologia. A observação microscópica evidencia que o asco é uma estrutura de forma irregular contendo os ascósporos globulares no interior, enquanto que as células vegetativas são inteiriças e esféricas (A microfotografia demonstrando a diferença entre as células vegetativas e os ascósporos é apresentada na **Figura 1** dos **Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice – Apêndice**).

A formação de ascósporos foi observada em 85,9 % ($n=73$) das cepas de *S. cerevisiae*, sendo que somente as cepas *S. cerevisiae* LMQA CSC 3, 6, 12, 15, 34, 48, LMQA SNR 64, 70, 76, 78, 86 e LMQA SRC 149 não formaram ascósporos. Dentre as demais leveduras, *W. anomalus* LMQA SNR 98, *T. delbrueckii* LMQA SNR 90 e 95, LMQA BSG 7 e 8 também formaram ascósporos nas condições estudadas. Na Figura 2 são mostradas imagens dos ascósporos formados por *S. cerevisiae* LMQA SNR 65 e as células vegetativas da cepa *T. delbrueckii* LMQA SRC 136 não formadora de ascósporos.

3.4. Capacidade de multiplicação na presença de antifúngicos e em diferentes temperaturas

C. parapsilosis LMQA SRC 146 e 150 apresentaram de multiplicação e formação de colônias em meio sólido suplementado com 50 mg/L de actidiona/ciclohexamida. Na presença de 50 e 100 mg/L de actidiona (ciclohexamida), houve multiplicação e formação de colônias por *C. parapsilosis* LMQA CSC 13, LMQA SRC 130, 132, 134, *P. manshurica* LMQA CSC 20, LMQA SNR 58, 60 e *S. cerevisiae* LMQA CSC 112. Nas placas suplementadas com natamicina em ambas as concentrações (50 e 100 mg/L) nenhuma levedura foi capaz de se multiplicar e formar colônias visíveis.

Sob a temperatura de 45 °C somente *S. cerevisiae* LMQA CSC 23, LMQA SNR 106 e LMQA BSG 5.1, *C. lusitanae* LMQA BSG 3 e *P. kudriavzevii* LMQA BSG 4 formaram

colônias visíveis. Todas as leveduras foram capazes de formar colônias visíveis a 37 °C, enquanto nenhuma cepa apresentou a capacidade de multiplicação e formação de colônias visíveis a 50 °C.

Estão destacadas na **Tabela 2** as cepas que apresentaram resistência aos agentes antifúngicos, e as cepas capazes de apresentar desenvolvimento colonial a 45° C.

Tabela 2- Leveduras resistentes à temperatura de 45 °C e ao antifúngico Actidiona.

LEVEDURAS RESISTENTES			
Estresse	Faixa	Espécies	Cepas
Temperatura	45 ° C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA BSG 5.1
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 23
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA SNR 106
		<i>Clavispora lusitaniae</i>	LMQA BSG 3
		<i>Pichia Kudriavzevii</i>	LMQA BSG 4
Actidiona / Cicloheximida	50 mg.L ⁻¹	<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA SRC 146
		<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA SRC 150
	100 mg.L ⁻¹ *	<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA CSC 13
		<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA SRC 130
		<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA SRC 132
		<i>Candida Parapsilosis</i>	LMQA SRC 134
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA SRC 112
		<i>Pichia manshurica</i>	LMQA CSC 20
		<i>Pichia manshurica</i>	LMQA SNR 58
		<i>Pichia manshurica</i>	LMQA SNR 60

Relação das cepas que apresentaram formação de colônias visíveis quando incubadas a 45 °C, ou quando inoculadas em meio suplementado com 50 e 100 mg.L⁻¹ de Actidiona (ciclohexamida). * Ressaltando que todas as cepas resistentes à 100 mg.L⁻¹ de Actidiona também apresentaram desenvolvimento colonial na concentração de 50 mg.L⁻¹.

3.5. Triagem qualitativa e quantitativa da capacidade de produção das exoenzimas

Os dados das cepas produtoras das enzimas amilase, pectinase, celulase e xilanase estão detalhados na **Tabela 3**. Dentre as 134 cepas, apenas sete cepas apresentaram halo de degradação em meio sólido com amido, com predomínio de *W. anomalus*. Diante do teste

quantitativo, foi possível destacar as cepas *W. anomalus* LMQA CSC 5 e 43. Estas foram as únicas cepas que apresentaram atividade em meio líquido, com os respectivos valores de $24,2 \pm 16,5 \text{ U.L}^{-1}$ e $50,0 \pm 33,5 \text{ U.L}^{-1}$.

Em meio sólido a atividade pectinolítica foi observada em nove cepas das espécies *W. anomalus* e *T. delbrueckii*. A maior atividade enzimática média foi de $23,5 \pm 3,8 \text{ U.L}^{-1}$ apresentada pela cepa *W. anomalus* LMQA CSC 30. A cepa *W. anomalus* LMQA SRC 138, apesar de ter formado o halo enzimático, foi a única cepa que não apresentou atividade enzimática quantificável através da metodologia utilizada.

A atividade celulolítica em meio sólido foi observada em nove cepas das espécies *C. aaseri*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*. Destas, apenas cinco cepas apresentaram atividade enzimática quantificável. O melhor representante para a produção desta enzima foi a cepa *C. aaseri* LMQA SNR 73, com atividade enzimática de $4,4 \pm 0,4 \text{ U.L}^{-1}$.

A produção da enzima xilanase foi observada em dezoito cepas das espécies *C. parapsilosis*, *P. manshurica*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *W. anomalus*. Somente a cepa *T. delbrueckii* LMQA BSG 6 não apresentou atividade enzimática quantificável, enquanto que as cepas *C. parapsilosis* LMQA CSC 13 e *S. cerevisiae* LMQA CSC 6 apresentaram as maiores atividades enzimáticas de $39,0 \pm 0,4 \text{ U.L}^{-1}$ e $37,7 \pm 3,6 \text{ U.L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 3. Relação das cepas produtoras de enzimas destacadas pelo teste quantitativo e qualitativo. ⁶²

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ENZIMÁTICA			
Enzimas	Cepas formadoras de halo		Atividade Enzimática (U.L ⁻¹) (p < 0,05)
	Espécie	Cepa	
Amilase	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 5	24,2 ± 16,5 ^a
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 21	–
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 30	–
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 41	–
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 43	50,0 ± 33,5 ^a
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA SRN 71	–
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA BSG 6	–
Pectinase	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 14	12,0 ± 5,5 ^A
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 53	12,9 ± 7,1 ^A
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA BSG 6	14,7 ± 2,7 ^A
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 5	11,5 ± 2,8 ^A
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 21	11,8 ± 1,9 ^A
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 30	23,5 ± 3,8 ^A
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 43	14,5 ± 7,1 ^A
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA SNR 71	19,4 ± 5,7 ^A
Celulase	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA SRC 138	–
	<i>Candida aaseri</i>	LMQA SNR 73	4,4 ± 0,4 ^A
	<i>Candida parapsilosis</i>	LMQA CSC 13	1,4 ± 0,3 ^B
	<i>Pichia manshurica</i>	LMQA CSC 47	–
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 6	–
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 48	2,7 ± 1,5 ^{AB}
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA SNR 76	–
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 14	2,6 ± 2,1 ^{AB}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA SNR 85	3,4 ± 1,3 ^{AB}
Xilanase	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA BSG 6	–
	<i>Candida parapsilosis</i>	LMQA CSC 13	39,0 ± 0,4 ^D
	<i>Pichia manshurica</i>	LMQA CSC 20	14,4 ± 3,6 ^A
	<i>Pichia manshurica</i>	LMQA CSC 47	12,3 ± 1,9 ^A
	<i>Pichia manshurica</i>	LMQA CA 58	16,4 ± 1,2 ^{AB}
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 1	24,2 ± 3,0 ^{ABCD}
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 6	37,7 ± 3,6 ^D
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LMQA CSC 48	27,8 ± 1,1 ^{ABCD}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 14	33,7 ± 0,9 ^{CD}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 52	28,2 ± 0,8 ^{ABCD}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA CSC 53	29,4 ± 0,3 ^{BCD}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA SNR 54	17,6 ± 1,8 ^{AB}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA SNR 56	18,2 ± 1,6 ^{ABC}
	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LMQA BSG 6	–
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 5	30,2 ± 4,2 ^{ABCD}
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 21	28,9 ± 0,2 ^{ABCD}
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 30	27,9 ± 1,6 ^{ABCD}
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 41	26,5 ± 1,7 ^{ABCD}
	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	LMQA CSC 43	13,7 ± 3,5 ^A

Resultado de formação de halo e quantificação da atividade para as enzimas amilase, pectinase, celulase e xilanase. Os resultados do teste quantitativo estão expressos pela média ± desvio padrão. As letras minúsculas denotam a diferença significativa de acordo com o teste paramétrico Scott-Knott (p<0.05). As letras maiúsculas denotam a diferença significativa de acordo com o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (p<0.05). A unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a síntese 1 µmol do produto por minuto sob as condições testadas.

3.6. Representatividade fenotípica nas diferentes amostras

Como mostrado na **Tabela 1 (Materiais Suplementares - Apêndice)**, 37,5 % das cepas isoladas do bagaço de malte cervejeiro (BSG) apresentaram a capacidade de produção de ascósporos (n=3) e sobrevivência a 45 °C (n=3). Em adição, a produção exoenzimática foi representada por uma única cepa, o equivalente a 12,5 % das cepas isoladas desta amostra. Perante o total de cepas isoladas neste trabalho (n=134), a representatividade das cepas BSG na produção de ascósporos e na sobrevivência a 45 °C foi de 2,23% e para a produção das diferentes enzimas foi de 0,75%.

Os dados das cepas provenientes do fermento caipira (CSC) na **Tabela 2 (Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice - Apêndice)** evidenciam que a representatividade das cepas produtoras de ascósporos (n=31) foi de 60,78 %, seguida pela expressão de xilanase (n=15) com 29,41 %, pectinase (n=6) com 11,76 %, celulase e amilase (n=5) com 9,8 %, sobrevivência à actidiona (n=2) com 3,91 % e sobrevivência a 45 °C (n=1) com 1,96 %. Considerando as 134 cepas isoladas neste trabalho, as características expressas pelas cepas CSC representaram respectivamente 23,13 % (ascósporos), 11,19 % (xilanase), 4,48 % (pectinase), 3,73 % (celulase e amilase), 1,49 % (actidiona) e 0,74 % (45 °C).

De acordo com a **Tabela 3 (Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice - Apêndice)**, a relação de cepas provenientes do fermento sem o reciclo de células (SNR) produtoras de ascósporos (n=26) foi de 63,41 %, seguido pela a sobrevivência a 45 °C (n=3) e a expressão de celulase (n=3) com 7,31 %, sobrevivência a actidiona (n=2) e expressão de xilanase (n=2) ambas com 4,87 %, e expressão de pectinase (n=1), amilase (n=1) e atividade *killer* (n=1) com 2,43 %. A representatividade das cepas SNR em relação ao total de cepas foi de 19,40 % (ascósporo), 2,23 % (45 °C e celulase), 1,49 % (actidiona e xilanase) e 0,74 % (pectinase, amilase e atividade *killer*). Considerando como resposta *killer* positiva somente a sensibilização mútua das duas cepas sensíveis testadas.

De acordo com a **Tabela 4 (Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice - Apêndice)**, entre as cepas provenientes do fermento com o reciclo de células (SRC), somente três características foram relevantes, sendo a formação de ascósporos (n=18) com representatividade de 52,94 %, a sobrevivência a actidiona (n=6) 17,64 % e a expressão de pectinase (n=1) 2,94 %. Sobre a relação geral das cepas isoladas neste trabalho, a formação de

ascósporos pelas cepas SRC representou 13,43 %, sobrevivência a actidiona 4,48 % e a produção de pectinase 0,74%.

4. Discussão

Este trabalho é pioneiro na avaliação das características fenotípicas (produção de ascósporos, resistência a antifúngicos e temperaturas elevadas, e a produção de enzimas) de leveduras isoladas da produção de cachaça artesanal e do bagaço de malte. Os estudos da comunidade microbiana proveniente do processo produtivo da cachaça artesanal contribuem para o reconhecimento do patrimônio cultural e biológico envolvido com as técnicas artesanais de produção. Enquanto que a investigação do potencial microbiológico do resíduo cervejeiro (BSG) tem como premissa a descrição da microbiota incidente para a valorização deste subproduto de maneira sustentável e ecologicamente limpa.

O BSG é abundante, representando 85 % dos resíduos gerados pela indústria cervejeira [51]. Este resíduo é recolhido após a trituração do malte e extração a quente (65 – 70°C) dos açúcares para o preparo do mosto cervejeiro. Sua massa equivale a 30% do grão inicial [51]. Com composição relativa de 31% proteínas, 19 % pentoses, 16 % lignina, 12 % amido e β -glucanas, 9 % celulose e 9 % de lipídeos, além de alta umidade o BSG pode contribuir significativamente para a exploração de novas rotas metabólicas revelando importantes recursos biotecnológicos [39, 51, 52]. Apesar das características serem propícias ao desenvolvimento microbiano à concentração de leveduras proveniente deste resíduo foi baixa ($2,3 \times 10^2$ UFC.g⁻¹). Esta reduzida concentração de leveduras provenientes do BSG pode ser decorrente do processo de extração a quente dos açúcares presente no malte. Este fenômeno pode ser evidenciado pela alta concentração de leveduras na matéria-prima. De acordo com Laitila et al. (2011) a concentração pode variar entre 10^4 - 10^5 UFC.g⁻¹ em grãos não maltados e alcançar 10^7 UFC.g⁻¹ em grãos maltados destinados ao preparo do mosto [53].

A cachaça é uma bebida típica brasileira produzida pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentada. A produção da cachaça varia de região para região, pois cada produtor adota diferentes práticas no preparo do inóculo espontâneo (fermento caipira) conferindo características específicas para cada produto derivado [54, 55]. As amostras provenientes da produção de cachaça apresentaram maiores concentrações de leveduras. O SNR apresentou maior concentração ($2,5 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹) seguido pelo SRC ($5,7 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹) e CSC ($4,2 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹). A elevada concentração de açúcares e nutrientes facilmente assimiláveis

diluídos em água justifica estas altas concentrações de leveduras nas amostras [23]. Dentre estas amostras da produção de cachaça, a menor concentração de leveduras recuperadas do CSC pode ser decorrente pelo menor tempo de desenvolvimento da biomassa, apenas 24 horas. Nas mesmas condições e com 12 dias de preparo, o SNR apresentou a maior concentração de células destacando a relação do tempo com a concentração de leveduras nestas amostras. O valor intermediário observado no SRC pode estar diretamente relacionado com a exposição repetitiva aos estresses da fermentação, dentre eles as variações de temperatura, osmóticas e de concentração de etanol, e a intensa competição microbiana. Esses fatores estressantes contribuem para a seleção de cepas mais resistentes e dominantes, e reduz a população microbiana através da seleção natural [23].

De acordo com a identificação das leveduras provenientes do bagaço de malte - BSG houve o predomínio de não-*Saccharomyces*, com destaque para *Torulaspora delbrueckii*, *Clavispora lusitaniae* e *Pichia kudriavzevii*. A baixa recuperação de *S. cerevisiae* pode estar relacionada com a composição deste resíduo que apresenta praticamente camadas de pericarpo e casca da cevada rica em proteínas e polissacarídeos não fermentescíveis [14, 16, 51, 53], porém não foram encontradas na literatura consultada informações detalhadas para a comparação da microbiota residente em BSG. Em relação às leveduras provenientes da produção de cachaça, somente *W. anomalus* (*Pichia anomala*) e *T. delbrueckii* são descritas na literatura como recorrentes em fermentação de cachaça, entretanto, não foram encontrados relatos de *P. mashurica*, *C. parapsilosis*, *C. aaseri*, *C. intermedia* e *C. pseudointermedia* [46, 54, 56–58]. Essa diferenciação da composição das espécies em fermentação de cachaça pode ser resultante da singularidade microbiana estimulada pela a região geográfica, condições climáticas, as técnicas de colheita e estado de maturação da cana-de-açúcar, entre outras características endêmicas [23, 54]. Além disso, como cada produtor adota diferentes práticas no preparo do fermento caipira, o estabelecimento e a predominância de diferentes espécies ocorrem de forma diferenciada [54, 55]. Em outros tipos de fermentações espontâneas as espécies isoladas neste trabalho também foram reportadas em cerveja (*Pichia ssp.*, *W. anomalus* e *T. delbrueckii*) [19, 59], vinho (*T. delbrueckii*, *W. anomalus* e *C. kudriavzevii*) [20, 59, 60], Mezcal (*C. lusitaniae* e *T. delbrueckii*) [59], tequila (*T. delbrueckii*) [59], licor de sabor forte de Yibin - China (*W. anomalus*, *C. lusitaniae*, *P. manshurica* e *T. delbrueckii*)[29].

Apesar das diferentes espécies de leveduras recuperadas nas etapas da produção de cachaça, a maioria dos trabalhos avalia somente a sua composição de *S. cerevisiae*. Isso pode ser decorrente da discrepante concentração (dominância) de *S. cerevisiae* observada na

fermentação natural da cachaça [54, 61]. Dados da literatura indicam que o fermento espontâneo e as etapas iniciais da fermentação apresentam maior diversidade de leveduras, e após a fase tumultuosa existe o predomínio de *Saccharomyces cerevisiae* [46, 54, 56–58]. Neste trabalho, 62,6 % das leveduras isoladas do processo de produção de cachaça são *S. cerevisiae*, representando 72,5 % das espécies em CSC, 70,7 % em SNR e 55,8 % em SRC. Esta espécie apresenta grande habilidade de competir e prevalecer sobre outras espécies microbianas durante o processo fermentativo [23, 61]. Entre as características mais relevantes para a dominância de *S. cerevisiae* são: a) alta capacidade fermentativa (principalmente em etanol), resistência a altas concentrações alcoólicas, ácidos orgânicos [23]; b) sobrevivência sob escassez de oxigênio [23]; c) maior capacidade amenizar o estresse oxidativo através da síntese de biomoléculas, como biotinas [52]; e d) a capacidade de utilizar diferentes mecanismos defensivos como o contato célula-célula e a secreção peptídeos, proteínas e outras substância com efeito antimicrobiano [23, 61]. Dentre eles, a proteínas *Killers*, como evidenciado pela *Saccharomyces cerevisiae* LMQA SNR 70. Estas proteínas atuam sobre receptores de parede e membrana em leveduras sensíveis diminuindo a competição em ambientes hostis [62]. Em fermentações espontâneas, a atividade *killer* pode atuar na exclusão de leveduras contaminantes transientes do fermento caipira [62].

Devido à grande variação no número de genes *Saccharomyces cerevisiae* apresenta alta diversidade fenotípica que contribui diretamente no potencial biotecnológico [63]. Esses atributos estão relacionados à domesticação e evolução da espécie, e são relevantes para o uso industrial [63]. A protagonização desta espécie em bioprocessos vai além da produção de bioetanol combustível. As variações genotípicas das cepas favorecem a produção de proteínas *Killer*, outras proteínas bioativas, álcoois superiores, glicerol, enzimas, entre outras moléculas [1, 32, 37]. Além dessa gama de atributos, até a formação de ascósporos pode ser uma característica com potencial utilização comercial [64]. Dentre as aplicações de ascósporos relatadas estão a absorção de metais pesados, microencapsulação de princípios ativos e imobilização de enzimas [64, 65].

A formação de ascósporos também representa uma maneira indireta para a seleção de leveduras diplóide-haplóide (ciclo de via haplodiplonte). De acordo com o ciclo de vida das leveduras, em ambiente pobre em nitrogênio e rico em açúcares não-fermentescíveis as células haplóides não são capazes de realizar meiose para a formação de asco e ascósporos [66, 67]. Diferenças na ploidia celular podem favorecer a plasticidade adaptativa e a expressão de características relevantes. Como exemplo, a cepa industrialmente utilizada PE-2

é um diploide naturalmente adaptada para a alta produção de etanol [21]. Esta cepa apresenta também alta plasticidade genotípica e expressividade na síntese de biotinas obtida por adaptação do número de genes [52]. Estas condições favorecem a competição e capacidade adaptativa aos diferentes estresses da produção de etanol [52]. Como observado neste trabalho, grande parte das *S. cerevisiae* provenientes de ambiente fermentativo apresentam a capacidade de formar ascósporos (85,9 %). O esporo de levedura apresenta maior resistência a alterações ambientais, conferindo maior resistência a degradação física, química ou enzimática ao agente encapsulado do que as células vegetativas [64, 65]. Esta característica está relacionada às camadas quitosana e ditirosina presentes exclusivamente no ascósporo [65]. As variações genéticas que alteram o potencial de esporulação entre populações da mesma espécie, a expressão dos genes DIT1, OSW2 e outros genes relacionados a esporulação também pode ser diferencial [64]. Desta forma, o maior acesso à diferentes cepas de *S. cerevisiae* formadoras de ascósporos favorece o alcance de melhores performances em “biomicroencapsulamento”.

Além da formação de estruturas de proteção, algumas leveduras conseguem sobreviver sob o estresse na forma vegetativa. A temperatura ambiente e o calor gerado pelo metabolismo exotérmico em fermentações espontâneas podem favorecer temperaturas elevadas. Um exemplo extremo é a fermentação espontânea do licor de sabor intenso Daqu que pode alcançar de forma natural a temperatura de 60 °C [29]. Apesar da redução considerável da população, a fermentação não finda, pois as cepas resistentes permanecem metabolizando [29]. Embora muitas leveduras não sejam capazes de tolerar temperaturas elevadas, no presente estudo, cinco diferentes leveduras foram capazes de crescer a 45 °C, com destaque para BSG que apresentou 3 cepas resistentes. O mecanismo de sobrevivência frente a esta condição não é espécie-específico, sendo observada em *S. cerevisiae*, *C. lusitaniae*, *P. kudriavzevii* e *W. anomalus*.

As espécies resistentes obtidas neste trabalho já foram relatadas na matéria-prima e no próprio mosto cervejeiro indicando que estas espécies são endêmicas ao ambiente de cervejaria, podendo persistir e ser carreadas por todo processo de produção de cerveja [53]. A fermentação espontânea e a ausência do controle de temperatura na fermentação da cachaça também favorecem o aumento da temperatura do sistema. Entretanto, favorece o aumento de temperatura de forma mais branda do que a observada no processamento da cerveja (65 – 70 °C) ou no Daqu (60 °C). Desta forma, a produção de cachaça conferiu uma menor quantidade de cepas resistentes a temperaturas elevadas diante do total das cepas isoladas (somente 2 em 126 cepas).

Cepas com esta característica apresentam relevante potencial para aplicação na produção de etanol, pois favorece o elevado metabolismo de açúcar, permite a redução de custos com a manutenção da temperatura das dornas, e restringe significativamente as chances de contaminação do sistema por micro-organismos indesejados [24, 74]. Leveduras termofílicas podem ser aplicadas em processo de fermentação em batelada de material lignocelulósico com temperaturas na faixa de 40 – 55° C, e em processos integrados de sacarificação e fermentação de matéria amilácea [24, 23, 74].

Apesar de não ser uma característica espécie-específica, a resistência à temperaturas elevadas ressalta a importância do estudo das leveduras não-*Saccharomyces*. Estudos visando a aplicação de leveduras não-convencionais ainda são escassos, porém promissores [3]. Diante disso, justifica-se a investigação de ambientes onde não há predomínio de *Saccharomyces* para a prospecção de cepas mais eficientes na secreção de proteínas, como enzimas por exemplo.

A vasta diversidade de leveduras não-*Saccharomyces* conta com espécies potencialmente benéficas e potencialmente patogênicas [3, 68]. A espécie *Candida parapsilosis* isolada neste trabalho é um exemplo de espécie potencialmente patogênica. Esta espécie apresenta como fator de virulência a formação de biofilme, aderência, e secreção de protease aspártica, fosfolipases e lipases. Como manifestações clínicas, esta levedura já foi relatada causando infecções do trato urinário, infecções oculares, meningites, entre outras [68].

Para fins biotecnológicos preconiza-se a utilização de espécies seguras. Diante disto, metodologias baratas e eficientes para triagem e seleção de cepas indesejáveis são requeridas. A exposição das cepas ao antifúngico actidiona nível de 50 mg.L⁻¹ em extrato de malte agar (MEA) pode representar um meio específico para testes de triagem para *C. parapsilosis*. De acordo com os dados deste trabalho, todas as cepas de *C. parapsilosis* foram capazes de se desenvolver e formar colônias nestas condições. Em comparação, a ação da natamicina (50 mg.L⁻¹) não permitiu a triagem das cepas de *C. parapsilosis*, pois foi capaz de inativar de forma indiscriminada cepas de *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*.

Sendo assim, os dados obtidos indicam que a actidiona nas condições descritas neste trabalho apresenta potencial uso para a triagem de *C. parapsilosis* e a natamicina um possível candidato para estudos mais aprofundados de profilaxia e tratamentos para infecções causadas por esta levedura.

Embora existam espécies com características indesejáveis para aplicação biotecnológica entre leveduras não-*Saccharomyces*, são inúmeros os percalços para a investigação de triagem

e aplicação comercial destas. Visto que, embora a robustez genética observada em *S. cerevisiae* seja alta, a comparação genômica da via secretória com outras espécies revelou a perda de algumas funções relacionadas ao controle de qualidade da secreção de proteínas [2]. A produção de exoenzimas por leveduras pode ser alcançada por cepas com vias secretórias mais eficientes.

Atualmente o mercado de enzimas é dominado pela utilização de fungos filamentosos e bactérias principalmente os gêneros *Aspergillus* e *Bacillus* [1]. Entretanto, a motivação para a triagem das cepas isoladas se baseia na afirmativa de que as poucas enzimas produzidas em larga escala por leveduras são predominantemente provenientes de ascomicetos [1]. Além disso, falta dados na literatura sobre o potencial enzimático de leveduras não-convencionais provenientes da cachaçaria e bagaço de malte cervejeiro, visto que entre as evidências da produção enzimática mais de 86 % são não-*Saccharomyces*.

O fator limite mais expresso para a aplicação comercial de enzima ainda é o custo de produção [27, 48]. Entretanto, enzimas (purificadas) produzidas por leveduras podem apresentar alto valor agregado devido à aplicação química específica e refinada, e também pela aplicação na biotransformação de intermédios farmacológicos [1]. As publicações com esta temática descrevem predominantemente leveduras prospectadas da produção e ambiente vinícola com objetivando a produção de vinhos [18, 28, 48]. Entretanto, a utilização *in situ* de leveduras produtoras de enzimas para a promoção de benfeitorias tecnológicas também é descrito como uma saída viável. O processo de malteação de cevada [53] e a extração de compostos de cor e sabor por meio da fermentação sequencial ou em co-cultura de vinhos e cervejas são alguns exemplos da utilização *in situ* [17, 19, 59, 69].

As enzimas celulase, pectinase, amilase, xilanase apresentam aplicação diversificada na indústria de alimentos, têxtil, papel e celulose [70]. Também são atribuídas à possibilidade de favorecer características sensoriais em bebidas fermentadas por processos individuais ou em co-cultura [28, 29]. E a síntese pode ser realizada a partir de resíduos sólidos industriais e agroindustriais (Ex. bagaço de malte cervejeiro, resíduo da indústria de suco de laranja, e bagaço de cana-de-açúcar) [12, 26, 27, 71, 72]. O uso destes materiais contribui para a redução de custo da produção de enzimas para diversas finalidades, e favorece os avanços da produção de biocombustíveis de segunda geração utilizando os próprios resíduo como matéria-prima [26, 27].

Com base na composição do substrato de origem (rico em compostos de complexa assimilação) [16, 51] era esperado que as cepas não-convencionais (não-*Saccharomyces*) isoladas do BSG apresentassem expressiva produção de exoenzimas. Contudo, somente a

cepa *Torulaspora delbrueckii* LMQA CE 6 teve desempenho representativo nos testes enzimáticos. Diante dos testes qualitativos, esta cepa foi capaz de formar halos de degradação para todas as enzimas testadas, e apresentar atividade pectinolítica em meio líquido. Além disso, foi a única cepa capaz de produzir halo proteolítico em meio *skim milk* (leite desnatado) em teste complementar (dados não apresentados). Estes dados demonstram o potencial desta levedura para a síntese de extratos enzimáticos complexos (produção de mais de uma enzima). A capacidade de múltipla expressão enzimática favorece a aplicação desta levedura para o favorecimento de características sensoriais de bebidas fermentadas e cereais maltados [28, 29, 53].

Diante deste mosaico metabólico conferido pelas cepas *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, 30,95 % (n=39) do total de cepas isoladas das amostras da produção de cachaça artesanal (CSC, SNR, SRC) apresentaram a capacidade de produção enzimática no teste qualitativo e, 79,48 % (n=31) destas cepas positivas na triagem qualitativa, apresentaram quantidade mensurável de atividade enzimática em meio líquido pobre em micronutrientes e sacarídeos de fácil assimilação.

A expressão enzimática nas leveduras do processo de produção da cachaça indicou uma maior atuação do ambiente na seleção destes fenótipos. Das 39 leveduras positivas no teste qualitativo, 84,61 % (n=33) foram isoladas do fermento caipira (CSC). Esta alta incidência de cepas produtoras de enzimas nesta etapa pode estar relacionada à riqueza nutricional (caldo de cana-de-açúcar e farelo de milho) e a menor pressão seletiva se comparada às etapas de fermentação tumultuosa. A menor concentração de etanol, e a pequena variação osmótica e da acidez no preparo do fermento caipira pode propiciar o estabelecimento da microbiota transiente metabolicamente distinta [54].

Considerando as espécies produtoras de enzimas, *W. anomalus* teve maior representatividade, com 43,6 % (n=17) no teste qualitativo e 37,5 % (n=12) no teste quantitativo. Esta espécie sobressaiu em número de cepas (n=6) e na atividade enzimática (LMQA CSC 30 - $23,5 \pm 3,8 \text{ U.L}^{-1}$) de pectinase, e em número (n=6) e na atividade enzimática (LMQA CSC 43 - $50,0 \pm 33,5 \text{ U.L}^{-1}$) de amilase. A atividade amilolítica e pectinolítica em *W. anomalus* também foi observada por outro autores [29, 48]. Nos testes para xilanase, as espécies *W. anomalus* e *T. delbrueckii* foram as mais abundantes com cada uma representando 29,41 % (n=5). Contudo a maior atividade enzimática foi observada na *Candida parapsilosis* LMQA CSC 13 ($39,0 \pm 0,4 \text{ U.L}^{-1}$). Os resultados da atividade celulolítica foram as mais baixas com máxima atividade enzimática pela cepa *Candida aaseri*

LMQA SNR 73 ($4,4 \pm 0,4 \text{ U.L}^{-1}$). Além disto, os dados não ressaltaram uma espécie predominante.

Mesmo com baixa atividade enzimática observada pelas cepas no teste quantitativo, as cepas demonstraram que a via de expressão e secreção de enzimas é estimulada mesmo em ambientes escassos. Estas cepas apresentam o potencial de aplicação em processos que tenham como prerrogativa a transformação branda do substrato, como observada para a malteação em cevada [53]. Meios nutricionalmente mais ricos e complexos que favoreçam a via de síntese proteica específica e o melhor ajuste do pH e da temperatura podem contribuir significativamente para o aumento da produtividade. Matos et al., 2013 descreve a produção de enzima pectinolítica por *W. anomalus* na ordem de 51 U.mL^{-1} em meio glicose, YNB (base de nitrogênio para levedura), e pectina cítrica [73]. Os resíduos industriais e agroindustriais podem conferir a bagagem nutricional necessária para a produção de enzima e ainda reduzir o custo de produção [27]. De acordo com avaliação dos dados quantitativos, a cepa *W. anomalus* LMQA CSC 5 e 43 são as mais promissoras para o processo de otimização, visto a possibilidade de biossíntese de pectinase, amilase e xilanase pela mesma cepa.

Além da produção de enzimas, os estudos com as leveduras não-convencionais estão chamando a atenção do setor industrial. *W. anomalus* é avaliada com espécie promissora para a produção de biocombustíveis de segunda geração. Isso devido a capacidade desta espécie em metabolizar resíduos da produção de biodiesel, fermentar xilose, capacidade de crescer em ambientes com baixa tensão de oxigênio, pH baixo e alta pressão osmótica [7]. E também para a indústria de bebidas fermentadas pela capacidade de sintetizar enzimas (β -D-glicosidase, α -L-arabinofuranosidase e β -D-xylosidase) que auxiliam na liberação de substâncias de sabor e aroma como monoterpenóis, e por sintetizar bioflavors frutados e refrescantes em bebidas fermentadas [3, 7, 19, 59]. Além da *W. anomalus*, as espécies *T. delbrueckii* e *P. kudriavzevii* são biologicamente seguras e ganham destaque diante da necessidade de oferecer produtos funcionais e sensorialmente diferenciados [3, 17, 19, 20, 59, 60].

T. delbrueckii vem sendo biotecnologicamente reconhecida pela capacidade de sintetizar bioflavors frutados através da enzima β -D-glicosidase [3, 19]. Também é destacada pela capacidade de conferir reduzido teor de álcool sem comprometer outras características sensoriais [17, 19, 59]. *P. kudriavzevii* que vem ganhando espaço pela síntese de bioflavors frutados e pela atuação na redução de ácido málico, características interessantes para a produção de vinhos [59]. Em adição, *P. kudriavzevii* apresenta a capacidade de tolerar

derivados de furanos (5-HMF), relevante característica para a produção de bioetanol de segunda geração [5].

Por muito tempo estas cepas foram subestimadas e consideradas contaminantes e indesejáveis. Este descaso é evidenciado pelo maior número de estudos focados em *Saccharomyces* (muitos deles sobre diversidade) provenientes de amostras de cachaçaria. Todavia, este cenário está mudando, e novas aplicações biotecnológicas estão sendo descobertas para com estas espécies menos descritas [1, 3–5]. Não investigar esta expressiva parcela dos isolados deste trabalho representaria subestimar o potencial biotecnológico proveniente da produção de cachaça e do resíduo da produção cerveja.

A análise global dos dados demonstrou que não houve relação entre a produção de exoenzimas e uma espécie específica, embora seja alta a representatividade da espécie *W. anomalus* para esta característica. A falta de correlação entre as espécies e características específicas também foi descrita por You et al., (2016) em fermentação espontânea de licor de sabor forte de Yibin - China [29]. Contudo, num esforço para direcionar a origem das cepas e as características fenotípicas predominantes, foram expressas as porcentagens da representatividade descrita sessão 3.6. Diante destes dados foi possível ressaltar que o fermento sem o reciclo de células (SNR) é mais favorável para o isolamento de cepas produtoras de ascósporos, o fermento com o reciclo de células (SRC) para o isolamento de cepas resistentes à actidiona, o fermento caipira (CSC) para o isolamento de leveduras produtoras de exoenzimas, e o bagaço e malte cervejeiro (BSG) para o isolamento de cepas tolerantes à temperatura de 45 °C.

5. Conclusões

O perfil fenotípico obtido neste trabalho revelou que 16,4 % das cepas apresentaram duas ou mais características fenotípicas com possível relevância biotecnológica. Deste total de cepas com mais uma característica fenotípica relevante, 2/3 são leveduras não-*Saccharomyces*. A diversidade de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* isoladas nas amostras da produção de cachaça e do bagaço de malte da indústria cervejeira representam valiosa ferramenta para o conhecimento científico e aplicação em bioprocessos.

Os resultados obtidos com este trabalho ressaltaram a importância da espécie *S. cerevisiae* na formação de ascósporos. Esta condição fenotípica apresentada por 85,9 % das

cepas desta espécie favorece a triagem de variantes gênicos com melhor desempenho em microencapsulação. Também dentre as *Saccharomyces* foi possível ressaltar a capacidade de expressão de fator *Killer* pela cepa LMQA SNR 70. Característica que favorece a competitividade e resiliência em ambientes adversos, como observado em fermentação.

O sucesso da triagem e emprego da diversidade de leveduras em biotecnologia também prevê o controle de contaminantes e a detecção de espécies indesejáveis. A espécie potencialmente patogêna *Candida parapsilosis* foi recuperado das amostras provenientes da produção de cachaça. Os testes com os antifúngicos natamicina e actidiona demonstraram diferente potencial de ação. A natamicina apresentou maior capacidade para a inativação não seletiva das leveduras isolada, enquanto que a actidiona na mesma concentração foi capaz de permitir o desenvolvimento de todas as cepas de *C. parapsilosis*. Com isso, foi possível afirmar que a natamicina é um potencial agente no tratamento de infecções com esta espécie, enquanto que a actidiona pode ser empregada para a triagem clínica e biotecnológica.

E por fim, a capacidade da síntese de exoenzimas destacada principalmente para a espécie *W. anomalus* destaca o potencial das leveduras não-*Saccharomyces*. A capacidade enzimática também foi observada em *Pichia*, *Candida* e *Torulaspora*. O potencial enzimático atrelado à capacidade de síntese de compostos de sabor e aroma vem estimulando a utilização de leveduras não-*Saccharomyces* selecionadas pela indústria de bebidas fermentadas. O emprego de leveduras não usuais decorre da demanda por produtos funcionais e sensorialmente diferenciados. O setor de biocombustíveis também reconhece essas leveduras como uma saída promissora para os desafios da utilização de matérias-primas diversificadas. Assim como a possibilidade de uso das leveduras *S. cerevisiae* CSC 23, 106, BSG 5.1, *C. lusitaniae* BSG 3, *P. kudriavzevii* BSG 4 em processos com temperatura acima de 40 °C, reduzindo os custos com resfriamento de dornas em países tropicais.

Agradecimentos

Ao Prof. Alessandro Antonio Orelli Junior da FATEC- Piracicaba pelo conhecimento e por me apresentar o Neno Campanari, a quem agradeço pela doação das amostras da fermentação de cachaça. Ao Prof. Louis Bernard Klaczko do Laboratório de Genética, Ecologia e Evolução de Drosófila – UNICAMP pela disponibilização do microscópio acoplado com câmera fotográfica para a obtenção das imagens dos ascósporos. Ao Dr. Marcos Roberto Dias

Batista pelo apoio técnico na manipulação do microscópio. Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant CNPq 302763/2014-7) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

1. Johnson EA (2013) Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:503–517. doi: 10.1007/s00253-012-4497-y
2. Mattanovich D, Sauer M, Gasser B (2014) Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microb Cell Fact* 13:34. doi: 10.1186/1475-2859-13-34
3. Padilla B, Gil J V., Manzanares P (2016) Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Front Microbiol*. doi: 10.3389/fmicb.2016.00411
4. Walker GM (2011) *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:25–34. doi: 10.1007/s10482-010-9491-8
5. Radecka D, Mukherjee V, Mateo RQ, et al (2015) Looking beyond Saccharomyces: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Res*. doi: 10.1093/femsyr/fov053
6. Portugal CB, de Silva AP, Bortoletto AM, Alcarde AR (2016) How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Res Int*. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.022
7. da Conceição LEFR, Saraiva MAF, Diniz RHS, et al (2015) Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:237–246. doi: 10.1007/s10295-014-1528-y
8. Marini MM, Gomes FCO, Silva CLC, et al (2009) The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World J Microbiol Biotechnol* 25:235–242. doi: 10.1007/s11274-008-9884-2
9. Oliveira VA, Vicente MA, Fietto LG, et al (2008) Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaca Production. *Appl Environ Microbiol* 74:693–701. doi: 10.1128/AEM.01729-07
10. Vianna CR, Silva CLC, Neves MJ, Rosa CA (2008) *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93:205–217. doi: 10.1007/s10482-007-

9194-y

11. Lin CSK, Pfaltzgraff LA, Herrero-Davila L, et al (2013) Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy Environ Sci* 6:426. doi: 10.1039/c2ee23440h
12. Aggelopoulos T, Bekatorou A, Pandey A, et al (2013) Discarded Oranges and Brewer's Spent Grains as Promoting Ingredients for Microbial Growth by Submerged and Solid State Fermentation of Agro-industrial Waste Mixtures. *Appl Biochem Biotechnol* 170:1885–1895. doi: 10.1007/s12010-013-0313-0
13. Xiros C, Christakopoulos P (2012) Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste and Biomass Valorization* 3:213–232. doi: 10.1007/s12649-012-9108-8
14. Mussatto SI, Roberto IC (2006) Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J Chem Technol Biotechnol* 81:268–274. doi: 10.1002/jctb.1374
15. Hill A, (ed) (2015) *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, 1st ed. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Cambridge
16. Santos M, Jiménez J., Bartolomé B, et al (2003) Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chem* 80:17–21. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00229-7
17. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F, et al (2016) Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J Inst Brew* 122:569–587. doi: 10.1002/jib.381
18. García M, Esteve-Zarzoso B, Arroyo T (2016) Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production. In: Loira AM and I (ed) *Grape Wine Biotechnol.*, Open acces. InTech, pp 249–271
19. Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB (2016) Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res Int* 86:112–120. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.002
20. Suárez-Lepe JA, Morata A (2012) New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci Technol* 23:39–50. doi: 10.1016/j.tifs.2011.08.005
21. Basso LC, de Amorim H V., de Oliveira AJ, Lopes ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 8:1155–1163. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x
22. Steensels J, Verstrepen KJ (2014) Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and

- Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annu Rev Microbiol* 68:61–80. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-113025
23. Brexó RP, Sant’Ana AS (2017) Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renew Sustain Energy Rev* 73:423–434. doi: 10.1016/j.rser.2017.01.151
 24. Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF (2013) Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol Biofuels* 6:151. doi: 10.1186/1754-6834-6-151
 25. Nandy SK (2016) Bioprocess Technology Governs Enzyme Use and Production in Industrial Biotechnology: An Overview. *Enzym Eng*. doi: 10.4172/2329-6674.1000144
 26. Harris P V, Xu F, Kreel NE, et al (2014) New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Curr Opin Chem Biol* 19:162–170. doi: 10.1016/j.cbpa.2014.02.015
 27. Bocchini Martins DA, do Prado HFA, Ribeiro Leite RS, et al (2011) Agroindustrial Wastes as Substrates for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. *Integr Waste Manag - Vol II*. doi: 10.5772/23377
 28. Maturano YP, Rodríguez Assaf LA, Toro ME, et al (2012) Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 155:43–50. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.015
 29. You L, Wang S, Zhou R, et al (2016) Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. *J Inst Brew* 122:517–523. doi: 10.1002/jib.352
 30. Pitt JI, Hocking AD (2009) *Fungi and Food Spoilage*. doi: 10.1007/978-0-387-92207-2
 31. Da Silva N, Taniwaki MH, Junqueira VC, et al (2012) Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. CRC Press, London, UK
 32. Lima JR de, Gonçalves LRB, Brandão LR, et al (2013) Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *J Basic Microbiol* 53:590–599. doi: 10.1002/jobm.201200049
 33. Fowell RR (1965) The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *J Appl Bacteriol* 28:373–383.
 34. Lachance, M. A., Bowles, J. M., Starmer, W. T. & Barker, J. S. F. (1999). *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Can J Microbiol* 45, 172–177.

35. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
36. Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*, Oxford Uni. New York, NY
37. Ceccato-Antonini SR, Tosta CD, Silva AC da (2004) Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Brazilian Arch Biol Technol* 47:13–23. doi: 10.1590/S1516-89132004000100003
38. Rosa-Magri MM, Tauk-Tornisielo SM, Ceccato-Antonini SR (2011) Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. *Brazilian Arch Biol Technol* 54:1–5. doi: 10.1590/S1516-89132011000100001
39. Han S-M, Hyun S-H, Lee HB, et al (2015) Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers Collected around Jangseong Lake in Jeollanam-do, Republic of Korea, and Characterization of the Unrecorded Yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiology* 43:266. doi: 10.5941/MYCO.2015.43.3.266
40. Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds) *yeasts, a Taxon. study*, 4th ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 7–100
41. Mueller G (2011) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Academic Press, Burlington, MA
42. Buchanan BW, Lloyd ME, Engle SM, Rubenstein EM (2016) Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/53975
43. Mohamed MAN, Ranjard L, Catroux C, et al (2005) Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *J Microbiol Methods* 60:31–40. doi: 10.1016/j.mimet.2004.08.008
44. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (1990) *Yeasts: Characteristics and Identification*. 1295.
45. Fleet GH (1993) The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. In: *Wine Microbiol. Biotechnol.* Academic Publishers, Switzerland, pp 1–25
46. Freitas Schwan R, T. Mendonça A, da Silva Jr. JJ, et al (2001) Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79:89–96. doi: 10.1023/A:1010225117654

47. Pataro C, Guerra JB, Gomes FCO, et al (2002) Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. *Brazilian J Microbiol* 33:202–208. doi: 10.1590/S1517-83822002000300003
48. Buzzini P, Martini A (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *J Appl Microbiol* 93:1020–1025. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01783.x
49. Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31:426–428. doi: 10.1021/ac60147a030
50. Francisco de AS e S, Carlos AV de A (2016) The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African J Agric Res* 11:3733–3740. doi: 10.5897/AJAR2016.11522
51. Robertson JA, I'Anson KJA, Treimo J, et al (2010) Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Sci Technol* 43:890–896. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.019
52. Lopes ML, Paulillo SC de L, Godoy A, et al (2016) Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian J Microbiol* 47:64–76. doi: 10.1016/j.bjm.2016.10.003
53. Laitila A, Sarlin T, Raulio M, et al (2011) Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). *Antonie Van Leeuwenhoek* 99:75–84. doi: 10.1007/s10482-010-9511-8
54. Portugal CB, Alcarde AR, Bortoletto AM, de Silva AP (2016) The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. *Eur Food Res Technol* 242:1587–1597. doi: 10.1007/s00217-016-2659-3
55. Guerra JB, Araujo RAC, Pataro C, et al (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Lett Appl Microbiol* 33:106–111. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00959.x
56. Nova MXV, Schuler ARP, Brasileiro BTRV, Moraes MA (2009) Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiol* 26:460–466. doi: 10.1016/j.fm.2009.02.005
57. Pataro C, Guerra JB, Petrillo-Peixoto ML, et al (2000) Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal

- fermentation in Brazil. *J Appl Microbiol* 89:24–31.
58. Gomes FCO, Silva CLC, Marini MM, et al (2007) Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *J Appl Microbiol* 103:2438–2447. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03486.x
 59. Varela C (2016) The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9861–9874. doi: 10.1007/s00253-016-7941-6
 60. Tataridis P, Kanelis A, Logotetis S, Nerancis E (2013) Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zb Matice Srp za Priir Nauk* 415–426. doi: 10.2298/ZMSPN1324415T
 61. Albergaria H, Arneborg N (2016) Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:2035–2046. doi: 10.1007/s00253-015-7255-0
 62. Schmitt MJ, Breinig F (2002) The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev* 26:257–276. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00614.x
 63. Boynton PJ, Greig D (2014) The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast* 31:449–462. doi: 10.1002/yea.3040
 64. Shi L, Li Z, Tachikawa H, et al (2014) Use of Yeast Spores for Microencapsulation of Enzymes. *Appl Environ Microbiol* 80:4502–4510. doi: 10.1128/AEM.00153-14
 65. Zhang H, Tachikawa H, Gao X-D, Nakanishi H (2014) Applied Usage of Yeast Spores as Chitosan Beads. *Appl Environ Microbiol* 80:5098–5105. doi: 10.1128/AEM.00677-14
 66. Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52:536–553.
 67. Neiman AM (2005) Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:565–584. doi: 10.1128/MMBR.69.4.565-584.2005
 68. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:606–625. doi: 10.1128/CMR.00013-08
 69. Belda I, Conchillo LB, Ruiz J, et al (2016) Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *Int J Food Microbiol* 223:1–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003
 70. Bon E. P. S. et al (2008) Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ:FCT [Portugual]

71. Ahmed I, Zia MA, Hussain MA, et al (2016) Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J Radiat Res Appl Sci* 9:148–154. doi: 10.1016/j.jrras.2015.11.003
72. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC (2006) Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *J Cereal Sci* 43:1–14. doi: 10.1016/j.jcs.2005.06.001
73. Martos MA, Zubreski ER, Garro OA, Hours RA (2013) Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnol Res Int* 2013:1–7. doi: 10.1155/2013/435154
74. Kumar, A. D., Kumar, S., Dutt, S. C., & Chand, D. (2012). Strain and a novel process for ethanol production from lignocellulosic biomass at high temperature. *U.S. Patent No. 8,268,600*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

CAPÍTULO 4

DESTILARIA DE CACHAÇA ARTESANAL E RESÍDUO DA
INDUSTRIA CERVEJEIRA: FONTES DE ISOLAMENTO DE
LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
BIOETANOL

ENVIROMMENT OF ARTISANAL CACHAÇA DISTILLERY AND BREWER'S SPENT
GRAIN AS SOURCE OF YEASTS WITH POTENTIAL FOR BIOETHANOL
PRODUCT

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“New Biotechnology”

Destilaria de cachaça artesanal e resíduo da indústria cervejeira: fontes de isolamento de leveduras com potencial para a produção de bioetanol

Ramon P. Brexó¹, Maria da Graça S. Andrietta², Gislaine C. N. Faria³, Anderson S. Sant'Ana^{1*}

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

²Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas

³Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

*Autor correspondente: Prof. A. S. Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brasil. Fone: +55(19) 3521-2174.

Resumo

Este trabalho apresenta quatro procedimentos distintos e graduais para a triagem, seleção e agrupamento de leveduras. As 134 cepas de levedura provenientes da produção de cachaça artesanal e bagaço de malte cervejeiro foram distinguidas por meio da análise da morfologia celular, fermentação de triagem em xarope de cana-de-açúcar diluído, determinação dos parâmetros fermentativos em fermentação em meio sintético e a cariotipagem em gel com campo pulsado (PFGE). Do total de cepas estudadas, 14,9 % apresentaram células com morfologia em floco de neve e não foram consideradas para as outras etapas. A fermentação com xarope de cana-de-açúcar foi realizada para 71 *Saccharomyces cerevisiae*, 19 *Torulaspora delbrueckii*, 8 *Wickerhamomyces anomalus*, 6 *Candida parapsilosis*, 5 *Pichia manchurica*, 3 *Candida intermedia*, 2 *Clavispora lusitaniae* e 1 *Candida aaseri*. Dentre as 10 cepas selecionadas, *T. delbrueckii* LMQA BSG 7 e *S. cerevisiae* LMQA SNR 65 apresentaram relevantes características fermentativas. O rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade destas cepas foram similares ou superiores às cepas industriais PE-2 e CAT-1 testadas concomitantemente. Os dados da cariotipagem revelaram que a capacidade fermentativa não é correlacionável com os perfis de bandas obtidos.

Palavras-chave: Fermentação, *Saccharomyces*, *Torulaspora delbrueckii*, biocombustível

1. Introdução

O bioetanol é uma alternativa real para os combustíveis fósseis por apresentar alto balanço positivo de energia e equilíbrio na razão das emissões de gases de efeito estufa [1–3]. A base do processo industrial de produção do etanol de cana-de-açúcar é a fermentação por leveduras da solução açucarada com concentração entre 150 a 200 g.L⁻¹ de açúcares totais provenientes da cana de açúcar [2,4–6].

Atualmente o potencial brasileiro de produção de bioetanol é de aproximadamente 27,5 bilhões de litros por safra [1]. Apesar disso e dos mais de 40 anos de avanços no processo produtivo do bioetanol no Brasil, as projeções atuais ressaltam a necessidade de medidas complementares que contribuam para a competitividade econômica deste combustível [3]. Uma destas medidas, é a seleção de leveduras que resultem num aumento de produtividade e redução de custos para a produção de bioetanol [3,7] sendo uma vertente essencial para o estudo de biodiversidade e um desafio científico a ser explorado.

A bioprospecção de leveduras que ocorrem naturalmente em ambientes distintos ou são oriundas de resíduos diversos pode ser uma alternativa para a obtenção de cepas com características desejáveis para aplicações industriais [2]. A fermentação artesanal de cachaça e o resíduo de malte fermentado de cervejaria podem ser relevantes nichos para esta exploração, principalmente pela alta diversidade genética relatada na cachaça [8], e a escassez de trabalhos com este viés para o resíduo de cervejaria.

Estudos da biodiversidade da cachaça apresentam grande potencial para oferecer ferramentas biológicas capazes de melhorar a performance industrial ou gerar novos processos [9]. Intrinsecamente as melhorias resultantes da bioprospecção de leveduras asseguram aos processos biotecnológicos (como a produção de biocombustíveis) a manutenção da sustentabilidade a médio e longo prazo [9], além de contribuir para o reconhecimento do patrimônio cultural e biológico regional [8,9].

A cachaça é uma bebida típica brasileira produzida pela destilação do mosto de cana-de-açúcar fermentado [10,11]. A técnica de produção artesanal é um patrimônio cultural e está intimamente impressa aos traços geográficos regionais [10]. A produção artesanal da cachaça varia de região para região, pois cada produtor adota diferentes práticas no preparo do inóculo espontâneo (fermento caipira) conferindo características específicas para cada processo [11].

A composição microbiana na fermentação espontânea apresenta variações decorrentes da região geográfica e do tipo de solo, condições climáticas, resíduo de pesticidas, as técnicas de colheita e estado de maturação da cana-de-açúcar [11]. Entre os principais fatores adversos encontrados nas fermentações espontâneas da cachaça estão: a) a alta competição microbiana intra e interespecífica; b) as flutuações na temperatura do sistema fermentativo; c) o aumento gradativo da concentração de etanol durante a fermentação; d) as flutuações osmóticas e a baixa atividade de água devido à alta concentração de açúcares no mosto inicial (18 a 20 ° Bx); e) o constante reuso do fermento decantado ao final da fermentação (pé-de-cuba) [8,9,12,13]. Alterações no pH também contribuem para a pressão seletiva do sistema. A redução do pH do mosto de fermentação ao redor de 3 é frequentemente observado pela secreção de prótons e produção de ácidos orgânicos pela microbiota [14].

O resíduo de malte da indústria cervejeira (bagaço de malte cervejeiro) representa 85% dos co-produtos gerados por este setor, sendo constituído predominantemente por casca rica em açúcares complexos, minerais e proteínas [15]. Devido a composição nutricional e a umidade este resíduo é favorável ao desenvolvimento microbiano [16]. Este subproduto é energeticamente rico possibilitando a obtenção de etanol sem a necessidade de pré-tratamento [17]. Apesar do potencial, a diversidade microbiana neste tipo de resíduo ainda é pouco explorada e reportada.

A possibilidade de incrementar o setor alcooleiro com a exploração da fermentação de cachaça artesanal e o bagaço de malte cervejeiro estimularam a procura por novos recursos microbianos. Com o intuito de analisar a capacidade biotecnológica das cepas, o objetivo deste trabalho foi percorrer as etapas de análise morfológica da célula, fermentação de triagem, determinação dos parâmetros fermentativos, e a cariotipagem para a seleção e agrupamento das cepas estudadas visando a aplicação em fermentação industrial de primeira geração. Inicialmente foi realizada a triagem total das cepas diante da morfologia celular e a triagem fermentativa em meio xarope de cana-de-açúcar diluído. A partir da resposta fermentativa, as cepas com melhor desempenho fermentativo foram selecionadas e caracterizadas em função do rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade. A cariotipagem foi realizada em gel pulsado para a comparação com os parâmetros fermentativos e agrupamento das cepas selecionadas de acordo com o perfil de bandas.

2. Material e métodos

2.1. Triagem fermentativa com xarope de cana-de-açúcar

2.1.1. Micro-organismos

Foram testadas 134 cepas provenientes das amostras do processo produtivo da cachaça artesanal e do resíduo de bagaço de malte cervejeiro. As cepas foram denominadas de acordo com a amostra de origem. Para as cepas provenientes do processo produtivo da cachaça artesanal foi estipulado LMQA CSC + N° para as cepas provenientes da amostra do fermento caipira com 24 horas (n=51); LMQA SNR + N° para as cepas provenientes do fermento caipira pronto sem o reciclo de células (n=41); LMQA SRC + N° para as cepas provenientes do fermento caipira reciclado (informalmente denominado como pé-de-cuba) (n=34). Para as cepas provenientes do bagaço de malte cervejeiro (n=8) foi usada a denominação LMQA BSG + N°. Estas cepas estão depositadas na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Quantitativa de Alimentos (LMQA/FEA/UNICAMP). O isolamento e manutenção das cepas estão descrito em Brexó & Sant'ana (2017) [18].

Para a comparação da capacidade fermentativa, foram adotadas as cepas PE-2 e CAT-1 cedidas pela empresa de biotecnologia FERMENTEC Ltda. Estas cepas são amplamente usadas pelo setor sucroalcooleiro principalmente pelo alto rendimento em etanol e pela manutenção da viabilidade durante inúmeros reciclos de células [2,7].

As cepas foram mantidas congeladas em caldo de extrato de malte – (MEB) [20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), 20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA), pH final 6.7) suplementado com 30% v/v de glicerol (Dinâmica, Diadema, Brazil).

2.1.2. Preparo do mosto para a fermentação

A matéria-prima para o preparo do mosto foi o xarope de cana-de-açúcar cedida pela Usina Granelli (Charqueada - São Paulo – Brasil). O xarope na concentração de aproximadamente 63 ° Bx foi acondicionado em embalagem plástica PET e mantido em câmara fria a -5 ° C.

O mosto para a fermentação foi preparado através da diluição do xarope em água destilada até 13 ° Bx, e posteriormente suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Inlab, São Paulo, Brazil) para a inibição do crescimento bacteriano. O xarope diluído foi autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1 atm para a certificação da ausência de micro-organismos exógenos.

2.1.3. Preparo do inóculo

Para utilização nos experimentos de fermentação, as cepas foram reativadas em agar extrato de malte – (MEA) [20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brazil), 20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), 20 g.L⁻¹ agar (Kasvi, Curitiba, Brazil), 1 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA) suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Inlab, São Paulo, Brazil) a 25°C por 7 dias.

As suspensões de células foram preparadas através de dois repiques sucessivos com intervalo de 48 horas em tubos contendo 10 mL de MEB-cloranfenicol incubado a 30 °C. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas durante 5 minutos a 3,836 × g na temperatura de 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). O procedimento de lavagem com 10 mL de água peptonada (Acumidia, Lansing, EUA) 0,1 % e centrifugação foi repetido por três vezes e o sobrenadante resultante foi descartado. As células foram ressuspensas em 5 mL xarope de cana-de-açúcar estéril na concentração de 13 ° Bx. A suspensão resultante foi quantificada em câmara de Neubauer com solução de azul de metileno (ECIBRA, São Paulo, Brazil) 0,5 % m/v. A metodologia para a contagem celular em câmara de Neubauer está descrita nos **Materiais Suplementares**.

Para a fermentação foram consideradas somente as culturas com células livres. A triagem das células naturalmente floculantes foi realizada pela observação microscópica durante a contagem em câmara de Neubauer. Foram escolhidas para a fermentação as culturas unicelulares. As culturas que apresentaram aglomerados celulares com morfologia esférica, em floco de neve ou pseudo-hifa foram desconsideradas para a etapa de fermentação.

2.1.4. Fermentação

A avaliação da capacidade fermentativa foi realizada em tubos de ensaio (18 × 180 mm) contendo 50 mL de mosto de xarope de cana-de-açúcar estéril. O início da fermentação ocorreu com a inoculação de 0,5 mL da suspensão de células, resultando na concentração inicial de aproximadamente 10^6 células por mL. Cada suspensão foi inoculada em três tubos distintos. As fermentações procederam sem agitação a 30 ° C durante 20 horas. O mosto foi analisado no início e no final de cada processo fermentativo quanto à concentração de células, pH, sólidos solúveis e concentração de etanol.

2.1.5. Análise das fermentações

A concentração de células foi quantificada em câmara de Neubauer de acordo com a metodologia descrita no preparo do inóculo e detalhado nos Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice.

O pH das fermentações foi analisado com potenciômetro manual AK 103 (AKSO, São Leopoldo, Brazil). O equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante e as amostras lidas através da submersão do eletrodo do pHmetro no mosto. Foram considerados os resultados após a completa estabilização dos valores no visor.

A concentração de sólidos solúveis foi quantificada em refratômetro Digital Hand-held "Pocket" Refratômetro PAL – (ATAGO, Toquio, Japan). O aparelho foi zerado com água destilada e as análises realizadas com 100 µL das amostras. Como o objetivo desta avaliação global era a seleção das cepas com melhor capacidade metabólica para a produção de etanol, as fermentações que apresentaram variação da concentração de sólidos solúveis inferior a 2 ° Bx não foram consideradas para a quantificação de etanol. Este critério foi adotado pois o consumo incipiente de substrato é um indicativo de baixa atividade metabólica e consequentemente baixa produção de etanol.

A determinação da concentração de etanol foi feita por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID). Para esta análise, a porção de 1 mL do mosto fermentado de cada uma das 3 replicatas foi depositada e homogeneizada em um frasco de vidro (frasco de penicilina 8 mL). Esta amostra resultante de 3 mL foi filtrada em filtro para

seringa 13mm/0.45µm (Jet-Biofil, Guangzhou, China) e preparada para a análise. As amostras foram preparadas em frasco de cromatografia de 2 mL (Agilent, Deutschland, Germany). O preparo foi realizado com a homogeneização vigorosa de 100 µL da amostra filtrada, 10 µL de padrão interno N-propanol e 800 uL e de acetato de etila. O acetato de etila foi utilizado como solvente para a extração do etanol da amostra, e o N-propanol foi utilizado como padrão interno evitar distorções pelo sistema cromatográfico [19,20]. As injeções das amostras prontas foram realizadas manualmente no cromatógrafo gasoso CG-FID Agilent Technologies 6890N Network System - Agilent Column HP-5ms, Length 30 m, ID 0.25 mm, Film 0.25 µm, Configuration 7 inch cage (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA). As condições de corrida usadas foram: inlet a 90 °C, 51kPa e fluxo de H₂ de 136,9 mL.min⁻¹, Split 100:1. Fluxo de coluna em 1,3 mL.min⁻¹ (36 cm/s), rampa de temperatura iniciando a 35 °C por 3 minutos, em seguida aumentando na razão de 50 °C.min⁻¹ até atingir 200 °C. O tempo total das corridas foi de 6,7 minutos. Cada amostra foi injetada 3 vezes. A concentração de etanol foi dada a partir da razão entre a área do pico de etanol e N-propanol ($\frac{Etanol}{N-propanol}$) correlacionados com os valores expressos na curva padrão (**Materiais Suplementares - Apêndice**) previamente determinada em % v/v de etanol [19,20].

2.2. Determinação dos parâmetros fermentativos em meio sintético

Para a fermentação em meio sintético foram selecionadas 12 cepas. Dentre elas foram consideradas nove cepas provenientes das amostras da cachaçaria artesanal e do bagaço de malte cervejeiro com maior produção de etanol no teste preliminar de fermentação. Também foi considerada randomicamente uma cepa com baixa produtividade de etanol no teste preliminar. Esta cepa foi incluída para avaliação da eficiência do teste preliminar. Além das cepas isoladas e estudadas no âmbito deste trabalho, também foram consideradas as cepas PE-2 e CAT-1

Para esta etapa, as fermentações foram realizadas visando avaliar:

$$\text{Rendimento em etanol} - Y_{p/s} = \frac{\Delta P_{(etanol)}}{-\Delta S_{(açúcar)}};$$

$$\text{Rendimento em massa celular} - Y_{x/s} = \frac{\Delta X_{(biomassa)}}{-\Delta S_{(açúcar)}};$$

$$\text{Produtividade} - \textit{Prod} = \frac{\Delta P_{(etanol)}}{\frac{V_{(volume)}}{T_{(tempo)}}}.$$

2.2.1. Preparo das fermentações e dos inóculos

As fermentações desta etapa foram realizadas em colaboração com a divisão de bioprocessos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas. Nestas fermentações foi utilizado o meio sintético para garantir a ausência de fatores externos que possam alterar a resposta celular nas fermentações. O preparo do meio de cultura e as análises das fermentações foram realizadas conforme descrito por Tosin et al. 2015 [21].

As fermentações foram preparadas em Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de meio estéril para fermentação [150 g.L⁻¹ sacarose (Synth, Diadema, Brazil), 6,0 g.L⁻¹ extrato de levedura (Difco, Detroit, EUA), 5,0 g.L⁻¹ fosfato de potássio dibásico (Synth, Diadema, Brazil), 1,0 g.L⁻¹ sulfato de magnésio heptahidratado (Synth, Diadema, Brazil), 1,0 g.L⁻¹ cloreto de potássio (Synth, Diadema, Brazil)]. O inóculo foi preparado com a suspensão em água destilada das células crescidas em “*slants*” de Agar batata dextrose – (PDA) (Difco, Detroit, EUA) por 24 horas a 30 °C. Após a inoculação de 10 mL da suspensão, a fermentação foi mantida sob agitação (150 rpm) em incubadora com agitação (New Brunswick Scientific G-25 Incubator Shaker, Enfield, EUA) a 32° C por 24 horas [21].

2.2.2. Análise das fermentações para a determinação dos parâmetros

Para expressar o rendimento de etanol (massa de etanol produzido por massa de açúcar consumido), rendimento em biomassa (massa de células em relação ao açúcar consumido) e a produtividade (massa de etanol produzido por litro de meio por hora de fermentação) as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC e gravimetria.

Para a determinação da concentração de etanol e sacarose foi utilizado o HPLC com bomba binária 1525, injetor automático 2707, detector de índice de refração 2404, e coluna Shodex[®] KS – 801 COL (Waters, Milford, EUA). A injeção foi realizada automaticamente com 10uL por 20 minutos, com fluxo isocrático de 0,7 mL.min⁻¹ em coluna na temperatura de 65° C e detector a 40° C. Foi utilizado água como solvente. Os dados foram tratados com o Waters Breeze[™] 2 Software.

Os frascos foram pesados antes e depois da fermentação para a avaliação do balanço de massa. A quantificação da massa celular seca foi realizado por gravimetria em balança de precisão analítica (Scientech, Pinhais, Brasil).

2.3. Comparação molecular por cariotipagem

As mesmas leveduras selecionadas para as análises dos parâmetros fermentativos de rendimento em etanol e célula e produtividade foram comparadas utilizando uma ferramenta de biologia molecular denominada cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (Karyotyping by PFGE).

Para esta etapa uma porção de aproximadamente 3 mg de biomassa úmida crescida em PDA de cada cepa foram tratadas de acordo com o protocolo proposto por Blondin and Vezinhét (1988)[18,22,23]. A eletroforese em gel de agarose com campo pulsado (PFGE) foi realizado como a técnica de eletroforese de campo alternativo transversal (TAFE) utilizando o equipamento CHEF III[®] System (Bio-Rad, Hercules, EUA) ajustado a 6 V cm^{-1} : 1 h com pulsos de 5 segundos, seguido por 8 horas com pulsos de 60 segundos e finalizado com 12 horas com pulsos de 100 segundos de acordo com a metodologia descrita por Basso et al. (2008)[7]. Após a corrida, o gel de agarose foi corado por 40 minutos com brometo de etídio e lavado com o tampão TAFE ($0,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) durante 30 minutos. O gel foi analisado sob luz ultravioleta (UVP BioImagem System, Upland, Canada) [21].

2.4. Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicatas e os dados apresentados pela média das três determinações com o desvio padrão correspondente (média $\pm$ desvio padrão). Em todos os testes foram considerados como parâmetro comparativo as cepas industriais PE-2 e CAT-1.

Os dados de pH, variação da concentração do substrato e da concentração de células, e concentração de etanol obtidos pelas melhores cepas fermentadoras, assim como os dados de rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade foram analisados pela análise de variância ANOVA. A diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os dados da concentração de etanol (dados com distribuição normal) foi determinada por meio do teste

paramétrico de Scott-Knott. A diferença estatística ao nível de 5 % de significância para os demais parâmetros analisados (não-normais) foi determinada utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

A comparação das cepas considerando simultaneamente o rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade foi realizado pela análise de componentes principais (PCA).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no do software Assistat versão 7.7 pt – free software - 2017 (Campina Grande, Brasil) [52].

3. Resultados e discussão

3.1. Morfologia celular

Das 134 cepas analisadas, 14,9 % (n= 20) apresentaram morfologia em floco de neve, sendo 17 *Saccharomyces cerevisiae* (LMQA CSC 3, 8, 11, 15, 24, 26, 41, 48 (n=8); LMQA SNR 66, 70, 85 (n=3); LMQA SRC 107, 122, 124, 128, 137, 149 (n=6)), 2 *Wickerhamomyces anomalus* (LMQA CSC 41 e LMQA SNR 99) e 1 *Candida pseudointermedia* (LMQA SNR 74). Dentre as cepas triadas pela observação do inóculo das fermentações, nenhuma cepa apresentou formação de pseudo-hifas (células-alongadas) ou floculação por conglomeração de células (formação de grumos).

A observação da morfologia celular foi realizada com objetivo de distinguir as leveduras com capacidade de floculação e sedimentação durante o preparo do inóculo para a fermentação. A decantação de células é uma característica indesejada para a fermentação indústria de etanol combustível, pois contribui para a redução do rendimento fermentativo e atrapalha o processo de centrifugação para o reciclo de células [7,22–24]. Diferentemente da floculação celular, a morfologia em floco de neve apresenta constituição entre células parentais [25]. O processo conhecido como floculação é bem descrito pela literatura e ocorre pela adesão entre células através de glicoproteínas de membrana [25,26]. A floculação também pode ocorrer pelo estímulo da expressão de α -glucanas de superfícies em resposta ao estresse etanólico [27] ou por ação de bactérias contaminantes [28,29]. Entretanto a morfologia em floco de neve é uma característica inerente da cepa ocasionada pela deficiência

na separação das células filhas após a mitose [25]. As cepas com este tipo de conformação triadas neste trabalho apresentavam a característica distribuição radial tridimensional das células como reportado na revisão de Ratcliff & Travisano [25]. Além disso, o acompanhamento do desenvolvimento celular destas cepas para o preparo do inóculo revelou incipiente propagação celular, baixo consumo de substrato e sedimentação. Estas características são indesejadas em cepas produtoras de etanol combustível [18]. Por estes motivos, as 20 cepas com estas características não foram consideradas para as demais etapas deste trabalho.

3.2. Fermentação de triagem em xarope de cana-de-açúcar

Diante da seleção das cepas através da morfologia celular, foram consideradas 115 cepas para as fermentações de triagem do potencial fermentativo. Entre elas, 71 *Saccharomyces cerevisiae* (CSC n=31; SNR n=26; SRC n=13; BSG n=1), 19 *Torulaspora delbrueckii* (CSC n=5; SNR n=4; SRC n=6; BSG n=4), 8 *Wickerhamomyces anomalus* (CSC n=5; SNR n=2; SRC n=1); 6 *Candida parapsilosis* (CSC n=1; SRC n=5); 5 *Pichia manchurica* (CSC n=2; SNR n=3); 3 *Candida intermedia* (SRC n=3); 2 *Clavispora lusitaniae* (BSG n=2) e 1 *Candida aaseri* (SNR n=1).

A etapa de seleção das cepas foi realizada em solução de xarope de cana-de-açúcar diluído (13 ° Bx) e com fermentações prolongadas (20 horas) na temperatura de 30 ° C para avaliar o potencial fermentativo individual das cepas em ambientes pouco estressantes. A triagem com estas condições teve como princípio mimetizar as condições naturais dos ambientes onde ocorre grande incidência de leveduras, como frutos, flores e vegetais [30]. Diferentemente das condições industriais de fermentação do bioetanol que utiliza o substrato com concentrações igual ou superior a 20 % w/v (aproximadamente 20 ° Bx) [7,31]. A escolha de condições brandas para as fermentações teve como objetivo avaliar a capacidade inata das células em converter o substrato em etanol [32,33].

O inóculo de 10^6 células por mL foi aplicado para avaliar a capacidade de multiplicação celular e adaptativa das cepas durante o período de fermentação de 20 horas. Ou seja, foi avaliada indiretamente a capacidade de adaptação ao ambiente fermentativo, multiplicação até níveis que promovam a fermentação eficiente. Em fermentações espontâneas a concentração de células de leveduras atinge entre 10^7 e 10^8 células por mL durante a fase tumultuosa (ápice

do processo fermentativo) mesmo na presença de contaminantes bacterianos e leveduras não-*Saccharomyces* [11]. A escolha da concentração do inóculo teve como premissa o fato das linhagens que apresentam maior capacidade de absorção do substrato, síntese significativa de biomassa e alta produção de etanol serem melhores competidoras. Estas cepas apresentam maior capacidade de domínio perante a dinâmica populacional microbiana presente em fermentações industriais, persistindo por mais tempo no processo [7].

As fermentações revelaram que 54 cepas apresentaram baixo consumo de nutrientes presentes no meio de cultura. Esta resposta foi revelada pela alteração inferior a 2 ° Bx referente aos sólidos solúveis presentes no meio de cultura. Dentre estas 54 leveduras com baixa capacidade de consumo do substrato, *S. cerevisiae* representou 24,0 % (n=13), *T. delbrueckii* 39,0 % (n=16), *W. anomalus* 17,0 % (n=7), *P. manshurica* 12,2 % (n=5), *C. intermedia* 7,3 % (n=3), *C. lusitaniae* 4,9% (n=2), *P. kudriavzevii* e *C. aaseri* 2,4 % (n=1). Estas cepas com baixo consumo do substrato foram desconsideradas para as análises subsequentes. O consumo eficiente do substrato é uma característica relevante para cepas selecionadas para a produção de etanol [7,34].

As demais cepas (n=61) apresentaram variação de sólidos solúveis no mosto de fermentação na faixa de variação entre 2 – 5.8 ° Bx, pH entre 0.84 – 1.5, concentração de células por mL entre 1.8 – 2.3 em log e concentração de etanol entre 0.31 – 4.82 % v/v, como mostrado nos gráficos apresentados na **Figura 1**.

A análise dos dados demonstrou não haver correlação direta entre os valores de pH, consumo de substrato, concentração de células e produção de etanol. A baixa variação do pH pode ser o reflexo das condições brandas e pelo controle da contaminação bacteriana devido à suplementação do mosto com cloranfenicol. Em fermentações contaminadas a redução do pH do mosto de fermentação para ao redor de 3 é frequentemente observada. Esta condição pode ser ocasionada pela secreção de prótons e produção de ácidos orgânicos pela microbiota contaminante [14,35]. A concentração final de células das cepas analisadas se assemelha aos dados da literatura sobre a concentração de células observado na fase de fermentação tumultuosa [11]. Além disso, os valores obtidos foram similares aos valores observados para as cepas industriais PE-2 e CAT-1 ($2,02 \pm 0,10$ células.mL⁻¹ e $2,16 \pm 0,07$ células.mL⁻¹ respectivamente), demonstrando boa capacidade adaptativa aos parâmetros fermentativos empregados. A concentração entre 4 e 5 % v/v de etanol apresentada pelas 12 cepas com melhor capacidade de síntese (Concentração de etanol – Figura 2) é condizente ao valor

obtido em fermentação por leveduras selvagens em caldo de cana-de-açúcar com a mesma concentração de substrato [36].

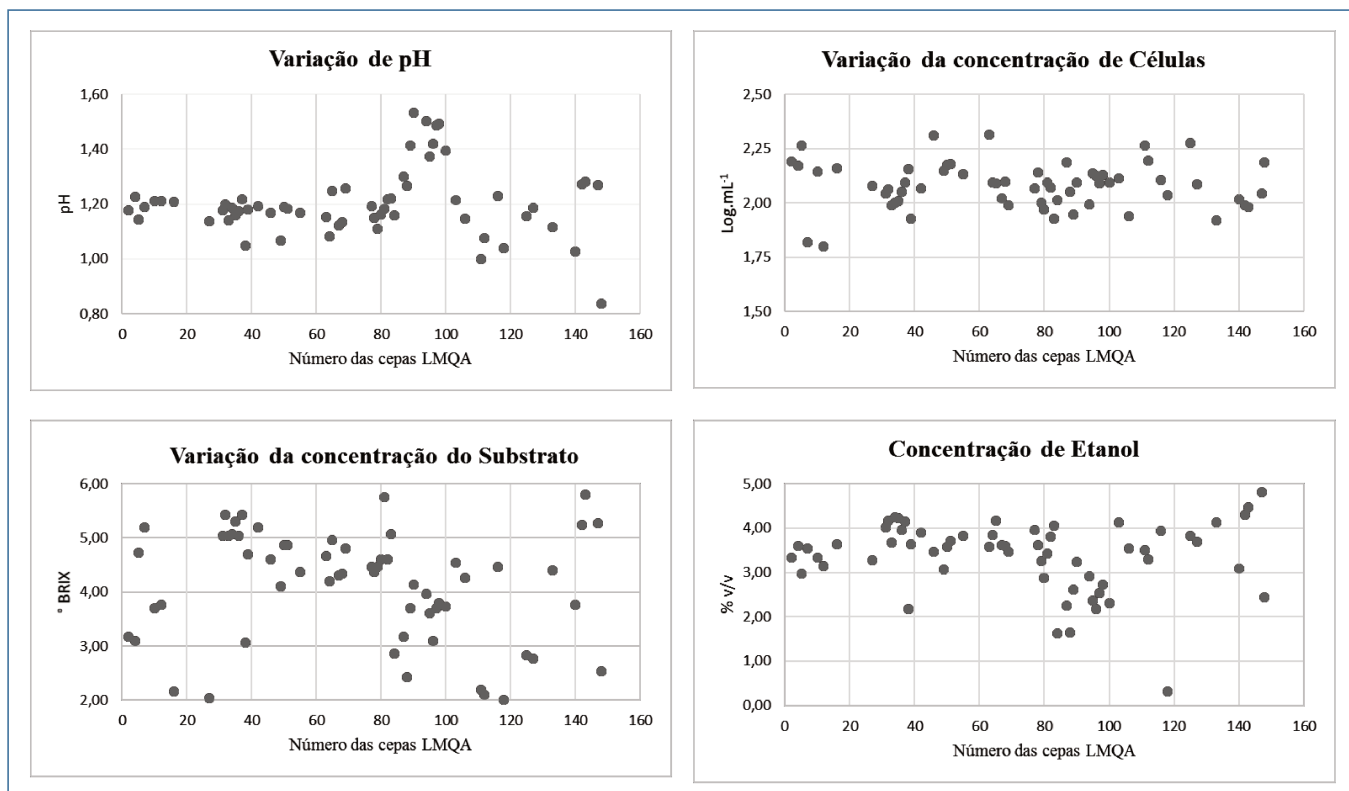


Figura 1- Distribuição dos dados da variação do pH, da concentração de células, da concentração do substrato, e a concentração de etanol obtidos com as fermentações de triagem em xarope de cana-de-açúcar. Os gráficos apresentam os dados das 61 cepas capazes de alterar a concentração do substrato fermentado acima da faixa de 2 ° Brix. A concentração de células foi expressa em log por mL, enquanto que a variação do substrato foi representada por ° brix e a concentração de etanol expressa por volume de etanol por volume de vinho.

Diante destes dados foi possível destacar as 10 melhores cepas para a produção de etanol, sendo todas *Saccharomyces cerevisiae*. Entre elas as cepas LMQA CRC 32, 34, 35 e 37; LMQA SNR 65 e 103; e LMQA SRC 133, 142, 143, e 147. Nenhuma cepa proveniente das amostras de bagaço de malte cervejeiro (LMQA BSG) apresentou destaque na produção de etanol em xarope de cana-de-açúcar. Os dados da variação de pH, sólidos solúveis, concentração de células e etanol destas 10 cepas em comparação com as cepas industriais CAT-1 e PE-2 apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Parâmetros analisados durante a fermentação das 10 cepas selecionadas com a melhor performance fermentativa em xarope de cana-de-açúcar.

<i>Espécie</i>	<i>Cepas</i>	Δ pH	Δ Substrato (° Brix)	Δ Célula (log. mL ⁻¹)	[] Etanol (% v/v)
<i>S. cerevisiae</i>	SRC 147 ^Θ	1,27 ± 0,03 ^A	5,27 ± 0,06 ^A	2,05 ± 0,11 ^A	4,82 ± 0,24 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	SRC 143 ^Θ	1,28 ± 0,03 ^A	5,80 ± 0,00 ^A	1,98 ± 0,02 ^A	4,47 ± 0,19 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	SRC 142 ^Θ	1,27 ± 0,02 ^A	5,23 ± 0,12 ^A	1,99 ± 0,06 ^A	4,31 ± 0,14 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	CRC 34 ^Θ	1,19 ± 0,07 ^A	5,07 ± 0,32 ^A	2,00 ± 0,16 ^A	4,25 ± 0,20 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	CRC 35 ^Θ	1,16 ± 0,01 ^A	5,30 ± 0,17 ^A	2,01 ± 0,06 ^A	4,22 ± 0,36 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	SNR 65 ^Θ	1,25 ± 0,01 ^A	4,97 ± 0,06 ^A	2,09 ± 0,08 ^A	4,17 ± 0,13 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	CRC 32 ^Θ	1,20 ± 0,01 ^A	5,43 ± 0,21 ^A	2,06 ± 0,11 ^A	4,17 ± 0,16 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	CRC 37 ^Θ	1,22 ± 0,03 ^A	5,43 ± 0,47 ^A	2,10 ± 0,16 ^A	4,15 ± 0,29 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	SNR 103 ^Θ	1,21 ± 0,06 ^A	4,53 ± 1,22 ^A	2,11 ± 0,13 ^A	4,13 ± 0,35 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	SRC 133 ^Θ	1,12 ± 0,05 ^A	4,40 ± 0,17 ^A	1,92 ± 0,70 ^A	4,12 ± 0,23 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	CAT 1 *	1,13 ± 0,06 ^A	5,30 ± 0,26 ^A	2,16 ± 0,07 ^A	4,26 ± 0,46 ^a
<i>S. cerevisiae</i>	PE 2 *	1,05 ± 0,05 ^A	5,00 ± 0,00 ^A	2,02 ± 0,10 ^A	4,21 ± 0,62 ^a

Δ - representa a variação antes e depois da fermentação.

^Θ Cepas LMQA

* CAT-1 e PE-2 são cepas isoladas na planta de fermentação etanólica usadas neste trabalho como referencial fermentativo

As distinções estatísticas ao nível de 5 % de significância resultante do teste de Kruskal-Wallis estão representadas pelas letras maiúscula subscritas, enquanto que as diferenças significativas obtidas pela análise de Scott-Knott também ao nível de 5 % de significância estão demonstradas por letras minúsculas.

A comparação entre os dados das 10 melhores cepas para a produção de etanol testada neste trabalho e as duas cepas industriais utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis demonstrou ao nível de significância de 5 %, que não houve diferenças significativas na variação de pH, sólidos solúveis e concentração de células. Os dados da concentração de etanol para estas cepas foram comparados utilizando o teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5 % e também revelou que não houve diferenças significativas entre as cepas. As distinções estatísticas resultantes do teste de Kruskal-Wallis estão representadas pelas letras maiúscula subscritas ao lado direito dos resultados, enquanto que as diferenças significativas obtidas pela análise de Scott-Knott estão demonstradas por letras minúsculas ao lado direito dos dados.

As semelhanças com as cepas industriais ressaltadas pela análise estatística demonstram que esta etapa foi essencial para a triagem e seleção das cepas com características relevantes para a fermentação industrial. As 10 cepas listadas na Tabela 1 além de não apresentarem características morfológicas que propiciem a sedimentação e a redução do metabolismo fermentativo, ainda apresentam capacidade relevante de produção de etanol.

Na sessão de **Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice** é possível encontrar a compilação das características das cepas testadas na fermentação de triagem (identificação, morfologia celular, variação de pH, substrato, células e a concentração de etanol). Os dados estão separados de acordo com a origem das cepas, sendo: CSC - **Tabela 1**, SNR - **Tabela 2**, SRC - **Tabela 3**, BSG - **Tabela 4** e Cepas industriais - **Tabela 5**.

3.3. Parâmetros fermentativos das cepas selecionadas

Para as fermentações com as leveduras selecionadas foi utilizado como substrato o caldo formulado composto por fontes definidas de carbono, nitrogênio e outros nutrientes essenciais para o desenvolvimento e metabolismo celular. Este tipo de meio garante a ausência de fatores externos, tais como contaminações por agentes químicos, variações nutricionais decorrentes do processamento, entre outras variações que podem comprometer os parâmetros avaliados [21]. Além disso, a concentração de fonte de carbono (150 g.L^{-1} sacarose) do meio sintético usado é compatível com a concentração encontrada em processos industriais de fermentação etanólica. Nos processos descritos na literatura a concentração de

açúcares redutores totais (com concentração mais relevante em sacarose) é de 150 a 200 g.L⁻¹ [2,4–6].

Foram consideradas as respostas fermentativas em xarope de cana-de-açúcar como critério para a seleção das cepas testadas em meio sintético. Dentre as cepas, foram escolhidas: a) 8 melhores cepas diante da concentração de etanol no mosto fermentado (todas provenientes das amostras de cachaça – CRC, SRC e SNR); b) o melhor produtor de etanol proveniente da amostra de bagaço de malte cervejeiro (BSG); c) 2 cepas industriais já reconhecidas pelas exímias qualidades fermentativas; d) 1 cepa pouco expressiva na produção escolhida randomicamente para efeito de comparação.

Satisfazendo os critérios estabelecidos para a seleção das cepas para a determinação dos parâmetros fermentativos de rendimento e produtividade, foram selecionadas 8 melhores cepas para a produção de etanol diante da fermentação em xarope de cana-de-açúcar (LMQA CRC 32, 34, 35, 37, LMQA SNR 65 e LMQA SRC 142, 143 e 147).

A cepa LMQA BSG 7 foi selecionada pela relevante atuação frente às outras cepas oriundas do bagaço de malte, ou seja, foi selecionada como o representante que mais se destacou frente a esta categoria dos isolados. Esta cepa apresentou na fermentação com xarope de cana-de-açúcar Δ pH $1,19 \pm 0,03$, $\Delta_{\text{sólidos solúveis}}$ $5,2 \pm 0,1$ ° Bx, Δ_{biomassa} $1,82 \pm 0,15$ log.mL⁻¹, Δ_{etanol} $3,54 \pm 0,44$ % v/v.

A cepa LMQA SNR 81 foi escolhida randomicamente dentro do grupo das cepas com resposta mediana para a fermentação em xaropa de cana-de-açúcar. Esta cepa apresentou Δ pH $1,18 \pm 0,06$, $\Delta_{\text{Substrato}}$ $5,76 \pm 2,44$ ° Bx, Δ_{biomassa} $2,09 \pm 0,12$ log.mL⁻¹, Δ_{etanol} $3,42 \pm 0,26$ % v/v.

E finalmente, as cepas PE-2 e CAT-1 foram utilizadas para efeito comparativo. Estas cepas, como já mencionado anteriormente, apresentam grande relevância na aplicação industrial devido ao bom desempenho na produção de etanol combustível [2,7].

Os dados de rendimento em biomassa ($Y_{x/s}$), rendimento em etanol ($Y_{x/p}$) e produtividade de todas as cepas estão descritos na **Tabela 2**. De acordo com a análise estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5 %, somente a cepa LMQA BSG 7 apresentou rendimento celular superior aos valores apresentados pelas cepas industriais. As cepas LMQA CRC 32 e LMQA SRC 147 apresentaram rendimento celular inferior às demais cepas analisadas.

Em relação ao rendimento em etanol, as cepas LMQA CRC 35, SNR 65 e BSG 7 apresentaram os maiores valores. Estas cepas apresentaram rendimento semelhante às cepas industriais PE-2 e CAT-1. Em oposição, a cepa LMQA SRC 147 apresentou rendimento inferior às demais cepas.

Em relação a produtividade, foi possível afirmar que para a cepa LMQA BSG 7 apresentou resposta similar à CAT-1, e superior às outras cepas testadas. As cepas LMQA SRC 147 e CRC 34 apresentaram produtividade inferior.

Tabela 2- Avaliação dos parâmetros cinéticos ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, $Prod_{(p)}$) para as 10 cepas seleccionadas.

<i>Espécie</i>	<i>Cepa</i>	Rendimento em Biomassa $Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	Rendimento em Etanol $Y_{p/s}$ (g.g ⁻¹)	Produtividade $Prod$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 7	0,056 ± 0,001 ^B	0,462 ± 0,003 ^{AB}	2,596 ± 0,017 ^B
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CRC 32	0,042 ± 0,001 ^A	0,453 ± 0,001 ^{AB}	2,508 ± 0,017 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CRC 34	0,046 ± 0,002 ^{AB}	0,468 ± 0,005 ^B	2,357 ± 0,015 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CRC 35	0,044 ± 0,001 ^{AB}	0,453 ± 0,001 ^{AB}	2,490 ± 0,013 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CRC 37	0,047 ± 0,001 ^{AB}	0,457 ± 0,004 ^{AB}	2,510 ± 0,023 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 65	0,048 ± 0,004 ^{AB}	0,470 ± 0,005 ^B	2,509 ± 0,026 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 81	0,045 ± 0,001 ^{AB}	0,453 ± 0,001 ^{AB}	2,473 ± 0,013 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 142	0,045 ± 0,001 ^{AB}	0,453 ± 0,002 ^{AB}	2,468 ± 0,034 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 143	0,045 ± 0,001 ^{AB}	0,454 ± 0,003 ^{AB}	2,499 ± 0,018 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 147	0,042 ± 0,001 ^A	0,449 ± 0,001 ^A	2,156 ± 0,058 ^A
<i>S. cerevisiae</i>	CAT-1 *	0,043 ± 0,001 ^{AB}	0,467 ± 0,005 ^{AB}	2,605 ± 0,037 ^B
<i>S. cerevisiae</i>	PE-2 *	0,047 ± 0,001 ^{AB}	0,465 ± 0,002 ^{AB}	2,566 ± 0,016 ^{AB}

* CAT-1 e PE-2 são cepas isoladas na planta de fermentação etanólica usadas neste trabalho como referencial fermentativo.

As letras maiúsculas subscritas representam as distinções estatísticas resultantes do teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5 % de significância.

Os valores de rendimento e produtividade também podem ser avaliados através de parâmetros descritos na literatura. Os gráficos mostrados na **Figura 2** comparam os dados fermentativos das cepas testadas com os limites esperados para as cepas industriais (cepas

com boa capacidade fermentativa) descrito por Tosin et al. [21]. Essas faixas são: $Y_{x/s}$ entre 0,041 e 0,044, $Y_{p/s}$ entre 0,45 e 0,46 e produtividade entre 2,2 e 2,4 (região mais escura delimitada nos gráficos).

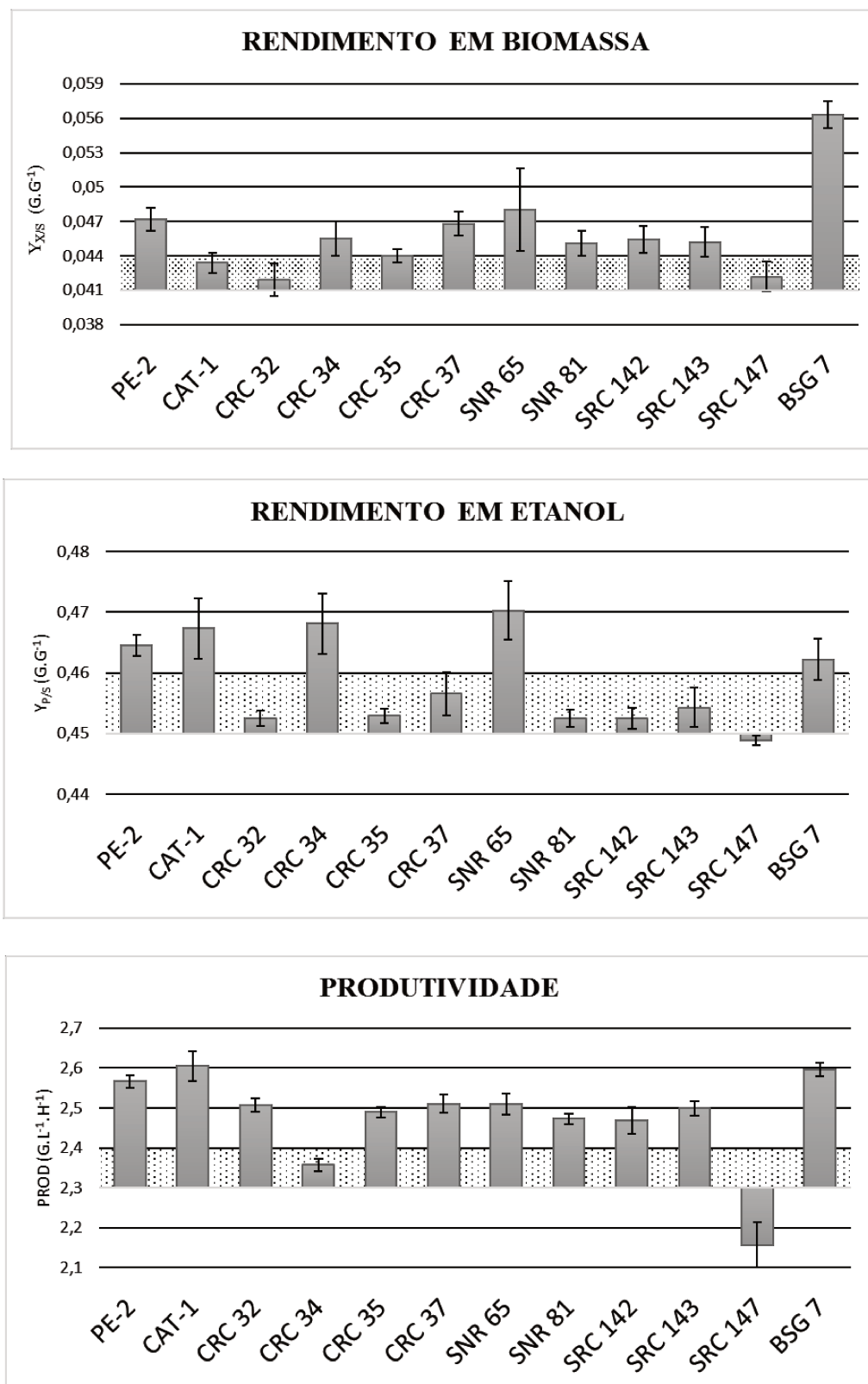


Figura 2- Dados de rendimento em etanol, rendimento em biomassa e produtividade (média $\pm$ desvio padrão) das 10 cepas selecionadas. Os dados de PE-2 e CAT-1 são mostrados como referência. A variação mais escura demonstra os limites esperados para as cepas industriais (cepas com boa capacidade fermentativa) descrito por Tosin et al. (2015) [21].

De acordo com estes parâmetros, as cepas LMQA CRC 34, 37, LMQA SNR 65, 81, LMQA SRC 142, 143, e LMQA BSG 7 apresentaram rendimento em biomassa acima do esperado, assim como a cepa industrial PE-2. Nenhuma cepa avaliada apresentou rendimento em biomassa inferior ao esperado.

Em relação ao rendimento em etanol, as cepas LMQA CRC 34, LMQA SNR 65 e LMQA BSG 7 apresentaram resultado acima do esperado, além das duas cepas industriais PE-2 e CAT-1. Somente cepa LMQA SRC 147 apresentou rendimento em etanol abaixo do esperado.

Considerando os dados de produtividade, somente a cepa LMQA CRC 34 ficou dentro da faixa esperada e a cepa LMQA SRC 147 abaixo. As demais cepas, incluindo as cepas industriais PE-2 e CAT-1 apresentaram produtividade acima da faixa esperada, como observado na figura 2.

A análise dos dados estatísticos destaca somente a cepa LMQA BSG 7 como acima da média em mais de um parâmetro (produtividade e rendimento em biomassa), e a cepa LMQA SRC 147 apresentando todas as características abaixo da média (tendo as cepas industriais como referência comparativa). A caracterização considerando os parâmetros descritos por Tosin et al. [21] aponta as cepas LMQA BSG 7, LMQA SNR 65 com os três parâmetros avaliados (rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade) como acima do esperado, e a cepa LMQA SRC 147 como abaixo da faixa esperada. Desta forma é possível afirmar que a cepa LMQA SRC 147 não é indicada para fermentações com altas concentrações de substrato e que as cepas LMQA BSG 7 e LMQA SNR 65 podem ser consideradas equivalentes ou melhores do que as cepas industriais testadas. Os parâmetros de rendimento em biomassa, etanol e produtividade são usados como importantes indicadores econômicos de produção, e por isso consideram-se valores limitantes para a classificação das leveduras [12,21,37]. Desta forma é possível afirmar que estas duas cepas são semelhantes ou melhores nos parâmetros testados que as cepas industriais usadas como padrão. Esses dados ressaltam o valor biotecnológico das cepas triadas neste trabalho, pois as cepas industriais PE-2 e CAT-1 apresentam grande aceitação pelos produtores de etanol combustível, tendo representatividade em aproximadamente 70% do etanol produzido no Brasil [2,3,7,24,34]. Assim sendo, as cepas LMQA SNR 65 e LMQA BSG 7 apresentam aptidão para a aplicação em fermentação industrial.

Além do $Y_{x/s}$ de 0,0563 da cepa LMQA BSG 7 ter sido maior em relação a faixa esperada (entre 0,041 a 0,047), esta levedura diverge das demais cepas selecionadas em diversos aspectos. Esta cepa é a única isolada proveniente do resíduo de malte de cervejaria, apresenta relevante potencial fermentativo pertence à espécie *Torulaspora delbrueckii*, diferente das outras selecionadas que são *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a indústria de etanol, o rendimento de células pode favorecer o domínio e permanência das cepas durante o processo, principalmente diante da ação do reciclo de células e lavagem ácida, das interações microbianas e outros atributos estressantes provenientes do modelo fermentativo empregado pela maioria das usinas brasileiras [2,3,18,41,42]. Entretanto, a produção massiva de células pode representar um desvio energético desnecessário, pois em condições normais de fermentação industrial com o reciclo de células a produção de células é relevante, podendo alcançar entre 50 a 80 Kg de levedura para cada m^3 de etanol produzido industrialmente [2,43]. Além disso, altas densidades populacionais podem comprometer a viabilidade celular através de interações físicas e moleculares (quorum sensing) [38]. É descrito que contato célula-célula e o aumento da concentração de amônia e álcoois aromáticos como triptofol e feniletanol pode desencadear respostas moleculares que induzem a apoptose em leveduras [35,39,40]. Entretanto, esses aspectos não minimizam a relevância desta cepa. Avaliando o comportamento fermentativo, esta levedura apresenta o metabolismo que favorece a produção de biomassa e etanol, características altamente relevantes para cepas selecionadas para a produção de combustível e bebidas fermentadas [18,41,42].

A capacidade fermentativa desta cepa é compatível com os dados já descritos na literatura. De acordo com Tataridis et al. [41] uma cepa da espécie *Torulaspora delbrueckii* apresentou em meio sintético $11,33 \pm 0,51$ % v/v ($89,43 \pm 4,6$ g.L⁻¹) com rendimento em etanol de 0,4715 g.g⁻¹ e produtividade de 0,124 g.L⁻¹.h⁻¹ [46]. Além disso, a literatura aborda esta espécie como melhoradora de “bioflavors” em bebidas fermentadas como etanol e vinho [46–48] condizendo com o ambiente do qual foi isolado, o resíduo da fermentação cervejeira.

Para efeito de comparação entre a triagem fermentativa em xarope de cana-de-açúcar (meio de cultura complexo) e da caracterização tecnológica em meio sintético (meio de cultura definido), a cepa LMQA BSG 7 selecionada com objetivo de representar as cepas isoladas do resíduo de cerveja apresentou uma grande discrepância nos resultados entre os testes. A cepa LMQA BSG 7 provem do resíduo de indústria cervejeira na qual características

da produção de cerveja são distintas das encontradas na fermentação de etanol combustível [15].

A resposta fermentativa mais branda desta cepa em xarope de cana-de-açúcar pode ser atribuída à baixa adaptabilidade devido à falta de exposição a este substrato. Esta adversidade não ocorre somente em leveduras não-*Saccharomyces*, sendo descrito também em *Saccharomyces* selecionadas para a produção de bioetanol que não resistiram ao processo com concentrações elevadas de xarope [18]. A expressiva resposta fermentativa em meio definido também ressalta a aplicabilidade biotecnológica desta cepa na indústria de bebidas alcoólicas como a cerveja e o vinho. Estas bebidas apresentam matérias-primas naturais com reduzido potencial citotóxico, em contrapartida, o calor e a pressão aplicado ao xarope utilizado neste trabalho pode ter favorecido a formação de derivados de carbono com descrita ação deletéria às células de leveduras [35].

Em oposição, a cepa LMQA SRC 147 apresentou melhor resposta na triagem em xarope de cana-de-açúcar quando comparada a sua atuação em meio sintético. De acordo com Oliveira et al. (2004) as leveduras não são relevantes *per si*, as leveduras só são dominantes sob determinadas condições [11]. Desta forma, é possível justificar que em condições de maior estresse osmótico, maior concentração celular e maior temperatura esta cepa perde a relevância fermentativa.

Buscando agrupar as leveduras em ordem de relevância para a aplicação industrial, foi realizada a análise de correlação (análise de componentes principais – PCA) entre as cepas considerando os dados do rendimento em biomassa ($Y_{x/p}$), rendimento em etanol ($Y_{x/p}$) e produtividade. A matriz de correlação resultou em cinco agrupamentos de acordo com os CP1 (variabilidade 61,3 %) e CP2 (variabilidade 20,14 %). O gráfico de dispersão de CP1 vs CP2 é mostrado na **Figura 3**. De acordo os resultados da análise de correlação, as cepas LMQA SRC 147 (A), LMQA CRC 34 (C) e BSG 7 (E) formaram grupos isolados, enquanto que as cepas CAT-1, PE-2 e LMQA SRN 65 (D) apresentaram maior proximidade, assim como as cepas LMQA CRC 32, 35, LMQA SNR 81, e LMQA SRC142, 143 (B). Em função da aplicabilidade industrial para a produção de etanol, pode-se destacar as cepas dos grupos E e D como relevantes, o grupo B e C como mediano e o grupo A como não satisfatório.

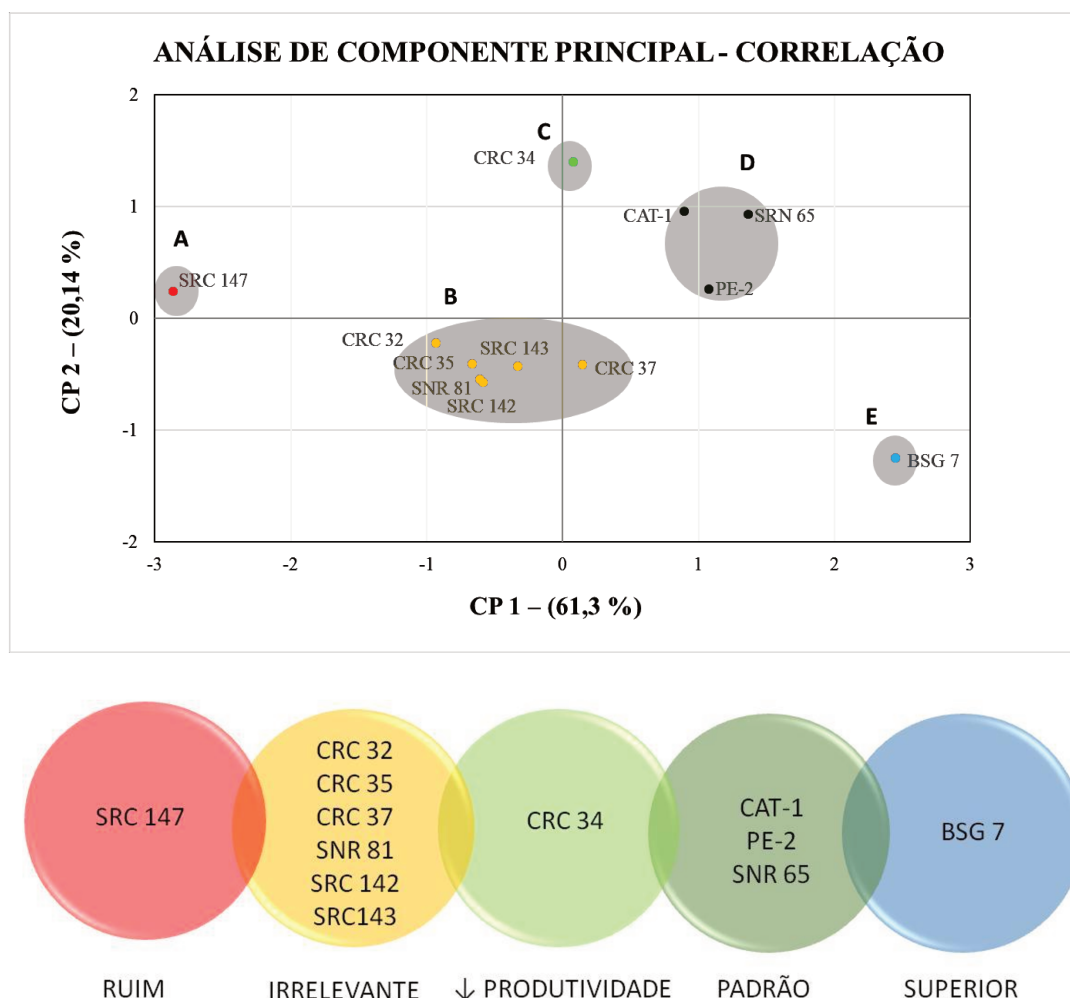


Figura 3- Análise de componentes principais (PCA) entre os dados de rendimento em biomassa, rendimento em etanol, e produtividade das 10 cepas selecionadas pela fermentação de triagem, e as duas cepas industriais PE-2 e CAT-1.

$$CP1 = 0.5804 \times (Yx/s) + 0.5666 \times (Yp/s) + 0.5849 \times (prod), \text{ e } CP2 = -0.4887 \times (Yx/s) + 0.8169 \times (Yp/s) - 0.3063 \times (prod).$$

Os diferentes grupos ressaltam as cepas que apresentaram semelhança diante dos dados de componentes principais, e ressaltam a aplicabilidade industrial das cepas analisadas.

3.4. Comparação cariotípica das cepas selecionadas

A cariotipagem por PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) foi realizada para as mesmas cepas (n=10) que tiveram os parâmetros fermentativos avaliados, e mais as duas cepas industriais. Visando comparar as cepas a nível molecular, foi possível distinguir 6 padrões de bandas, como demonstrado na **Figura 4** (diferenças evidenciadas pelas setas). O padrão de bandas obtido pelas cepas LMQA SRC 142, 143 foi similar ao padrão de banda apresentado pela cepa PE-2. As cepas LMQA CRC 32, 34 e LMQA SRC 147 apresentaram grande similaridade no perfil cariótipo, assim como as cepas LMQA SNR 65 e LMQA CRC

35. As cepas LMQA SNR 81, LMQA CRC 37, e LMQA BSG 7 apresentaram padrões de bandas individualizados, assim como a cepa CAT-1.

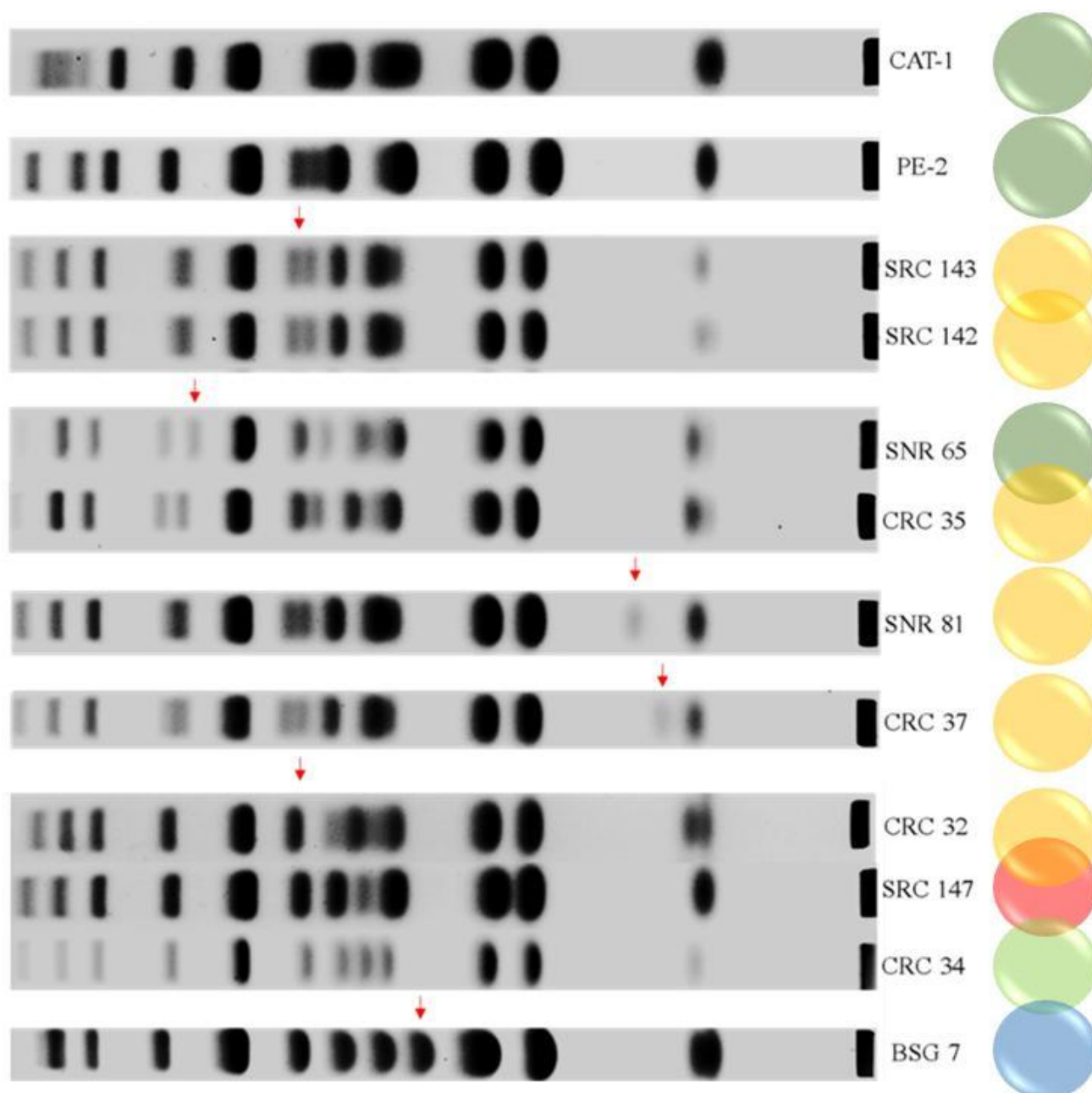


Figura 4- Perfil cariotípico das cepas selecionadas a partir dos dados da fermentação de triagem em xarope de cana de açúcar. Fotografia do gel de agarose obtido pelo equipamento UVP BioImagem System ressaltando o perfil de bandas de cada cepa. As setas vermelhas destacam as regiões distintas entre os padrões analisados. Os círculos coloridos indicam o grupo ao qual a cepa pertence em função da resposta fermentativa descrito na figura 3.

A cariotipagem foi utilizada para avaliar a diversidade das leveduras diante do perfil cromossomal das cepas com a melhor capacidade de produção de etanol. As metodologias moleculares são importante ferramentas para o estudo da diversidade ecológica, principalmente para a avaliação das variações intraespecíficas decorrentes da pressão seletiva ambiental, e são aplicáveis no controle em bioprocessos industriais e no desenvolvimento tecnológico [8]. Diversas metodologias podem ser empregadas para a análise de polimorfismos genéticos em leveduras, por exemplo, a cariotipagem eletroforética em campo pulsado PFG, a reação em cadeia da polimerase – PCR, polimorfismo obtido pela restrição do DNA mitocondrial – mtDNA-RFLP, amplificação randômica de DNA polimórfico – RAPD, análise de microssatélites [8,13]. A cariotipagem (PFG) é capaz de diferenciar eficientemente padrões intra e interespecíficos de leveduras provenientes de fermentação em caldo de cana-de-açúcar [13].

Embora de grande importância para desvendar variações populacionais, estas análises não avaliam a capacidade fisiológica das cepas. Para a distinção de cepas isoladas e seleção de leveduras potenciais para a aplicação biotecnológica, é imprescindível a avaliação molecular atrelada à investigação fisiológica e bioquímica [13].

De acordo com os dados dos perfis cariotípicos foi possível afirmar que os padrões das cepas LMQA SRC 142 e 143 condizem ao perfil apresentado pela cepa industrial PE-2, podendo ser consideradas como a mesma cepa. Contudo, o potencial fermentativo revelado pelos dados de rendimento em etanol, rendimento em biomassa e em produtividade não se assemelham. A divergência no agrupamento das cepas diante da caracterização fermentativa e dos padrões da cariotipagem demonstra a existência de outros fatores que determinam a repercussão das cepas diante das condições ambientais [13]. Ao exemplo das cepas LMQA SRC 142, 143, e PE-2, similaridade genotípica e diferenças fenotípicas não são incomuns. Essa ruptura já foi relatada para cepas isoladas em fermentações de vinho [42] e cachaça [8]. As variações da expressão gênica podem ser frutos de recombinações entre cromossomos homólogos, rearranjos, deleções e duplicações intracromossomais, além da translocações intracromossomais [8]. Além disso, variações epigenéticas provocadas por fatores externos podem resultar em padrões fisiológicos distintos numa mesma cepa, como descrito em leveduras GAR⁺ estimuladas por ácido lático [46].

Na cariotipagem ou nas técnicas polimórficas por restrição, as mutações sequenciais ou pequenas deleções cromossomais podem não ser representativas para a alteração do perfil eletroforético. Este fenômeno pode ser observado pela restrição com a enzima *Sfi*I na levedura

Candida molischiana, que não apresentou divergências quando o perfil de restrição for comparado com a cepa mutada [43]. Tais alterações sutis podem comprometer importantes regiões gênicas relacionadas direta ou indiretamente com o estado fisiológico da célula e com a capacidade de adaptação ao estresse ambiental. A expressão diferencial de genes está intimamente relacionada aos aspectos fisiológicos da levedura. Um exemplo de alteração gênica possível é a deleção do gene HOG, resultando na redução da capacidade fermentativa [44].

Em oposição, o comportamento fermentativo semelhante de cepas com distintos padrões cariotípicos foi observado. Esta divergência, como observado entre as cepas LMQA CRC 35, LMQA SRC 142 e LMQA SNR 81, tem como fator convergente a forte seleção natural atribuída às condições ambientais e microbiológicas do processo fermentativo [9,12]. Essa distinção cariotípica pode ser resultante da capacidade inerente de algumas cepas de renovar o genoma diante de adversidades [8]. De acordo com Mortimer et al. (1994) novos genótipos podem surgir em leveduras homotáticas (auto-fértil, capaz da reprodução autônoma) diploides através da alteração de múltiplos genes heterozigotos, tornando-se diploides homozigóticos com característica mais marcantes quando comparados aos parentais. Essas alterações podem contribuir para a resistência em relação ao ambiente e consequentemente favorecer o predomínio dessas linhagens secundárias [8,45]. Esta resiliência genômica pode ser equivalente à relatada para a cepa industrial PE-2 que apresenta plasticidade até em regiões teloméricas e subteloméricas favorecendo a capacidade adaptativa aos diferentes estresses do processo [2]. A hibridização entre as leveduras também permite maior plasticidade celular diante das condições adversas [9].

4. Conclusões

Visando ressaltar os recursos biológicos provenientes da produção de cachaça artesanal e de bagaço de malte cervejeiro, este trabalho apresentou características importantes no processo de seleção de leveduras para a aplicação em fermentação industrial de bioetanol combustível. Dentre as 134 leveduras estudadas, foi possível distinguir dois perfis de morfologia celular, cepas com células livres e únicas, e cepas com células em floco de neve. A triagem em xarope de cana-de-açúcar permitiu distinguir a capacidade das cepas leveduriformes unicelulares na produção de etanol, possibilitando a seleção das cepas para a caracterização do rendimento em biomassa, rendimento em etanol e produtividade. Esta etapa

foi essencial para revelar detalhadamente a capacidade para a aplicação industrial e junto com a análise de componentes principais (PCA) foi possível agrupar as cepas de acordo com a relevância para aplicação industrial. A cariotipagem finalizou este conjunto de ações destinadas ao conhecimento detalhado das leveduras selecionadas. Os resultados mostraram que o alto potencial para a aplicação industrial das cepas LMQA SNR 65 e LMQA BSG 7 não é impresso por padrões cromossômicos semelhantes.

O direcionamento fisiológico pela seleção natural de leveduras provenientes ambientes pouco explorados, como a produção de cachaça artesanal e o bagaço de malte cervejeiro, e sua bioprospecção pode contribuir consideravelmente para o retorno econômico do setor de biotecnologia através da inovação e aperfeiçoamento de bioprocessos.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant CNPq 302763/2014-7) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A FERMENTEC S/A pela disponibilização das *Saccharomyces cerevisiae* cepas PE-2 e CAT-1. Usina Granelli (Piracicaba - SP) pela doação do xarope de cana-de-açúcar. Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho e ao bacharel em química Lucas André Zeoly pela disponibilização e acompanhamento das análises no cromatógrafo gasoso do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos – IQ – Unicamp.

Referências

- [1] Chagas MF, Bordonal RO, Cavalett O, Carvalho JLN, Bonomi A, La Scala N. Environmental and economic impacts of different sugarcane production systems in the ethanol biorefinery. *Biofuels, Bioprod Biorefining* 2016;10:89–106. doi:10.1002/bbb.1623.
- [2] Lopes ML, Paulillo SC de L, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian J Microbiol* 2016;47:64–76. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.003.
- [3] Borges EP, Lopes ML, Bernardino C, Godoy A, Ré FE, Cherubin RA, et al. The

- benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar Ind (Zuckerindustrie)* 2015;4:209–16.
- [4] Pereira FB, Gomes DG, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Biotechnol Lett* 2012;34:45–53. doi:10.1007/s10529-011-0735-0.
 - [5] Wheals AE, Basso LC, Alves DM, Amorim H V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* 1999;17:482–7.
 - [6] Carvalho-Netto O V, Carazzolle MF, Mofatto LS, Teixeira PJ, Noronha MF, Calderón L AL, et al. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microb Cell Fact* 2015;14:13. doi:10.1186/s12934-015-0196-6.
 - [7] Basso LC, de Amorim H V., de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* 2008;8:1155–63. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x.
 - [8] Guerra JB, Araujo RAC, Pataro C, Franco GR, Moreira ESA, Mendonca-Hagler LC, et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:106–11. doi:10.1046/j.1472-765x.2001.00959.x.
 - [9] da Conceição LEFR, Saraiva MAF, Diniz RHS, Oliveira J, Barbosa GD, Alvarez F, et al. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2015;42:237–46. doi:10.1007/s10295-014-1528-y.
 - [10] Portugal CB, de Silva AP, Bortoletto AM, Alcarde AR. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Res Int* 2016. doi:10.1016/j.foodres.2016.11.022.
 - [11] Portugal CB, Alcarde AR, Bortoletto AM, de Silva AP. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. *Eur Food Res Technol* 2016;242:1587–97. doi:10.1007/s00217-016-2659-3.
 - [12] Oliveira ES, Rosa CA, Morgano MA, Serra GE. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World J Microbiol Biotechnol* 2004;20:19–24.

doi:10.1023/B:WIBI.0000013286.30695.4e.

- [13] Oliveira VA, Vicente MA, Fietto LG, de Miranda Castro I, Coutrim MX, Schuller D, et al. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice Fermentations and Their Impact in Cachaca Production. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:693–701. doi:10.1128/AEM.01729-07.
- [14] Freitas Schwan R, T. Mendonça A, da Silva Jr. JJ, Rodrigues V, Wheals AE. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001;79:89–96. doi:10.1023/A:1010225117654.
- [15] Mussatto SI, Roberto IC. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J Chem Technol Biotechnol* 2006;81:268–74. doi:10.1002/jctb.1374.
- [16] Hill A, (ed). *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*. 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 2015.
- [17] Meneses NGT, Teixeira JA, Mussatto SI. Produção de etanol a partir de subproduto cervejeiro. *Bol Biotechnol - Soc Port Biotechnol* 2013;2:27–8.
- [18] Brexó RP, Sant'ana A de S. Yeasts in wild ferment for cachaça production and in brewer's spent grain: biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2017:Submitted-under review.
- [19] Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT, Shan X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *J Anal Toxicol* 2011;35:501–11.
- [20] Truman State University. Gas Chromatography: Principles and Determination of Percent Alcohol. Truman State Univ CHEM 222 Lab Man 2011:0–4. chrome-extension://oemmnndcbldboiebfnladdacbdmfmadadm/http://chemlab.truman.edu/CHEM222manual/pdf/gclab.pdf (accessed November 10, 2016).
- [21] Tosin C, Andrietta SR, Andrietta M da GS. Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *J Inst Brew* 2015;121:343–8. doi:10.1002/jib.237.
- [22] Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L. Selection of *Saccharomyces*

- cerevisiae strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. *Biotechnol Lett* 2010;32:1655–61. doi:10.1007/s10529-010-0330-9.
- [23] Amorim H V., Lopes ML, De Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;91:1267–75. doi:10.1007/s00253-011-3437-6.
- [24] Amorim H V., Leão RM. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*. 1st ed. Piracicaba: Fermentec; 2005.
- [25] Ratcliff WC, Travisano M. Experimental Evolution of Multicellular Complexity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience* 2014;64:383–93. doi:10.1093/biosci/biu045.
- [26] Soares E V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *J Appl Microbiol* 2011;110:1–18. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04897.x.
- [27] Dake MS, Jadhv JP, Patil NB. Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37:701–6. doi:10.1007/s10295-010-0713-x.
- [28] Skinner-Nemec KA, Nichols NN, Leathers TD. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production [electronic resource]. *Biotechnol Lett* 2007;29:379–83. doi:10.1007/s10295-004-0159-0.
- [29] Leathers TD, Bischoff KM, Rich JO, Price NPJ, Manitchotpisit P, Nunnally MS, et al. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresour Technol* 2014;169:45–51. doi:10.1016/j.biortech.2014.06.065.
- [30] Ghosh SK, Santra T, Chakravarty A. Study of Yeast Flora of Fruits and Their in Vitro Screening for Antagonistic Property Against *Penicillium Digitatum*. *Int J Sci Res* 2016;4:online.
- [31] Barbosa HS, Silveira E de A, Miranda M, Ernandes JR. Efficient very-high-gravity fermentation of sugarcane molasses by industrial yeast strains. *J Inst Brew* 2016;122:329–33. doi:10.1002/jib.317.
- [32] Dashko S, Zhou N, Compagno C, Piškur J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res* 2014;14:826–32. doi:10.1111/1567-1364.12161.

- [33] DE DEKEN RH. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *J Gen Microbiol* 1966;44:149–56. doi:10.1099/00221287-44-2-149.
- [34] Della-Bianca BE, Basso TO, Stambuk BU, Basso LC, Gombert AK. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Appl Microbiol Biotechnol* 2013;97:979–91. doi:10.1007/s00253-012-4631-x.
- [35] Brexó RP, Sant’Ana AS. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;73:423–34. doi:10.1016/j.rser.2017.01.151.
- [36] Sobrinho VS, Silva VCF da, Cereda. MP. Fermentation of sugar cane juice (*Sacharum officinarum*) cultivar RB 7515 by wild yeasts resistant to UVC. *J Biotechnol Biodivers* 2011;2:13–21.
- [37] Steckelberg C, Andrietta M da GS, Andrietta SR. Caracterização da biomassa isolada de processos fermentativos de produção de etanol para uso como biocombustíveis. Proc. 6. Encontro Energ. no Meio Rural, Campinas: 2006, p. SciELO Proceedings online.
- [38] Brexó RP, Sant’Ana AS. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Crit Rev Biotechnol* 2017:Submitted-under review.
- [39] Severin FF, Meer M V., Smirnova EA, Knorre DA, Skulachev VP. Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2008;1783:1350–3. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.02.001.
- [40] Kemsawasd V, Branco P, Almeida MG, Caldeira J, Albergaria H, Arneborg N. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachancea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2015:fmv103. doi:10.1093/femsle/fmv103.
- [41] Tataridis P, Kanelis A, Logotetis S, Nerancis E. Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. *Zb Matice Srp Za Priir Nauk* 2013:415–26. doi:10.2298/ZMSPN1324415T.
- [42] Polsinelli M, Romano P, Suzzi G, Mortimer R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Lett Appl Microbiol* 1996;23:110–4.

- [43] Janbon G, Magnet R, Bigey F, Arnaud A, Galzy P. Karyotype studies on different strains of *Candida molischiana* by pulsed-field gel electrophoresis. *Curr Genet* 1995;28:150–4.
- [44] Aslankoohi E, Zhu B, Rezaei MN, Voordeckers K, De Maeyer D, Marchal K, et al. Dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* Transcriptome during Bread Dough Fermentation. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:7325–33. doi:10.1128/AEM.02649-13.
- [45] Mortimer RK, Romano P, Suzzi G, Polsinelli M. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 1994;10:1543–52. doi:10.1002/yea.320101203.
- [46] Garcia, D. M., Dietrich, D., Clardy, J., Jarosz, D. F. A common bacterial metabolite elicits prion-based bypass of glucose repression. *Elife* 2016. doi: 10.7554/eLife.17978

CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE CAUSADO PELA
CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E RECICLO CELULAR
SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Saccharomyces*
cerevisiae LMQA SRC 143 E PE-2

ASSESSMENT OF THE STRESS CAUSED BY BACTERIAL CONTAMINATION
AND CELL RECYCLING ON THE BIOETHANOL PRODUCTION BY *Saccharomyces*
cerevisiae LMQA SRC 143 AND PE-2

Artigo formatado de acordo com as normas de submissão da revista

“Applied and Environmental Microbiology”

Avaliação do estresse causado pela contaminação bacteriana e reciclo celular sobre a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae* LMQA SRC 143 E
PE-2

Ramon P. Brexó¹, Fernando Pradella², Rafael D. Chaves¹, Alessandro S. Farias², Anderson S. Sant'Ana^{1*}

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP

²Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia, UNICAMP

Título corrido:

Análise o estresse celular em fermentação etanólica por citometria de fluxo

*Corresponding author: Prof. A.S.Sant'Ana: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. Cidade Universitária Zeferino Vaz. CEP: 13083-862. Campinas, SP, Brazil.

Resumo

A agressividade do processamento industrial de cana-de-açúcar para a produção de etanol combustível demanda leveduras robustas para a viabilização econômica do processo. Os dados deste trabalho ressaltam a capacidade fermentativa das cepas LMQA SRC 143 e PE-2 diante do reciclo de células e lavagem ácida. Os dados da fisiologia celular demonstraram maior sensibilidade da cepa LMQA SRC 143 diante do estresse intenso e repetitivo apresentado pelo processo, enquanto que PE-2 apresentou maior equilíbrio e estabilidade, principalmente em relação à reserva de glicogênio e integridade do DNA. Em adição, a contaminação bacteriana pelo *Lactobacillus fermentum* aditivou a resposta fermentativa da cepa LMQA SRC 143, além de melhorar a estabilidade fisiológica das células contrariando o senso comum da ação totalmente negativa desencadeada pela contaminação. Estas constatações destacam a importância da prospecção de leveduras em ambientes aquém da própria usina de etanol e confere a possibilidade do estabelecimento de processos rentáveis sem a necessidade do “ajuste” ecológico entre leveduras e bactérias por meio de agentes químicos antibióticos.

Palavras-chave: citometria, biocombustível, fisiologia celular, bioetanol, cana-de-açúcar

1. Introdução

As preocupações com a demanda energética e questões ambientais impulsionaram o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar mais produtivas e processos mais rentáveis, entretanto a magnitude e a natureza do processo industrial inviabiliza a esterilidade no mosto de fermentação (1–3). A presença de bactérias contaminantes, principalmente bactérias ácido lácticas (BAL) durante todas as fases da fermentação é comum (4). A seleção de cepas de leveduras com alto potencial fermentativo mesmo na presença de contaminantes pode ser um caminho para o aumento produtivo de etanol em escala industrial.

No Brasil, a produção do bioetanol a partir de cana-de-açúcar ocorre massivamente em processo com a alta densidade de células e mosto contendo de 150 a 200 g.L⁻¹ de açúcares totais, sendo a sacarose o principal carboidrato (3, 5–7). Além disso, o reciclo de células é intenso, sendo realizado em média 210 vezes durante a safra, perdurando entre 6 a 8 meses consecutivos com ciclos de duração entre 6 a 15 horas com produção média de 8 a 11 % v/v de etanol (5–8). Para processos sem o reciclo celular, é descrito a razão de síntese de 80 kg de levedura gerado a cada 1000 L de etanol (3, 9). O reaproveitamento celular através do reciclo é vantajoso por reduzir o investimento energético para desenvolvimento da biomassa celular, aumentando o rendimento fermentativo com ciclos fermentativos de menor duração (10).

As características físico-químicas da matéria-prima e do processo produtivo, como pH, composição de água e açúcares, micronutrientes favorecem o estabelecimento de bactérias (11–14). A matéria-prima, os insumos e o próprio processamento são vias de entrada destes micro-organismos (4). A impossibilidade de manter a esterilidade criou a necessidade do controle da população bacteriana que é carregada junto às leveduras para o reciclo celular (3, 4). Na produção de etanol de cana-de-açúcar é aplicado a centrifugação seguido da lavagem ácida com pH 2.0–2.5 por 1–2h (3, 10). A lavagem ácida é capaz de reduzir em aproximadamente 45 % a população de bactérias contaminantes, além disso, o controle adicional pode ser realizado durante a fermentação por agentes químicos antibióticos que promovem a redução de 1000 a 10000 vezes contagem a contagem de células por mL. Através destes procedimentos a contaminação final do mosto ainda pode perdurar ao redor de 10⁵ UFC.mL⁻¹, consistindo num problema inato deste tipo de processo (3, 15). Em concentrações ao redor de 10⁷ UFC.mL⁻¹ a presença de bactérias pode conferir a redução de 1 a 5 % do processo, sendo as bactérias ácido lácticas (LAB) os principais contaminantes (3, 4,

13). As LAB apresentam resistência ao etanol, variação osmótica e de pH, além de apresentar alta taxa de crescimento no mosto de fermentação e alta produção de metabólitos secundários, principalmente ácidos orgânicos (4, 16–21). O gênero *Lactobacillus* é o mais representativo dentre as bactérias contaminantes, sendo a espécie *Lactobacillus fermentum* a principal bactéria encontrada em nas plantas produtoras de etanol combustível (4, 7, 21). Entre os efeitos negativos descritos, esta cepa é capaz de reduzir a viabilidade celular e a produtividade em etanol através da competição por micronutrientes, por ação dos ácidos orgânicos e outros metabólitos sintetizados durante a fermentação (15, 21).

Apesar dos relevantes benefícios atrelados ao reciclo de células com a lavagem ácida, a exposição repetitiva das leveduras aos agentes estressantes (etanol, altas concentrações de substrato, alteração do pH) e a presença constante da contaminação bacteriana representam um poderoso agente seletivo para as leveduras fermentativas (4, 22). Somente as leveduras mais adaptadas são capazes de sobreviver e manter a homeostase celular (22). A utilização de levedura selecionada visa o aumento da produtividade industrial com a premissa de maior eficiência no consumo e a utilização do substrato, altas taxas metabólicas, eficiência energética e robustez frente às condições adversas (22). O melhor desempenho frente à contaminação bacteriana traz benefícios em produtividade e redução do custo de processamento por meio da redução do uso de adjuntos como antibióticos, ácidos e antiespumantes (15). A redução do uso de antibióticos também favorece os ganhos na indústria de etanol. O creme de levedura não tratado com antibióticos tem maior aceitação como subproduto fonte de proteína na alimentação animal e humana, e evita a promoção de resistência seletiva aos contaminantes (9, 15, 21).

A viabilidade, vitalidade e os compostos de reserva são importantes parâmetros usados para a seleção de cepas para a aplicação industrial, pois indicam a resistência celular (22, 23). Para a fermentação etanólica, o acompanhamento da concentração de glicogênio e trealose, viabilidade e vitalidade das leveduras retrata a capacidade fermentativa e a robustez fisiológica diante do processo (23). A citometria de fluxo é uma ferramenta poderosa e rápida para a análise de células individuais através de excitação por luz incidente e medição por fluorescência emitida (24). Este tipo de análise possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente através de moléculas (fluoróforos) que evidenciam de estruturas específicas (23, 24).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da contaminação bacteriana e do reciclo celular com a lavagem ácida sobre as características fermentativas e fisiológicas de

duas cepas de leveduras selecionadas. A caracterização fermentativa considerou a produção de etanol, o consumo de substrato e o pH como variáveis, enquanto que a fisiologia celular avaliada por citometria de fluxo revelou a viabilidade, vitalidade e a concentração dos compostos de reserva glicogênio e trealose nas leveduras.

2. Material e métodos

2.1. Micro-organismos

Foram testadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* LMQA SRC 143 e PE-2, e como contaminante a bactéria *Lactobacillus fermentum* CCT1668. A cepa LMQA SRC 143 é uma levedura selecionada, proveniente de fermento reciclado da produção de cachaça artesanal (25). Esta cepa foi escolhida para este teste por ter apresentado viabilidade celular de 94,3 % em fermentação em xarope de cana-de-açúcar (20 ° Brix) em co-cultura com o *L. fermentum* durante 48 horas a 30° C. Este resultado foi obtido em pré-teste com as 10 melhores cepas selecionadas pela capacidade fermentativa em xarope de cana-de-açúcar, indicando que esta cepa apresenta maior robustez frente à presença desta espécie de BAL. A cepa PE-2 foi escolhida como levedura parâmetro para este trabalho. Esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae* é resistente ao estresse provocado pelo processo fermentativo, apresenta alta produtividade, e está entre as cinco leveduras mais empregadas para a produção industrial de bioetanol combustível no Brasil (2, 3, 7, 22). O *Lactobacillus fermentum* foi escolhido como agente contaminante. Esta espécie é relatada em toda a cadeia produtiva (mosto, xarope, vinho, fermento reciclado), produz altos níveis de ácidos orgânicos e apresenta grande potencial para indução de floculação em leveduras (4, 7).

As leveduras foram mantidas congeladas em caldo extrato de malte – (MEB) [20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA), 20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), pH final 6.7] suplementado com 30% v/v de glicerol (Dinâmica, Diadema, Brasil). Para os testes, as cepas foram reativadas em Malt Extract Agar – (MEA) [20 g.L⁻¹ agar (Kasvi, Curitiba, Brasil), 20 g.L⁻¹ glicose (Synth, Diadema, Brasil), 20 g.L⁻¹ extrato de malte (Neogen, Lansing, USA), 1 g.L⁻¹ peptona (Acumidia, Lansing, EUA)] a 25°C por 7 dias.

O *L. fermentum* foi mantido congelado em 52,0 g.L⁻¹ caldo de Man, Rogosa and Sharpe – MRS (Merck, Darmstadt, Germany) suplementado com 30% v/v de glicerol (Dinâmica, Diadema, Brazil). A cepa foi reativada em tubo “*slant*” de agar de Man, Rogosa and Sharpe MRS-agar [52,0 g.L⁻¹ MRS (Merck, Darmstadt, Germany), 20 g.L⁻¹ ágar bacteriológico (Kasvi, Curitiba, Brazil)] a 30 ° C por 24 horas.

2.2. Preparo das fermentações

2.2.1. Mosto

O substrato usado para o preparo das fermentações foi o xarope de cana-de-açúcar (Usina Granelli, Charqueada, Brasil). O xarope na concentração de aproximadamente 63 ° Bx foi acondicionado em embalagem plástica PET e mantido em câmara fria a -5 ° C até o preparo das fermentações. Para a propagação das células o xarope de cana-de-açúcar foi diluído até 10 ° Bx e para o preparo do mosto de fermentação foi diluído até 20 ° Bx. Em ambos os casos, o xarope diluído foi suplementado com 1 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica (Acumidia, Lansing, EUA) e autoclavado a 121 ° C por 20 minutos. Para evitar a contaminação bacteriana indesejada, o mosto das fermentações puras (somente leveduras sem o contaminante) foi suplementado com 100 mg.L⁻¹ de cloranfenicol (Inlab, São Paulo, Brazil).

2.2.2. Inóculo de levedura

A propagação das células de levedura foi realizada baseado na metodologia descrita por Basso et al. com modificações (22). As células foram propagadas em xarope de cana-de-açúcar na concentração de 10 ° Bx. Para cada cepa foram preparados 10 Erlenmeyers com 50 mL de mosto. A propagação foi iniciada com a transferência de uma alçada das colônias crescidas em MEA para 50 mL do mosto de propagação que foi incubado a 30 ° C sem agitação. Este propágulo inicial foi alimentado e homogeneizado a cada 12 horas com 50 mL do mosto de propagação até o volume final de 500 mL, mantido a 30 °C durante todo o processo. As células foram coletadas através da centrifugação por 10 minutos a 4800 × g e 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA) (5). A massa celular foi suspensa em xarope de cana-de-açúcar 20 ° Bx na razão de 70 g de células por litro. As fermentações sem o contaminante foram inoculadas com 15 mL deste inóculo.

2.2.3. Inóculo de bactéria

A cultura de *Lactobacillus fermentum* foi preparada com a transferência de uma alçada de células para 50 mL de caldo de MRS (Merck, Darmstadt, Germany) mantido a 30 °C por 12 horas. Em seguida, esta suspensão foi alimentada com 200 mL do mesmo meio e mantido por mais 24 horas a 30 °C. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas durante 5 minutos a $7000 \times g$ na temperatura de 5 °C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). As células foram lavadas com 100 mL de água peptonada (Acumidia, Lansing, EUA) 0,1 % e centrifugadas por três vezes. Ao final do processo de lavagem, a suspensão de células foi ajustada em aproximadamente 5.10^8 UFC.mL⁻¹ por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU-640 Spectrophotometer, Beckman Coulter, EUA). A suspensão de células foi analisada em comprimento de onda de 600 nm. O inóculo bacteriano foi ajustado no valor de absorbância de 0.5 (equivalente a 5.10^8 UFC.mL⁻¹ previamente testado por plaqueamento em superfície com MRS ágar).

Para cada fermentação contaminada com a bactéria, o inóculo foi preparado pela centrifugação de 65 mL da suspensão de células bacterianas durante 5 minutos a $7000 \times g$ na temperatura de 5 °C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). Após a centrifugação, as células foram suspendidas com 15 mL da suspensão de leveduras em xarope de cana-de-açúcar 20 ° Bx descrito acima.

2.2.4. Fermentações com o reciclo de células

Todas as fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de 150 mL, com volume final da fermentação de 65 mL, sendo 50 mL do mosto e 15 mL de inóculo. Cada fermentação teve duração de 9 horas, a 30 °C, sem agitação. Foram realizados oito ciclos sucessivos de fermentação. Cada ciclo fermentativo contou com quatro replicatas das fermentações inoculadas com as variáveis: *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 (L); *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum* (LB); *S. cerevisiae* PE-2 (P); e *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum* (PB).

A primeira fermentação foi iniciada a partir da introdução do inóculo descrito na sessão 1.2.2. Nestas condições, todas as fermentações do primeiro ciclo apresentaram concentração inicial de leveduras em torno de 10^8 UFC.mL⁻¹. As fermentações contaminadas

contaram também com concentração inicial de aproximadamente 10^8 UFC.mL⁻¹ de *Lactobacillus fermentum*.

A segunda fermentação foi iniciada com a biomassa celular de levedura e bactéria recuperada por centrifugação 10 minutos a $7000 \times g$ na temperatura de 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). Após a centrifugação, as células foram suspensas em 15 mL xarope de cana-de-açúcar 20 °Bx e usadas.

Para as demais fermentações (3° - 8° fermentação) a biomassa celular utilizada na fermentação prévia foi recuperada por centrifugação durante 10 minutos a $4800 \times g$ na temperatura de 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA) (5). Por conta da lavagem ácida aplicada a partir do segundo ciclo fermentativo, as fermentações LB e PB foram suplementadas com o inóculo puro de *Lactobacillus fermentum*. A suplementação foi realizada com o centrifugado de 65 mL da suspensão da bactéria (durante 5 minutos a $7000 \times g$ na temperatura de 5 ° C em centrífuga Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA). Após a centrifugação, estas células foram suspensas juntamente com as células de leveduras recicladas (após o tratamento ácido) em 15 mL de xarope de cana-de-açúcar 20 ° Bx e usadas como inóculo.

Em todas as fermentações o vinho foi deslevedurado por centrifugação $4800 \times g$ na temperatura de 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA) e submetido à análise de sólidos solúveis, pH e concentração de etanol. Além disso, visando a análise as alterações fisiológicas nas leveduras causadas pela reutilização da biomassa, ao final da 1° fermentação (T1), 4° fermentação (T2) e 8° fermentação (T3) foi recolhido 1 mL do vinho. Essas amostras foram preparadas em seguida e analisadas por citometria de fluxo.

2.3. Análise do mosto fermentado

A concentração de sólidos solúveis, o pH e a concentração de etanol foram quantificados antes e depois das fermentações (27).

Para a análise de sólidos solúveis foi utilizado o refratômetro Digital Hand-held "Pocket" Refratômetro PAL – (ATAGO, Toquio, Japan). O aparelho foi zerado com água destilada. As análises foram realizadas com 100 µL das amostras dos fermentados.

O pH das fermentações foi analisado com potenciômetro manual AK 103 (AKSO, São Leopoldo, Brazil). O equipamento foi calibrado de acordo com as instruções do fabricante. As

amostras foram lidas por meio da submersão do eletrodo do pHmetro no mosto, sendo considerado o resultado mostrado no visor após a completa estabilização.

A determinação da concentração de etanol foi feita por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (CG-FID). Para esta análise, a porção de 1 mL do mosto fermentado de cada uma das 4 replicatas foi depositada e homogeneizada em um frasco de vidro (frasco de penicilina 8 mL). Esta amostra resultante de 4 mL foi filtrada em filtro para seringa 13mm/0.45µm (Jet-Biofil, Guangzhou, China) e preparada para a análise. As análises em HPLC foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em Ramon et al., (26).

2.4. Lavagem ácida

A lavagem ácida foi realizada em solução aquosa de ácido sulfúrico (Dinâmica, Diadema, Brazil) pH 2. Todas variáveis de inóculo (L, LB, P, e PB) da fermentação foram submetidas à lavagem ácida. A lavagem ácida foi realizada ao final da 2^o - 7^o fermentação com a biomassa recuperada após a centrifugação do vinho. A biomassa foi mantida no frasco de centrifugação para a lavagem ácida. As células foram suspensas em 50 mL de solução de ácido sulfúrico pH 2.0. Esse sistema foi mantido sob agitação através de barra magnética (comprimento de 3 cm) entre 800 - 850 rpm durante 90 minutos a 25 ° C. O pH foi monitorado com o potenciômetro manual AK 103 (AKSO, São Leopoldo, Brazil) durante todo o processo e a manutenção do pH 2.0 realizada durante o processo de lavagem ácida com solução de ácido sulfúrico (Dinâmica, Diadema, Brazil) 2N (quando necessário). O tempo e o pH usado da lavagem ácida foram determinados com base em artigos relacionados que assumem o pH 1.8 - 2.5 e o tempo de lavagem 1 – 2 horas (22, 28, 29).

Para o reuso da biomassa após a lavagem, a solução ácida foi removida por centrifugação durante 10 minutos a 4800 × g na temperatura de 5 ° C (Sorvall™ Legend™ XTR, Thermo Scientific, Waltham, USA) e as células usadas para o preparo do inóculo como descrito na sessão 1.2.3.

A sequência das fermentações, do tratamento ácido e da coleta das amostras para a análise de citometria de fluxo pode ser conferida na **Figura 1**.

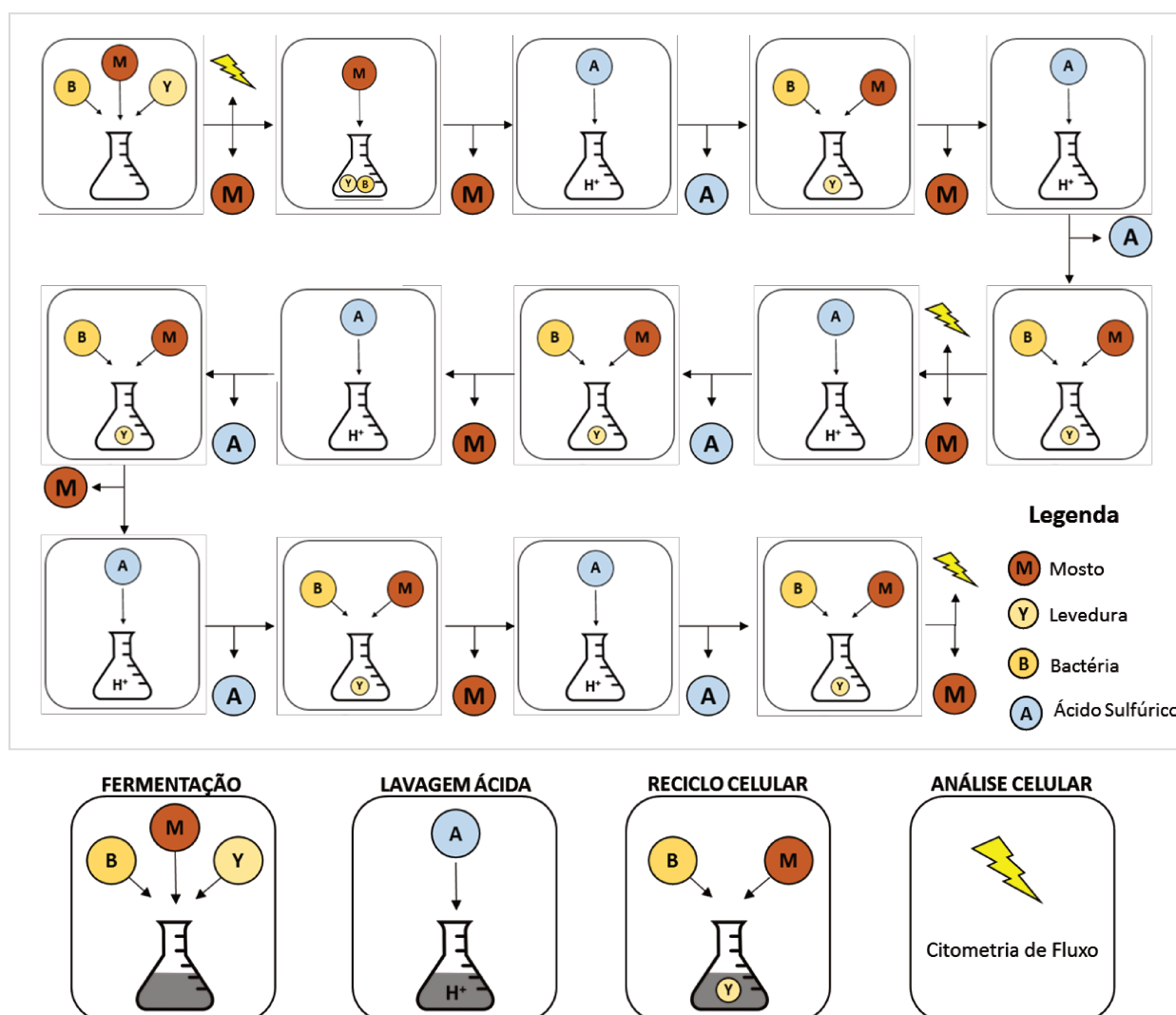


Figura 1- Metodologia esquematizada das fermentações com o reciclo de células, lavagem ácida e os pontos coletados para a análise de citometria de fluxo.

2.5. Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram conduzidas com base na metodologia proposta por Chan et al.(23). As especificações dos corantes e a metodologia detalhada do preparo do tampão e das soluções fluorescentes estão descritas nos **Materiais Suplementares - Apêndice**.

2.5.1. Preparo das amostras

Para o preparo das amostras para a citometria de fluxo, todas as centrifugações foram realizadas nas condições de $3200 \times g$ por 10 min a 5°C em tubos eppendorf em centrífuga Eppendorf® Minispin® e MiniSpin Plus microcentrífuga pessoal (Eppendorf, Hamburg, Germany). Alíquotas de 1 mL do vinho com levedura centrifugadas e suspensas em PBS (tampão fosfato salino) foram distribuídas em 6 eppendoffs, e novamente centrifugado. Em seguida, as células de dois eppendorfs foram fixadas em etanol 95% durante 15 minutos (para os testes com os corantes Acriflavina e A-FITC). Após a fixação, estas amostras foram centrifugadas e juntamente com demais amostras seguiram para a etapa de coloração.

Como mostrado no fluxograma da **Figura 2**, os corantes FDA e Acriflavina foram aplicados primeiro, devido ao elevado tempo de interação entre o corante com a amostra. A solução de FDA - (Fluoresceína Diacetato) foi utilizada para a detecção da vitalidade celular. A coloração foi realizada por meio da homogeneização de 50 μL da solução de FDA em 50 μL da suspensão de células, em seguida, incubado por 1 hora a 37°C . A solução de Acriflavina foi utilizada para corar glicogênio intracelular. As amostras foram coradas com a homogeneização de 2 μL da solução de Acriflavina em 1 mL de suspensão de células. As amostras coradas com Acriflavina ficaram incubadas por 1 hora no escuro sob a 25°C . Após o período de incubação, as amostras coradas com FDA e Acriflavina foram centrifugadas e lavadas com PBS duas vezes seguidas antes da análise no citômetro de fluxo.

A concentração de trealose intracelular foi evidenciada com a solução de A-FITC (Isotiocianato de fluoresceína - A). As amostras foram preparadas adicionando-se 20 μL da solução A-FITC em 1 mL de suspensão de células, incubado por 20 minutos no escuro a 25°C . Após o tempo de incubação, as amostras coradas com A-FITC foram centrifugadas e lavadas com PBS por duas vezes seguidas. A análise de trealose foi realizada somente em T1 e T3.

A viabilidade celular foi analisada com base na integridade do material genético pelo corante AO (Alaranjado de Acridina) e pela integridade da membrana plasmática pela interação com o corante PI (Iodeto de propídio). Para a coloração com AO a amostra foi preparada com 200 μL de solução de AO em 200 μL de suspensão de células. E para análise de PI foi adicionado 5 μL de PI (1 mg.mL^{-1}) em 1 mL de suspensão de célula. Estes ensaios foram analisados separadamente em citômetro de fluxo imediatamente após a mistura

do corante com a suspensão de células. A viabilidade foi estabelecida pelas médias geométricas da intensidade de fluorescência de AO e PI. O branco da amostra foi preparado com a centrifugação e suspensão das células em PBS sem a adição de corantes.

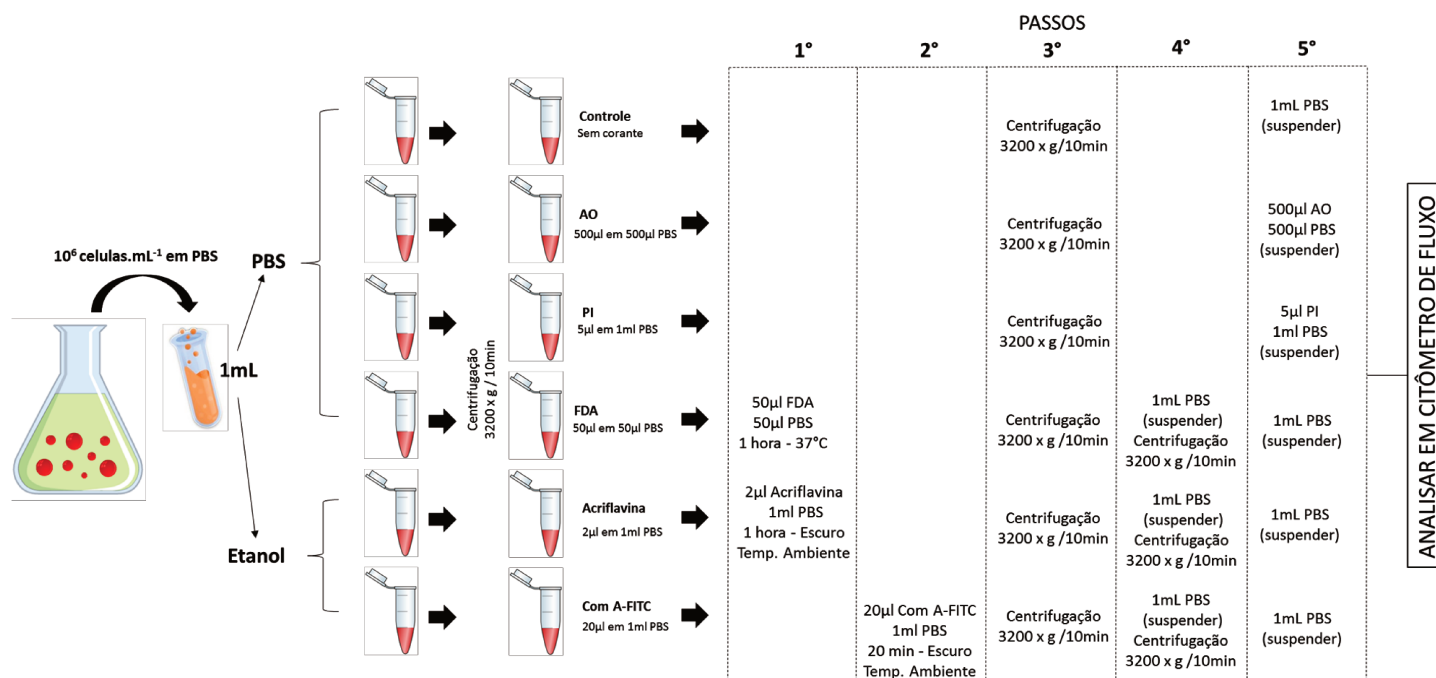


Figura 2- Fluxograma da metodologia sequencial de coloração das células de levedura para citometria de fluxo com os corantes Fluoresceína Diacetato, Acriflavina, A-FITC, Laranja de Acridina e Iodeto de Propídio.

2.5.2. Obtenção e análise dos dados de citometria de fluxo

Cada uma das quatro replicatas de cada fermentação foi analisada no Gallios® Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, EUA) para a aquisição dos dados de fluorescência relativos a viabilidade, vitalidade, glicogênio e trealose celular. Foram considerados 10^4 eventos analisados por corrida. As amostras coradas com AO, Acriflavina, e A-FITC foram excitadas com comprimento de onda em 488 nm e a fluorescência emitida na região de 525/20 nm foi detectada utilizando do canal FL 1. As amostras coradas com PI também foram excitadas em comprimento de onda em 488nm, porém a fluorescência emitida foi detectada na região de 620/30 nm utilizando do canal FL 3. O tratamento dos dados foi realizado no software KALUZA® e FlowJo™, sendo os resultados expressos pelo média geométrica da intensidade da fluorescência – (Geometric Mean of Fluorescence Intensity - GMFI) como mostrado pela **Figura 3**.

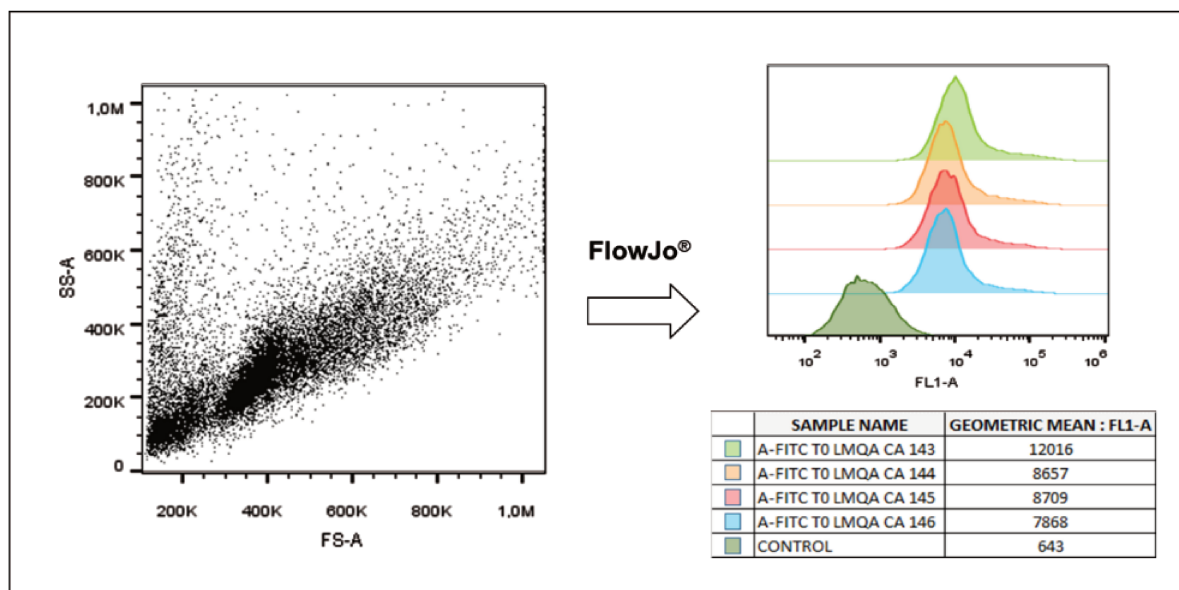


Figura 3- Esquematização da análise dos dados através do software FlowJo® para a obtenção da média geométrica da intensidade de fluorescência (MGIF) emitida pelas células de levedura no citômetro de fluxo.

2.6. Análise estatística

Todas as fermentações foram realizadas em quadruplicata para cada variável (LMQA SRC 143, LMQA SRC 143 BAL, PE-2, PE-2 BAL). Os dados de variação do pH e da concentração do substrato das fermentações foram apresentados pela média dos quatro valores com o desvio padrão correspondente. Os dados de concentração de etanol foram apresentados pela média dos resultados das três análises cromatográficas realizadas com a amostra mista (4 mL de amostra composta por 1 mL de cada fermentação como descrito no item 1.2.4) e o desvio padrão correspondente. A correlação entre os dados da concentração de etanol, consumo de substrato e pH foi realizada pela análise de correlação simples entre variáveis sendo considerado 1 % de significância ($p < 0.01$). As análises por citometria de fluxo foram realizadas independentemente para cada fermentação, ou seja, cada uma das quatro replicatas de cada fermentação foram coradas e analisadas individualmente. Os resultados para cada variável em função de cada corante AO, PI, FDA, ACRIFLAVINA ou A-FITC foram expressos pela média das 4 leituras com o desvio padrão correlato.

Tanto os dados fermentativos (pH, concentração de soluto e etanol) quanto os dados da fisiologia celular (média geométrica da intensidade da fluorescência emitida) tiveram a variância investigada pela ANOVA. Os dados foram comparados entre os diferentes tipos de inóculo (P, PB, L e LB) para avaliação do efeito da contaminação bacteriana, e entre as oito fermentações para avaliação do efeito do reciclo celular e lavagem ácida. A diferença

estatística significativa com 5 % de significância ($p \leq 0.05$) entre os dados com distribuição normal foi determinada pelo teste paramétrico de Scott-Knott, enquanto que a comparação estatística entre os dados não-normais foi determinada utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Além disso, somente a comparação entre os valores iniciais e finais da concentração de trealose (dados de A-FITC) foram comparados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney ao nível de 5 % de probabilidade. Todos os testes estatísticos deste trabalho foram realizados com o software Assistat versão 7.7 pt – free software - 2017 (Campina Grande, Brazil) (30).

3. Resultados

3.1. Dados gerais das fermentações

A análise global das oito fermentações revelou que a cepa LMQA SRC 143 (L) apresentou concentração média de $8,30 \pm 2,46$ % v/v de etanol, enquanto que a fermentação com a mesma cepa em co-cultura com a bactéria láctica (LB) apresentou concentração média de $9,01 \pm 1,20$ % v/v, ou seja, LB apresentou produção de etanol 7,88 % em média maior do que L. Em relação ao consumo de substrato analisado pela alteração de sólidos solúveis no mosto de fermentação foi de $7,29 \pm 1,98$ ° Brix para L e $8,01 \pm 1,34$ ° Brix (8,99 % maior) para LB. A variação média do pH de $1,21 \pm 0,14$ para as fermentações com L representou 0,83 % maior que a variação média do pH para as fermentações de LB que foi de $1,20 \pm 0,19$.

Nas fermentações com a cepa PE-2 (P) a concentração média de etanol $7,70 \pm 2,28$ % v/v etanol foi 8,57 % maior do que o valor médio de $7,04 \pm 1,96$ % v/v de etanol apresentado pela fermentação com o contaminante (PB). O consumo médio do substrato também foi maior para as fermentações puras. Com o valor de $8,80 \pm 2,80$ ° Brix o consumo de substrato por P representou 4,66 % maior que PB com $8,39 \pm 2,03$ ° Brix. A variação média do pH pela cepa PE-2 também foi distinta da resposta apresentada pela LMQA SRC 143. Para esta a fermentação contaminada apresentou variação 5,69 % maior do que a fermentação pura, sendo o valor de $1,16 \pm 0,13$ para P e $1,23 \pm 0,13$ para PB.

Apesar das variações entre os valores médios dos dados apresentados acima, a comparação entre as quatro formulações de inóculos (L, LB, P e PB) a nível de 5 % de significância demonstrou que não houve diferença estatística. Os dados destas análises estão descritos na **Tabela 1** – Etanol, **Tabela 2** – Consumo do substrato e **Tabela 3** – variação do pH.

Tabela 1- Valores da concentração de etanol obtidos nas oito fermentações sequenciais das cepas puras e contaminadas com a bactéria láctica em cultivo a 30 ° C durante 9 horas.

CONCENTRAÇÃO DE ETANOL (% v/v)				
Ferm.	P	PB	L	LB
1°	3,35 ± 0,26 ^{A, a}	4,36 ± 0,18 ^{AB, a}	3,78 ± 0,56 ^{A, a}	5,35 ± 0,10 ^{A, a}
2°	5,23 ± 0,32 ^{AB, b}	3,41 ± 0,40 ^{A, d}	4,33 ± 0,16 ^{A, c}	6,81 ± 0,05 ^{AB, a}
3°	6,78 ± 0,51 ^{AB, a}	7,88 ± 0,63 ^{AB, a}	7,89 ± 0,85 ^{A, a}	7,61 ± 0,17 ^{AB, a}
4°	8,41 ± 0,20 ^{AB, a}	7,59 ± 0,15 ^{AB, b}	8,59 ± 0,48 ^{A, a}	8,24 ± 0,23 ^{AB, a}
5°	9,45 ± 0,20 ^{AB, a}	8,08 ± 0,24 ^{AB, b}	8,02 ± 0,46 ^{A, b}	8,57 ± 0,72 ^{AB, b}
6°	9,47 ± 0,33 ^{AB, a}	8,94 ± 0,47 ^{B, a}	8,55 ± 0,69 ^{A, a}	9,32 ± 0,17 ^{B, a}
7°	8,94 ± 0,16 ^{AB, a}	8,74 ± 0,33 ^{B, a}	8,22 ± 0,29 ^{A, a}	8,80 ± 0,54 ^{AB, a}
8°	10,01 ± 0,78 ^{B, a}	7,35 ± 0,13 ^{AB, b}	8,91 ± 0,50 ^{A, a}	9,36 ± 0,42 ^{AB, a}
MED	7,70 ± 2,28 ^A	7,04 ± 1,96 ^A	8,30 ± 2,46 ^A	9,01 ± 1,20 ^A

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. Os dados da concentração de etanol no mosto são mostrados pela média ± desvio padrão. A primeira letra sobrescrita representa a relação estatística entre as oito fermentações, e a segunda letra sobrescrita representa a relação estatística entre as diferentes constituições dos inóculos na mesma etapa de fermentação. As letras maiúsculas indicam resultados obtidos através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as letras minúsculas indicam os resultados obtidos através do teste paramétrico de Scott-Knott. A comparação estatística da média foi obtida analisando os dados de todas as replicaras de todas as fermentações para cada tratamento.

3.2. Influência da presença do *Lactobacillus fermentum* nos parâmetros fermentativos

As análises estatísticas dos dados da produção de etanol revelaram que apenas a fermentação 2 apresentou diferença estatisticamente significativa entre L e LB. Neste caso, a fermentação 2 contaminada com o *L. fermentum* (LB) apresentou 6,81 ± 0,05 % v/v de etanol, valor em média 57,27 % maior do que a produção de etanol apresentada por (L) que foi de 4,33 ± 0,16 (**Tabela 1**).

Em relação ao consumo de substrato indicado pela alteração dos sólidos solúveis do mosto, entre L e LB não houve diferença significativa nas fermentações 3 e 8. Das fermentações com diferenças significativas, somente na fermentação 4 o consumo de substrato de L no valor de $9,83 \pm 0,34$ ° Brix foi maior em 13,24 % em relação à LB que apresentou $8,68 \pm 0,19$ ° Brix. Em oposição, LB apresentou maior consumo de substrato nas fermentações 1, 5, 6 e 7. Na fermentação 1, LB com $6,38 \pm 0,21$ ° Brix representou o consumo 26,83 % maior em relação aos $5,03 \pm 0,55$ ° Brix apresentado por L. Na fermentação 5 a diferença foi de 7,77 % em relação a fermentação pura, com LB apresentando $9,70 \pm 0,18$ ° Brix e L $9,00 \pm 0,18$ ° Brix. Seguindo, a diferença na fermentação 6 foi maior em 12,52 % em relação a fermentação pura, com LB de $10,78 \pm 0,77$ ° Brix e L de $9,58 \pm 0,30$ ° Brix, e para a fermentação 7 esta diferença foi de 10,53 %, com LB com $11,15 \pm 0,83$ ° Brix e L com $10,63 \pm 0,13$ ° Brix, apresentado na **Tabela 2**).

Tabela 2- Dados da avaliação do consumo de substrato através da variação de sólidos solúveis durante as oito fermentações sequenciais das cepas puras e contaminadas com a bactéria láctica em cultivo a 30 ° C durante 9 horas.

CONSUMO DO SUBSTRATO (° BX)				
Ferm.	P	PB	L	LB
1°	$4,63 \pm 1,33$ ^{B, a}	$5,33 \pm 0,17$ ^{B, a}	$5,03 \pm 0,55$ ^{C, a}	$6,38 \pm 0,21$ ^{B, b}
2°	$4,20 \pm 0,76$ ^{B, AB}	$4,80 \pm 0,52$ ^{AB, AB}	$3,63 \pm 0,95$ ^{BC, B}	$5,25 \pm 0,24$ ^{B, A}
3°	$8,93 \pm 0,26$ ^{AB, a}	$8,83 \pm 0,26$ ^{AB, a}	$8,65 \pm 0,26$ ^{ABC, a}	$9,15 \pm 0,65$ ^{AB, a}
4°	$8,73 \pm 0,38$ ^{AB, a}	$10,18 \pm 0,77$ ^{A, b}	$9,83 \pm 0,34$ ^{ABC, b}	$8,68 \pm 0,19$ ^{AB, a}
5°	$10,70 \pm 0,08$ ^{AB, A}	$9,13 \pm 0,22$ ^{AB, B}	$9,00 \pm 0,18$ ^{ABC, B}	$9,70 \pm 0,18$ ^{AB, AB}
6°	$10,33 \pm 0,21$ ^{AB, b}	$9,38 \pm 0,41$ ^{A, a}	$9,58 \pm 0,30$ ^{AB, a}	$10,78 \pm 0,77$ ^{A, b}
7°	$11,53 \pm 0,30$ ^{A, c}	$9,83 \pm 0,30$ ^{AB, a}	$10,08 \pm 0,30$ ^{ABC, a}	$10,98 \pm 0,29$ ^{AB, b}
8°	$11,38 \pm 0,28$ ^{A, b}	$9,65 \pm 0,54$ ^{A, a}	$10,63 \pm 0,13$ ^{A, b}	$11,15 \pm 0,83$ ^{A, b}
MED	$8,80 \pm 2,80$ ^A	$8,39 \pm 2,03$ ^A	$7,29 \pm 1,98$ ^A	$8,01 \pm 1,34$ ^A

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. Os dados do consumo de substrato através da variação de sólidos solúveis no mosto são mostrados pela média $\pm$ desvio padrão. A primeira letra sobrescrita representa a relação estatística entre as oito fermentações, e a segunda letra sobrescrita representa a relação estatística entre as diferentes constituições dos inóculos na mesma etapa de fermentação. As letras maiúsculas indicam resultados obtidos através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as letras minúsculas indicam os resultados obtidos através do teste paramétrico de Scott-Knott. A comparação estatística da média foi obtida analisando os dados de todas as replicar de todas as fermentações para cada tratamento.

Apesar do pH ter apresentado variação pouco acentuada, a variação de pH entre L e LB nas fermentações 1, 3 e 5 foram diferentes estatisticamente. Na fermentação 1, LB apresentou variação média de pH de 1,49 sendo 12,87 % maior que L que apresentou pH de 1,32. Nas fermentações 3 e 5 a maior variação foi observada em L, sendo os valores para esta

cepa pura 4,46 % e 1,80 % maiores em relação às fermentações contaminadas. A variação média na fermentação 3 foi de $1,17 \pm 0,03$ para L e $1,12 \pm 0,02$ para LB, e na fermentação 5 foi de $1,17 \pm 0,02$ para L e $1,105 \pm 0,02$ para LB, como mostrado na **Tabela 3**.

Entre as fermentações inoculadas com a cepa PE-2 pura (P) e contaminada com a bactéria (PB) diferenças estatísticas significativas foram observadas nos dados de produção de etanol das fermentações 2, 4, 5, 8. Diferentemente dos dados da cepa LMQA SRC 143, para PE-2 o inóculo puro sempre apresentou produção de etanol maior do que a fermentação contaminada. Na fermentação 2 a diferença na produção de etanol de L foi 53,37 % maior em relação a LB, com L apresentando $5,23 \pm 0,32$ % v/v e LB $3,41 \pm 0,40$ % v/v. Com produção de $8,41 \pm 0,20$ % v/v, P apresentou produção 10,80 % maior em relação a PB que apresentou $7,59 \pm 0,15$ % v/v de etanol na fermentação 4. Na fermentação 5 a produção de $9,45 \pm 0,20$ % v/v em P foi 16,95 % maior em relação a LB que apresentou $8,08 \pm 0,24$ % v/v. E na fermentação 8, a produção de $10,01 \pm 0,78$ % v/v por L foi 36,05 % maior em relação aos $7,35 \pm 0,13$ % v/v apresentado por LB, exposto na **Tabela 1**.

Tabela 3 - Dados da variação do pH durante as 8 fermentações sequenciais das cepas puras e contaminadas com a bactéria láctica em cultivo a 30 ° C durante 9 horas..

VARIAÇÃO DO pH				
Ferm.	P	PB	L	LB
1°	$1,09 \pm 0,02$ ^{BC, a}	$1,29 \pm 0,00$ ^{AB, b}	$1,32 \pm 0,05$ ^{AB, b}	$1,49 \pm 0,02$ ^{ABC, c}
2°	$0,89 \pm 0,03$ ^{C, a}	$1,01 \pm 0,04$ ^{B, b}	$0,92 \pm 0,06$ ^{B, a}	$0,89 \pm 0,05$ ^{C, a}
3°	$1,22 \pm 0,07$ ^{ABC, A}	$1,19 \pm 0,02$ ^{AB, AB}	$1,17 \pm 0,03$ ^{AB, AB}	$1,12 \pm 0,02$ ^{BC, B}
4°	$1,39 \pm 0,03$ ^{A, a}	$1,34 \pm 0,07$ ^{A, a}	$1,33 \pm 0,01$ ^{A, a}	$1,38 \pm 0,02$ ^{A, a}
5°	$1,14 \pm 0,04$ ^{ABC, b}	$1,20 \pm 0,01$ ^{AB, c}	$1,17 \pm 0,02$ ^{AB, b}	$1,05 \pm 0,02$ ^{ABC, a}
6°	$1,00 \pm 0,04$ ^{BC, a}	$1,10 \pm 0,01$ ^{B, b}	$1,11 \pm 0,02$ ^{B, b}	$1,08 \pm 0,09$ ^{BC, b}
7°	$1,34 \pm 0,03$ ^{AB, A}	$1,39 \pm 0,00$ ^{A, A}	$1,36 \pm 0,11$ ^{A, A}	$1,28 \pm 0,01$ ^{AB, A}
8°	$1,18 \pm 0,05$ ^{ABC, a}	$1,30 \pm 0,01$ ^{AB, b}	$1,30 \pm 0,02$ ^{AB, b}	$1,29 \pm 0,10$ ^{ABC, b}
MED	$1,16 \pm 0,16$ ^A	$1,23 \pm 0,13$ ^A	$1,21 \pm 0,14$ ^A	$1,20 \pm 0,19$ ^A

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. Os dados da variação de pH são mostrados pela média $\pm$ desvio padrão. A primeira letra sobrescrita representa a relação estatística entre as oito fermentações, e a segunda letra sobrescrita representa a relação estatística entre as diferentes constituições dos inóculos na mesma etapa de fermentação. As letras maiúsculas indicam resultados obtidos através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as letras minúsculas indicam os resultados obtidos através do teste paramétrico de Scott-Knott. A comparação estatística da média foi obtida analisando os dados de todas as replicar de todas as fermentações para cada tratamento.

A contaminação bacteriana não conferiu diferença significativa nos dados do consumo de substrato nas três primeiras fermentações de PE-2. PB apresentou consumo de substrato superior a P somente na fermentação 4. Nesta fermentação o consumo de $10,18 \pm 0,77$ ° Brix foi 16,60 % maior em relação aos $8,73 \pm 0,38$ ° Brix apresentado por P. Na fermentação 5 a diferença de 17,19 % foi a maior em relação ao valor de PB, na fermentação 6 a diferença foi de 10,12 %, na fermentação 7 foi de 17,29 %, e na fermentação 8 foi de 17,92 %. Com o consumo médio de substrato nestas fermentações de (fermentação 5) P $10,70 \pm 0,08$ ° Brix e PB $9,13 \pm 0,22$ ° Brix, (fermentação 6) P $10,33 \pm 0,21$ ° Brix e PB $9,38 \pm 0,41$, (fermentação 7) P $11,53 \pm 0,30$ e PB $9,83 \pm 0,30$, (fermentação 8) P $11,38 \pm 0,28$ e PB $9,65 \pm 0,54$, demonstrado na **Tabela 2**.

Assim como observado nas fermentações com LMQA SRC 143, as variações do pH para as fermentações com a cepa PE-2 não foram expressivas, entretanto neste caso a fermentação contaminada apresentou maior variação estatística do pH (redução) em 5 das 8 fermentações analisadas, com maior variação observada na fermentação 1 (com diferença média de 0,20). As fermentações que não apresentaram diferença significativa entre as fermentações puras e contaminadas de PE-2 foram a 4 e a 7. Dentre as fermentações que apresentaram diferença significativa, somente na fermentação 3 que foi observado maior variação de pH pela fermentação pura (P), na proporção de 2,52 % em relação à fermentação contaminada (PB). Nesta fermentação a variação média do pH foi de $1,22 \pm 0,07$ para P e $1,19 \pm 0,02$ para PB. Nas fermentações 1, 2, 5, 6, e 8 a fermentação de PE-2 pura apresentou respectivamente 15,50 %, 11,88 %, 5,00 %, 9,09 %, e 10,17% menor variação de pH em relação às fermentações contaminadas (PB). O valor médio da variação média do pH nestas fermentações foram (fermentação 1) $1,29 \pm 0,00$ para PB e $1,09 \pm 0,02$ para P, (fermentação 2) $1,01 \pm 0,04$ para PB e 0,89 para P, (fermentação 5) $1,20 \pm 0,01$ para PB e $1,14 \pm 0,04$ para P, (fermentação 6) $1,10 \pm 0,01$ para PB e $1,00 \pm 0,04$ para P, e (fermentação 8) $1,30 \pm 0,01$ para PB e $1,18 \pm 0,05$ para P, mostrado na **Tabela 3**.

3.3. Efeito do reciclo de células com a lavagem ácida nos parâmetros fermentativos

A análise dos resultados das oito fermentações para cada variável (P, PB, L, LB) revelou 3 perfis diferentes na dinâmica dos dados de produção de etanol, sendo: a) valores médios ascendentes, porém sem diferença estatística; b) ascensão dos valores de média, com

diferença estatística entre a primeira e última fermentação; c) ascensão dos valores de média, seguido pelo decaimento.

Para a fermentação com a cepa LMQA SRC 143 pura, apesar da ascendência nos valores (e diferença de 5,13 entre o maior e o menor valor da média da concentração de etanol), não houve diferença estatística a nível de 5 % de significância entre todas as fermentações (dinâmica a). Nas fermentações com PE-2 pura a dinâmica observada foi a ascensão intermitente dos valores médios de etanol entre as oito fermentações (dinâmica b). Para este inóculo, a primeira fermentação apresentou o valor estatisticamente mais baixo para etanol e a última fermentação apresentou o valor mais alto, enquanto que as fermentações intermediárias não apresentaram diferença significativa. O terceiro perfil foi observado nas fermentações contaminadas com o *L. fermentum* (dinâmica c). Nestas fermentações houve a ascensão dos dados até um platô seguido por declínio. Para a cepa LMQA SRC 143 contaminada com a bactéria (LB) o platô foi observado na fermentação 6, e para a cepa PE-2 contaminada (PB) as fermentações 6 e 7 foram os pontos máximos, e em seguida estas fermentações contaminadas apresentaram redução estatisticamente significativa nos dados de produção de etanol. A progressão dos dados da concentração de etanol, consumo do substrato e pH para as fermentações puras e contaminadas podem ser observadas nos gráficos da **Figura 4**.

Em números, L apresentou o máximo valor médio em etanol (mesmo que estatisticamente não significativo) que foi de $8,91 \pm 0,5$ % v/v, e P apresentou máximo valor médio em etanol de $10,01 \pm 0,78$ % v/v. Tanto L como P apresentaram o maior valor médio na fermentação 8. Para a fermentação de LB o valor médio máximo em etanol obtido foi de $9,32 \pm 0,17$ % v/v na fermentação 6, e para a fermentação de PB esta máxima foi obtida e mantida nas fermentações 6 e 7, com os valores de $8,94 \pm 0,47$ % v/v e $8,74 \pm 0,33$ % v/v, respectivamente. Estes dados estão expostos na **Tabela 1**.

Diferentemente da produção de etanol, o consumo de substrato pela cepa LMQA SRC 143 pura (L), assim como para a cepa PE-2 pura (P), apresentou ascensão dos dados sem declínio estatisticamente significativo. Para L o consumo de substrato na fermentação 1 ($5,03 \pm 0,55$ ° Brix) foi estatisticamente menor, enquanto que para P as mínimas estatisticamente diferentes foram observadas nas fermentações 1 ($4,63 \pm 1,33$ ° Brix) e 2 ($4,20 \pm 0,76$ ° Brix). Nestes dois casos o consumo máximo de substrato foi atingido na fermentação 8 ($10,63 \pm 0,13$ ° Brix para L e $11,38 \pm 0,28$ ° Brix para P). Nas fermentações contaminadas (LB e PB) os dados de consumo de substrato oscilaram, não apresentando apenas um pico máximo. De

acordo com as análises estatísticas foi possível afirmar que as fermentações 1 ($6,38 \pm 0,21$ ° Brix) e 2 ($5,25 \pm 0,24$ ° Brix) apresentaram os valores mínimos e as fermentações 6 ($10,78 \pm 0,77$ ° Brix) e 8 ($11,15 \pm 0,83$ ° Brix) apresentaram valores de máxima para LB. Para PB somente a fermentação 1 ($5,33 \pm 0,17$ ° Brix) apresentou valor mínimo, enquanto que as fermentações 4 ($10,18 \pm 0,77$ ° Brix), 6 ($9,38 \pm 0,41$ ° Brix) e 8 ($9,65 \pm 0,54$ ° Brix) apresentaram os valores máximos, como apresentados na **Tabela 2**.

As análises dos valores da variação de pH revelaram que não há uma dinâmica clara e condizente entre as oito fermentações para nenhuma das quatro variáveis (L, LB, P, PB). Essa falta de projeção dos dados de pH condiz com a falta de correlação com os dados de etanol e de consumo de substrato apresentada pela análise de correlação simples entre esses três parâmetros fermentativos. Com máxima variação do pH nas fermentações 4 e 7 para L e PB, e na fermentação 4 para LB e P, e com as menores variações de pH nas fermentações 2 e 6 para L e PB, e somente na fermentação 2 para LB e P, esses dados no contexto geral das fermentações são desconexos.

Numericamente, para P as menores variações do pH foram de $0,92 \pm 0,06$ (fermentação 2), $1,11 \pm 0,02$ (fermentação 6), enquanto que as maiores variações foram de $1,33 \pm 0,01$ (fermentação 4) e $1,36 \pm 0,11$ (fermentação 7). Para PB a menor variação foi de $0,89 \pm 0,05$ (fermentação 2), e a maior foi de $1,38 \pm 0,02$ (fermentação 4). Dentre as fermentações P a menor variação do pH foi de $0,89 \pm 0,03$ (fermentação 2), e a maior foi de $1,39 \pm 0,03$ (fermentação 4). E entre as fermentações PB as menores variações foram de $1,01 \pm 0,04$ (fermentação 2) e $1,10 \pm 0,01$ (fermentação 6), e as máximas de $1,34 \pm 0,07$ (fermentação 4) e $1,39 \pm 0,00$ (fermentação 7). Valores mostrados na **Tabela 3**.

3.4. Fisiologia celular

O estado fisiológico das células das leveduras foi analisado por citometria de fluxo no início (T1 – após a fermentação 1), no meio (T2 – após a fermentação 4) e ao final do ciclo de fermentações (T3 – após a fermentação 8) e os dados estão apresentados pelas médias geométricas da intensidade de fluorescência (GMFI - geometric mean fluorescence intensity) emitida pela população de células analisadas, ou seja, emitida pelas leveduras LMQA SRC 143 e PE-2 fermentadas puras ou na presença da bactéria láctica. A média e o desvio padrão apresentados no texto e nas tabelas consideram o resultado das quatro replicatas analisadas.

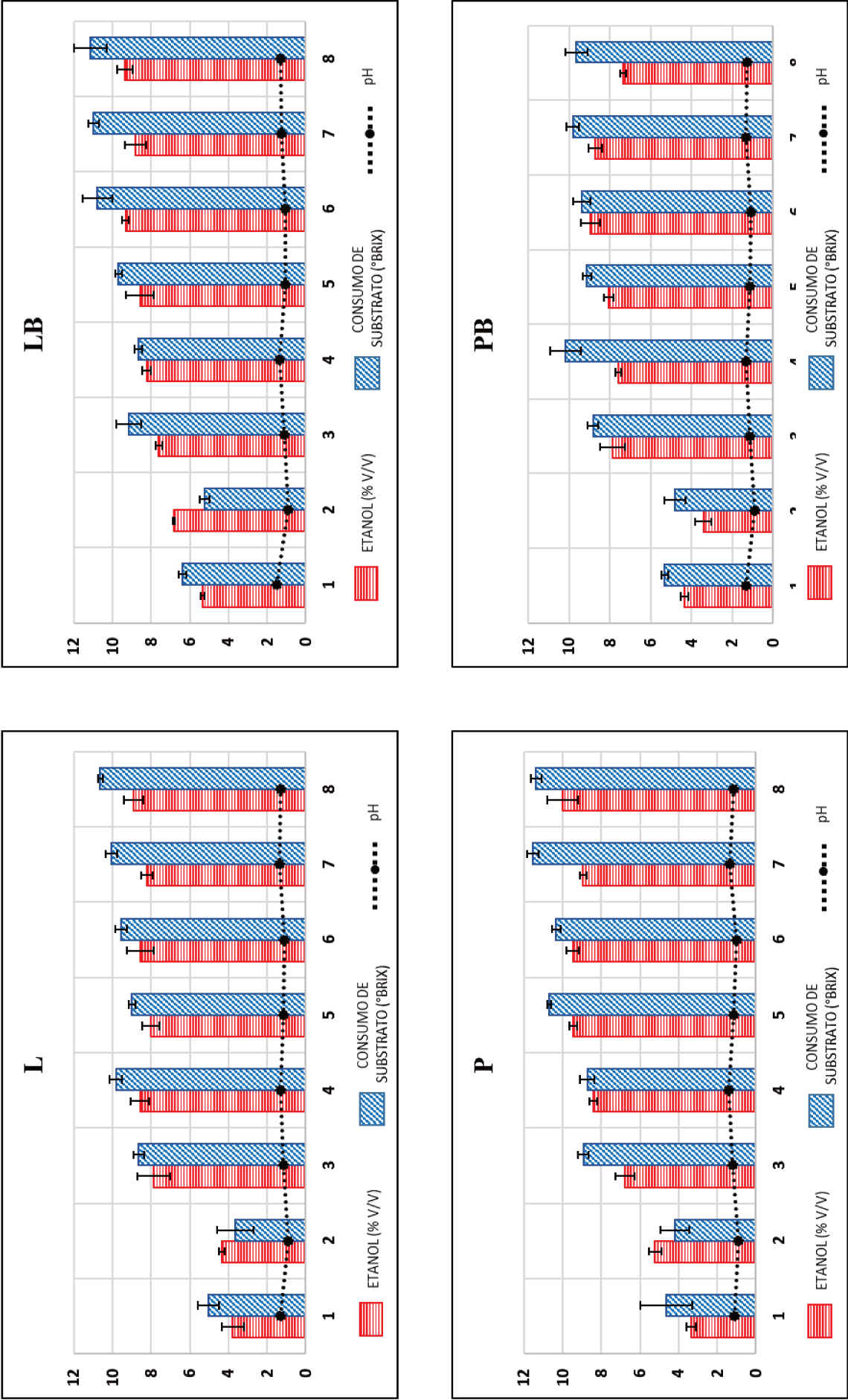


Figura 4- Visão global da dinâmica dos dados de etanol, substrato, e pH obtidos nas fermentações com as cepas LMQA SRC 143 e PE-2 puras e contaminadas durante oito fermentações consecutivas. Dados mostrados: média $\pm$ desvio padrão.

Os resultados serão apresentados de acordo com a sequência da metodologia de coloração das células. Para melhor demonstração visual dos parâmetros fisiológicos em função do reciclo de células para as células fermentadas puras e na presença do contaminante, além das tabelas individuais, os **Materiais Suplementares - Apêndice** traz os gráficos com todas as respostas mostradas simultaneamente.

3.4.1. Vitalidade celular

A vitalidade foi analisada por meio da degradação da molécula de Fluoresceína Diacetato (FDA) pela atividade esterásica intracelular. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência emitida pela degradação do FDA são mostrados em média com o desvio padrão na **Tabela 4**. Inicialmente (**T1**) a atividade esterásica nas amostras de L (145506 ± 12747) e LB (144105 ± 14910) foram maiores quando comparadas às fermentações P (3971 ± 1295) e PB (92375 ± 4719). Além disso, os dados indicam que a contaminação bacteriana não influenciou na vitalidade da cepa LMQA SRC 143, entretanto atuou fortemente na cepa PE-2, aumentando a resposta em 23,3 vezes. Adiante, após a 4^o fermentação (**T2**), ambas as cepas apresentaram maior vitalidade celular em co-cultura com a bactéria lática. A atividade esterásica de L (739 ± 215) foi 1,73 menor que a observada em LB (1277 ± 1650), e P (8508 ± 375) foi 2,18 vezes menor do que PB (18549 ± 8737). Ao final dos oito ciclos fermentativos (**T3**), houve maior influência da contaminação bacteriana para a cepa LMQA SRC 143. Neste momento das análises a fluorescência decorrente da degradação do FDA em LB (2657 ± 486) foi 17,37 vezes maior do que L (153 ± 138), enquanto que a atividade de P (2130 ± 770) foi apenas 1,68 vezes maior do que PB (1267 ± 166).

Avaliando isoladamente cada tratamento (L, LB, P, PB) nos três momentos distintos dos ciclos fermentativos (T1, T2 e T3), que em geral o reciclo de células com a lavagem ácida confere a redução da vitalidade celular. Considerando T1 como parâmetro, L demonstrou queda muito acentuada de 196,89 vezes em T2, e queda de 951,01 vezes em T3. LB também demonstrou brusca redução da vitalidade na razão de 112,84 vezes em T2 e 54,23 vezes em T3. Entre os dados de PE-2, os valores de fluorescência de P revelaram um aumento de 2,14 vezes em T2, porém em T3 a vitalidade foi 1,86 vezes menor que T1. E para PB, a vitalidade diminuiu 4,98 vezes em T2, e 72,9 vezes em T3, considerando T1 como parâmetro.

Tabela 4- Dados de vitalidade celular obtido através da média geométrica da intensidade de fluorescência de fluoresceína diacetato (FDA).

VITALIDADE CELULAR - FDA						
Inóculo	T1		T2		T3	
P	3972	± 1295 ^{A, AB}	8509	± 375 ^{AB, B}	2130	± 770 ^{AB, A}
PB	92375	± 4719 ^{AB, B}	18549	± 8737 ^{B, AB}	1267	± 166 ^{AB, A}
L	145506	± 12747 ^{B, B}	739	± 215 ^{A, AB}	153	± 138 ^{A, A}
LB	144105	± 14910 ^{B, B}	1277	± 1650 ^{A, A}	2657	± 486 ^{B, AB}

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. **T1** – análise realizada após a 1^o fermentação; **T2**- análise realizada após a 4^o fermentação; **T3** – análise realizada após a 8^o fermentação. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência de FDA foram analisadas através de quatro replicatas estão apresentado na tabela pela média ± desvio padrão. As letras sobrescritas representam respectivamente a relação estatística entre as os diferentes inóculos e a relação estatística entre os diferentes tempos comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

3.4.2. Glicogênio e trealose celular

Tabela 5- Dados de glicogênio intracelular obtido através da média geométrica da intensidade de fluorescência de Acriflavina.

GLICOGÊNIO INTRACELULAR - ACRIFLAVINA						
Inóculo	T1		T2		T3	
P	65498	± 11421 ^{B, A}	177987	± 12612 ^{AB, B}	114825	± 12261 ^{B, AB}
PB	140	± 65 ^{AB, A}	262863	± 52054 ^{B, B}	51669	± 9776 ^{AB, AB}
L	250	± 78 ^{AB, A}	80885	± 29515 ^{A, B}	1233	± 366 ^{A, AB}
LB	*0	± 0 ^{A, A}	112684	± 46699 ^{AB, B}	73563	± 33046 ^{B, AB}

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. **T1** – análise realizada após a 1^o fermentação; **T2**- análise realizada após a 4^o fermentação; **T3** – análise realizada após a 8^o fermentação. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência de Acriflavina foram analisadas através de quatro replicatas estão apresentados na tabela pela média ± desvio padrão. As letras sobrescritas representam respectivamente a relação estatística entre as os diferentes inóculos e a relação estatística entre os diferentes tempos comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

* Apresentou fluorescência inferior ao padrão sem o corante.

O conteúdo intracelular de glicogênio e trealose foram avaliados por fluorescência emitida pela acriflana e A-FITC respectivamente. Os dados para glicogênio foram coletados após a primeira (T1), quarta (T2) e oitava (T3) fermentação, enquanto que os dados de trealose foram analisados somente após a primeira (T1) e a oitava (T3) fermentação. Os resultados da média geométrica da intensidade luminosa de acriflavina estão descritos na **Tabela 5**, e de A-FITC estão na **Tabela 6**.

Após a primeira fermentação (**T1**) os dados da fluorescência de acriflavina indicaram que a contaminação bacteriana influencia na menor concentração de reservas de glicogênio pelas cepas de levedura estudadas. A fermentação LB apresentou o mesmo nível de fluorescência que o controle não corado, indicando a ausência ou insípida concentração de glicogênio, enquanto que L (250 ± 78) demonstrou fluorescência em média 250 vezes maior. A fluorescência de P (65498 ± 11421) corado com acriflavina foi 467,84 vezes maior que a obtida por PB (140 ± 65). Em contrapartida, para os dados de trealose a contaminação bacteriana não apresentou comprometimento homogêneo para as duas cepas analisadas. A contaminação para a cepa LMQA SRC 143 representou a redução de 20,4 vezes na fluorescência comparada com a cepa pura, no entanto, para a cepa PE-2 a contaminação influenciou na fluorescência 2,2 vezes maior. Neste primeiro momento, os valores da GMFI de A-FITC foram de 8156 ± 872 para L, 399 ± 264 para LB, 1438 ± 1045 para P, e 3174 ± 716 para PB. Após a 4^ª fermentação (**T2**) a concentração de glicogênio nas leveduras fermentadas com a bactéria aumentou, ficando a concentração de LB (112684 ± 46699) 1,39 vezes maior que L (80885 ± 29515), e a concentração de PB (262863 ± 52054) 1,47 vezes maior que P (177987 ± 12612). Ao final da oitava fermentação (**T3**) a concentração de glicogênio nas células da cepa LMQA SRC 143 fermentada com a bactéria (LB 73563 ± 33046) foi 59,7 vezes maior do que a concentração nas cepas puras (1233 ± 366), enquanto que para a cepa PE-2 pura (P 114825 ± 12261) a concentração foi 2,22 vezes maior do que a concentração encontrada nas células fermentadas com a bactéria (PB 51669 ± 9776). A concentração de trealose em T3 foi maior nas células fermentadas sem a contaminação para ambas as cepas, com L (101038 ± 23949) 38,7 vezes maior que LB (2611 ± 107), e P (3733 ± 2438) 1,43 vezes maior que PB (2604 ± 1620).

Tabela 6- Dados de trealose intracelular obtido através da média geométrica da intensidade de fluorescência de A-FITC.

TREALOSE INTRACELULAR – A-FITC		
Inóculo	T1	T3
P	1438 ± 1045 ^{AB, a}	3733 ± 2438 ^{A, a}
PB	4232 ± 716 ^{AB, a}	3471 ± 1620 ^{A, a}
L	8156 ± 872 ^{B, a}	134717 ± 23949 ^{B, b}
LB	399 ± 264 ^{A, a}	2611 ± 107 ^{A, b}

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. **T1** – análise realizada após a 1^o fermentação; **T2**- análise realizada após a 4^o fermentação; **T3** – análise realizada após a 8^o fermentação. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência de A-FITC foram analisadas através de quatro replicatas estão apresentados na tabela pela média ± desvio padrão. As letras maiúsculas indicam resultados obtidos através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e as letras minúsculas indicam os resultados obtidos através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A dinâmica no acúmulo de glicogênio nos três períodos (T1, T2 e T3) demonstrou que para todas as variáveis estudadas (L, LB, P e PB) houve um aumento em T2 e posterior queda em T3. Considerando esta dinâmica, para L houve um aumento de 323,54 em T2, e deste valor houve a redução de 65,6 vezes em T3. Para LB houve o aumento inicial de 112684 vezes (*considerando que toda a fluorescência emitida em T2 representa o glicogênio acumulado), com posterior queda de 1,53 vezes em T3. A fluorescência de P teve aumento de 2,71 vezes em T2, seguido pela redução de 1,55 vezes em T3. E para PB o aumento foi de 1877,59 vezes em T2, seguido pela redução de 5,08 vezes em T3. A relação inicial (T1) e final (T3) da concentração de trealose demonstrou que para LMQA SRC 143 fermentada pura ou na presença da bactéria houve aumento respectivo de 12,38 e 6,54 vezes na concentração final, contudo, para as células de PE-2 o aumento de 2,59 vezes para as cepas fermentadas puras, e a redução de 1,21 vezes para as cepas fermentadas com a bactéria não representaram diferença significativa a nível de 5 %.

3.4.3. Viabilidade celular

Os corantes Alaranjado de Acridina (AO) e Iodeto de Propídio (PI) foram usados respectivamente para avaliar a integridade do material genético e a integridade e permeabilidade da membrana celular, características que indicam a viabilidade celular. Para estes dois corantes houve diferenças significativas entre os valores das fermentações com as diferentes cepas de leveduras, entretanto estas variações não podem ser relacionadas com a

resposta fisiológica referente à viabilidade. Para os corantes AO e PI a intensidade da fluorescência é influenciada pela composição inata de ácidos nucleicos que pode variar extremamente devido a constituição genética de cada cepa. Por este motivo, para estes corantes serão consideradas somente as variações apresentadas pela mesma cepa de levedura. A média e o desvio padrão apresentado pela fluorescência destes corantes nas diferentes conformações de inóculo nos três momentos analisados podem ser conferidos na **Tabela 7** (Iodeto de Propídio) e **Tabela 8** (Alaranjado de Acridina).

Tabela 7- Dada da viabilidade celular demonstrado pela permeabilidade da membrana plasmática através da média geométrica da intensidade de fluorescência de Iodeto de Propídio (PI).

VIABILIDADE (PERMEABILIDADE DE MEMBRANA) - PI						
Inóculo	T1		T2		T3	
P	84	± 39 ^{AB, A}	119	± 62 ^{A, AB}	411	± 13 ^{A, B}
PB	74	± 64 ^{A, A}	294	± 173 ^{A, AB}	580	± 32 ^{AB, B}
L	376	± 111 ^{B, A}	795	± 767 ^{A, AB}	6719	± 4226 ^{B, B}
LB	194	± 90 ^{AB, A}	387	± 55 ^{A, AB}	542	± 13 ^{AB, B}

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. **T1** – análise realizada após a 1ª fermentação; **T2** – análise realizada após a 4ª fermentação; **T3** – análise realizada após a 8ª fermentação. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência de PI foram analisados através de quatro replicatas estão apresentados na tabela pela média ± desvio padrão. As letras sobrescritas representam respectivamente a relação estatística entre as os diferentes inóculos e a relação estatística entre os diferentes tempos comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

No primeiro ciclo de fermentação (**T1**) a contaminação bacteriana não influenciou nas respostas fisiológicas testadas para estes corantes. A GMFI de AO e PI foi respectivamente de 143455 ± 23972 e 376 ± 111 para L, 140426 ± 26801 e 194 ± 90 para LB, 69893 ± 5355 e 84 ± 39 para P, e 53768 ± 8817 e 194 ± 90 para PB. Após a 4ª fermentação (**T2**) as fermentações com a cepa LMQA SRC 143 não apresentaram alterações significativas para ambos os corantes, enquanto que PE-2 apresentou divergência nos dados de AO em função da contaminação bacteriana. Em valores a GMFI de AO e PI foi respectivamente de 78055 ± 8793 e 795 ± 767 para L, 51517 ± 1409 e 387 ± 55 para LB, 44024 ± 3633 e 119 ± 62 para P, e 82652 ± 4663 e 294 ± 173 para PB. Estes dados demonstram que a fluorescência referente à integridade do DNA foi em média 87,74 % maior para a fermentação de PE-2 contaminada

em relação à fermentação pura, porém sem divergência significativa na integridade da membrana entre estes tratamentos. Ao final das 8 fermentações (**T3**) os dados demonstraram interferência positiva da contaminação bacteriana para as fermentações com a cepa LMQA SRC 143. Em relação aos dois corantes, foi possível perceber que houve menor interação de AO e maior interação de PI com os ácidos nucleicos presentes nas células de LMQA SRC 143 puras, indicando expressiva queda da viabilidade. Para PE-2 a relação da fluorescência é inversa, demonstrado que a fermentação pura apresenta maior viabilidade. Embora não representativo ao nível de 5 %, o valor de 4502 ± 2889 GMFI em AO apresentado por LMQA SRC 143 pura foi 3,7 vezes menor do que o valor apresentado com o inóculo contaminado, que foi de 16721 ± 1315 . Para PI, o valor de 6719 ± 4226 apresentado pela cepa pura foi 12,4 vezes maior que os 542 ± 13 pelo inóculo contaminado. Para as fermentações com PE-2, o AO com valor de 26737 ± 4135 apresentado por P foi 1,9 vezes maior que o valor de 13720 ± 695 apresentado por PB, e PI de 411 ± 13 apresentado por P foi 1,4 vezes menor que o valor de 580 ± 32 apresentado por PB.

Tabela 8- Dada da viabilidade celular demonstrado pela integridade do material genético através da média geométrica da intensidade de fluorescência de Alaranjado de Acridina (AO).

VIABILIDADE (INTEGRIDADE DO MATERIAL GENÉTICO) - AO						
Inoculum	T1		T2		T3	
P	69893	± 5355 ^{AB, B}	44024	± 3633 ^{A, AB}	26737	± 4135 ^{B, A}
PB	53768	± 8817 ^{A, AB}	82652	± 4663 ^{B, B}	13720	± 695 ^{AB, A}
L	143455	± 23972 ^{B, B}	78055	± 8793 ^{AB, AB}	4502	± 2889 ^{A, A}
LB	140426	± 26801 ^{B, B}	51517	± 1409 ^{AB, AB}	16721	± 1315 ^{AB, A}

P – *S. cerevisiae* PE-2; **PB** – *S. cerevisiae* PE-2 + *L. fermentum*; **L** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143; **LB** – *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 + *L. fermentum*. **T1** – análise realizada após a 1ª fermentação; **T2** – análise realizada após a 4ª fermentação; **T3** – análise realizada após a 8ª fermentação. Os dados da média geométrica da intensidade da fluorescência de AO foram analisados através de quatro replicatas estão apresentados na tabela pela média $\pm$ desvio padrão. As letras sobrescritas representam respectivamente a relação estatística entre as os diferentes inóculos e a relação estatística entre os diferentes tempos comparados através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Considerando a ação do ciclo de células com as lavagens ácidas, é possível observar que nas duas cepas existe a tendência ao aumento da fluorescência de PI e queda na fluorescência de AO, ou seja, redução da viabilidade celular. Considerando T1 como parâmetro, a fluorescência de AO emitida nos tempos T2 e T3 em média foram 1,84 e 31,86

vezes menores para L, 2,76 e 8,39 vezes menores para LB, 1,59 e 2,61 menores para P, e contraditoriamente 1,53 vezes maior em T2 e 3,91 vezes menor em T3 para PB. A fluorescência de PI nos tempos T2 e T3 em média foi 2,11 e 17,86 vezes maior para L, 1,99 e 2,79 vezes maior para LB, 1,41 e 4,89 vezes maior para P, e para PB, 3,97 e 7,83 vezes maior em relação à T1.

4. Discussão

Proveniente do inóculo reciclado de fermentação espontânea de cachaça artesanal, a cepa LMQA SRC 143 apresentou relevante atuação em fermentação com xarope de cana-de-açúcar 13° Brix. Em fermentação em meio sintético, os dados de rendimento celular ($Y_{x/s} = 0,045$), rendimento em etanol ($Y_{p/s} = 0,454$) e produtividade ($Prod = 2,499$) demonstram em experimentos prévios que esta cepa se apresenta dentro do perfil esperado para cepas industriais (26, 31). Além da relevante atuação fermentativa, outro aspecto foi decisivo para a seleção desta cepa para este trabalho. A LMQA SRC 143 demonstrou maior viabilidade celular em co-cultura com a bactéria *L. fermentum* CCT1668 quando comparada com outras cepas provenientes da produção de cachaça que também apresentaram alta capacidade fermentativa. Após 48 horas em xarope de caldo-de-cana 20 ° brix, esta cepa demonstrou 94,3 % de viabilidade (por azul de metileno) quando inoculada na mesma proporção que a bactéria contaminante (10^8 UFC.mL⁻¹).

O diferencial desta cepa pode estar intimamente relacionado com as características do ambiente do qual ela foi isolada. O estresse presente na fermentação espontânea para a produção de cachaça é semelhante ao encontrado no processo de produção de etanol combustível. Além disso, para a produção de cachaça artesanal não há a etapa de lavagem ácida entre os ciclos celulares, instigando ainda mais o contato entre leveduras e bactérias autóctones ao processo, e consequentemente a seleção natural por leveduras mais resistentes.

Neste trabalho a LMQA SRC 143 foi comparada com a cepa amplamente utilizada industrialmente PE-2. Desde seu isolamento na usina da Pedra em 1994, esta levedura teve grande aceitação industrial pelas relevantes características fermentativas, sendo uma das mais importantes cepas utilizadas na atualidade para produção de etanol de cana-de-açúcar (2, 3, 22). Esta cepa tem como característica marcante a alta produtividade e a plasticidade genética

que concede maior robustez frente aos diversos estresses fermentativos, apresentando alta viabilidade e manutenção da produtividade (3, 5, 22).

O *Lactobacillus fermentum* é uma espécie de bactéria láctica heterofermentativa capaz de perdurar no processo durante o reciclo de células influenciando negativamente no desempenho fermentativo das leveduras (7, 21). Esta espécie apresenta alta taxa de crescimento, maior produção de metabólitos extracelulares que outras espécies em ambiente fermentativo (21). Neste trabalho, a contaminação com esta bactéria promoveu respostas distintas entre as leveduras estudadas. Para a cepa LMQA SRC 143, a contaminação não alterou pontualmente a produção de etanol. Analisando separadamente, somente uma única fermentação apresentou diferença estatística, com a concentração final de etanol no mosto de fermentação maior quando na presença da bactéria (fermentação 6). De maneira geral, a média da produção de etanol pelas fermentações de LMQA SRC 143 contaminadas foi 7,88 % maior. Esta diferença entre a ação da bactéria nas leveduras também é observada no consumo de substrato que foi 8,99% maior. Analisando pontualmente, em 50 % das fermentações o maior consumo de substrato para as fermentações contaminadas foi estatisticamente significativo. A variação do pH foi sutil quando significativa. Especificamente apenas duas fermentações apresentaram maior variação do pH na presença da bactéria (fermentação 1 e 4), entretanto na média geral das fermentações esta variação foi maior nas fermentações com a cepa pura. Em comparação, o efeito da contaminação foi mais atuante nas respostas fermentativas da cepa PE-2. Em 50 % das fermentações contaminadas, a produção de etanol foi menor, representando na totalidade das fermentações a concentração em média 8,57 % menor. O consumo de substrato e o pH observado nas fermentações contaminadas também foram menores, na razão global de 4,66 % para o consumo de substrato, e 5,69 % na variação do pH (redução).

Além das divergências pontuais das respostas, ambas as cepas apresentaram sutil diferencial na dinâmica da produção de etanol quando contaminadas. Para ambas as fermentações puras, a máxima concentração de etanol foi observada ao final da oitava fermentação, enquanto que as fermentações contaminadas apresentaram pico de produção de etanol na fermentação 6. A dinâmica no consumo de substrato e na variação do pH não foram distintos ao nível de comprometer ou evidenciar um tratamento em relação ao outro. Resumidamente, o consumo de substrato foi estatisticamente superior nas últimas fermentações para as fermentações puras, enquanto LB apresentou pico nas fermentações 6 e 8, e PB nas fermentações 4, 6 e 8. Em relação ao pH, mesmo apresentando variações tão

semelhantes, de maneira geral as fermentações inoculadas com PB e L apresentaram maior variação em relação ao pH inicial, ou seja, estes inóculos apresentaram maior acidez do meio ao final da maioria das fermentações. Coincidentemente estas cepas também apresentaram menor média de produção de etanol.

Assim como para a cepa LMQA SRC 143, a presença da contaminação por *L. fermentum* não representou diferenças na produção de etanol nem no consumo do substrato para as leveduras UFLA FW221 e PE-2 em diferentes conformações experimentais. Essas respostas foram obtidas em fermentação com menor concentração inicial de bactérias e menor concentração do substrato no mosto de fermentação (1). Se assemelhando mais às condições empregadas neste trabalho, Basso et al.,(21) demonstrou que esta bactéria produz concentração tóxica de ácido láctico que causa redução da viabilidade e da produção de etanol da cepa industrial CAT-1. Entre as justificativas, a concentração de ácidos a níveis tóxicos é o mais plausível para a redução da viabilidade, enquanto que o desvio energético para a síntese de compostos protetivos como manitol e glicerol se correlacione com a menor produção de etanol. Em contrapartida, Garcia et al. (2016) demonstra que moléculas *sensing* produzidos por bactéria láctica podem favorecer o metabolismo da levedura, melhorando o desempenho e sobrevivência. É sabido que esta melhora no desempenho celular da levedura é decorrente da ação do prion (GAR), e que algumas cepas podem não ser sensibilizadas (35). Outras moléculas, como álcoois aromáticos (high alcohol) produzidos por bactérias lácticas também podem modificar o comportamento fisiológico de cepas de leveduras de maneira distinta (15).

A menor produção geral de etanol apresentado pelas cepas PB e L pode ser influenciada pelo pH em média mais baixo observado nestas fermentações. Os ácidos produzidos pelo metabolismo são acumulados no meio na forma indissociada. Estes ácidos são capazes de difundir através da membrana celular afetando a homeostase celular. Quando ocorre a dissociação do íon H^+ no interior da célula, ocorre a acidificação do citoplasma com consequência para as funções vitais (4).

A viabilidade das células analisadas através da integridade do DNA e da permeabilidade da membrana plasmática revelou que a contaminação bacteriana também influenciou na resposta fisiológica das cepas. Considerando a reposta geral, ao final das oito fermentações a integridade do DNA da cepa PE-2 pura foi maior, e contraditoriamente para a cepa LMQA SRC 143 contaminada, a integridade do DNA foi maior. A viabilidade relatada através da permeabilidade da membrana não apresentou influência significativa para as leveduras na presença do contaminante. De acordo com a alta fluorescência de PI e a menor

fluorescência de AO observada na oitava fermentação pela levedura LMQA SRC 143 pura, a contaminação bacteriana influenciou positivamente na estabilização celular e consequentemente na viabilidade desta cepa. Esses constatações contradizem a expectativa da redução da viabilidade celular decorrente da presença de contaminantes da fermentação (4, 21).

A vitalidade avaliada pela atividade esterásica não foi afetada pela contaminação nas fermentações com a cepa LMQA SRC 143. Ao final da oitava fermentação é possível observar que a vitalidade na presença da bactéria é maior, e semelhante à vitalidade demonstrada pela cepa PE-2 pura. Em adição, LMQA SRC 143 na presença do *L. fermentum* apresentou maior acúmulo de glicogênio e menor de trealose. Para a cepa PE-2, não houve influência no acúmulo de trealose, porém a reserva de glicogênio foi menor quando contaminada, e a alta vitalidade apresentada inicialmente, caiu significativamente na oitava fermentação.

A exposição das células ao reciclo celular e a lavagem ácida representa um poderoso agente seletivo para às leveduras devido à exposição repetitiva aos agentes estressantes do processo fermentativo (5). As leveduras mais adaptadas são capazes de sobreviver com altas taxas de viabilidade perante a lavagem ácida, alterações osmóticas, ação tóxica do etanol e da contaminação bacteriana (22). Analisando os parâmetros fermentativos em função do reciclo de células com a lavagem ácida, ou seja, comparando todos os ciclos fermentativos é possível observar que as duas primeiras fermentações apresentaram menor produção de etanol e consumo de substrato que as demais fermentações. Esta variação foi observada para todos os tratamentos, revelando que ambas as leveduras usadas neste trabalho apresentam semelhante capacidade de desenvolvimento e metabolização perante o estresse inerente ao processo de fermentação etanólica. Essa resposta inferior dos parâmetros etanol e substrato podem ser atribuídos à exposição aos diversos estresses simultâneos.

O primeiro contato com o processo fermentativo (fermentação 1) pode ter contribuído para a estagnação celular observada na resposta inferior dos parâmetros fermentativos das fermentações 1 e 2. A parada do ciclo celular e a entrada na fase G0 (latência) pode ocorrer como resposta ao estresse. A interfase permite que a levedura acumule açúcares de reserva e angarie a expressão de genes relacionados à proteção oxidativa e estrutural da célula (7, 32). Esta resposta também pode ter relação com a maior concentração de glicogênio observado em T2 (após a quarta fermentação). Além disso, o aumento da vitalidade observado em T2 pode ser o reflexo do aumento na expressão de genes e consequentemente da atividade metabólica.

Entre os genes expressos em resposta ao estresse, estão aqueles relacionados à bomba de prótons para a regulação da homeostase e também aqueles atuantes na proteção oxidativa causada pelo desequilíbrio hidrogênio-iônico no interior da célula, como os genes SNO e SNZ responsáveis pela síntese de vitamina B1 e B6 (7).

Ainda analisando a resposta fermentativa perante o reciclo de células e a lavagem ácida, foi possível ressaltar que as cepas contaminadas apresentaram máxima produção de etanol na fermentação 6, que decresceu nas demais fermentações. Esta antecipação do pico de produção de etanol pode estar relacionada com a resposta ecológica para a manutenção da contaminação em níveis aceitáveis e que pode ter sido potencializada pela ação do ácido utilizado na lavagem ácida. O estímulo para a resposta celular da levedura (neste caso a maior produção de etanol) a fim de amenizar a influência negativa do contaminante no ambiente está intimamente relacionada ao aumento da concentração de ácidos e outros metabólitos bacterianos no meio fermentativo (15). A competição por recursos nutricionais e o desgaste celular referente ao constante estresse fermentativo não permite que o nível de etanol aumente e persista nas fermentações subsequentes. Esta situação pode ser observada pela redução da produção de etanol nas fermentações 7 e 8 para ambas as leveduras contaminadas.

Esse desgaste metabólico, fisiológico e estrutural da célula de levedura reflete na redução da biossíntese de macromoléculas, desnaturação de proteínas citoplasmáticas, redução da atividade de enzimas glicolíticas, alteração da composição e redução da integridade da membrana celular, além do aumento do estresse oxidativo (33, 34). O diferencial das cepas industriais é que mesmo sobre forte pressão seletiva elas ainda apresentam respostas satisfatórias quando submetidas ao estresse simultâneos e sequenciais (33).

O glicogênio é considerado a marca típica da rápida adaptação celular (35). Mediante ao estresse fermentativo na fase exponencial do crescimento ocorre o aumento da concentração intracelular destes compostos de reserva (35). Condizente com o aumento da produção de etanol com o final da fase exponencial das células utilizadas neste trabalho, a concentração de glicogênio é máxima em T2. A concentração do etanol pode influenciar decisivamente no acúmulo desta molécula de reserva. Dake et al., (34) revelou que em *Saccharomyces cerevisiae* NCIM-3300 a variação da concentração de etanol entre 2 a 8 % v/v estimula o acúmulo de glicogênio intracelular enquanto que a variação de 10 a 12 % v/v confere a depleção do glicogênio e outros carboidratos de reserva, resultando também na redução do volume celular. De acordo com Pereira et al. (35) a concentração de glicogênio

intracelular pode aumentar mesmo com o declínio da viabilidade celular causada pela debilitação da membrana celular. Para os dados de citometria existe maior relação entre o aumento da concentração de glicogênio com a redução da viabilidade constatada através da integridade do DNA. Considerando T2, os dados de fluorescência referente ao acúmulo de glicogênio são máximos, enquanto que para a fluorescência referente a permeabilidade da membrana celular não há grandes alterações. O próprio acúmulo de glicogênio pode influenciar na estabilização da membrana, justificando pouca variabilidade dos dados. O glicogênio insolúvel interage com regiões da membrana plasmática causando efeito protetor (36). Esse efeito é evidenciado pela maior concentração de α -glucanas na superfície celular de leveduras crescidas sob o efeito do etanol, visto que a glucana é um monômero constituinte glicogênio (34).

Os dados da concentração de trealose pela cepa LMQA SRC 143 pura contradiz o que revela a literatura. Em altas concentrações de etanol a concentração de trealose tende a reduzir devido ao comprometimento da estrutura de membrana celular (35). Por ser uma molécula pequena e altamente solúvel, danos na membrana celular podem causar a extravasão para o ambiente extracelular (5, 35). Contudo, esta cepa pura apresentou redução drástica da viabilidade, com destaque para a redução da integridade da membrana. Como a trealose pode ser acumulada com dinâmica semelhante ao glicogênio, acredita-se que os baixos valores observados em LB, P e PB em T1 esteja relacionado à utilização metabólica deste composto energético para o desenvolvimento celular. Em T3, a explicação pode estar relacionada à lavagem ácida. Durante a lavagem ácida é possível a ocorrência de síntese de etanol mesmo que o ambiente esteja destituído de açúcares. Esta síntese ocorre pela mobilização e utilização de trealose. Em cepas industriais, ao final do processo de lavagem ácida a concentração de glicogênio residual, apesar de baixa, ainda é adequado para garantir a viabilidade celular (29).

A queda da viabilidade em função do reciclo de células e da lavagem ácido analisadas em T1, T2 e T3 está intimamente relacionada com a ação do ácido e do etanol na homeostase celular. Ou seja, tanto as leveduras fermentadas puras ou na presença da bactéria, a variação contínua e repetitiva das características ambientais é um fator incisivo para a sobrevivência. O etanol é o agente mais atuante, pois age sobre a fluidez e permeabilidade da membrana celular afetando o sistema de transporte de compostos essenciais como aminoácidos e glicose. O acúmulo destes danos compromete diversas funções celulares conferindo redução da taxa metabólica, da viabilidade e da velocidade de fermentação (36). Além disso, o etanol potencializa a ação negativa dos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação (4).

Em suma, as divergências fermentativas entre as duas cepas de leveduras não foram significativas. Entretanto, pensando na possível aplicabilidade industrial da cepa LMQA SRC 143, até mesmo as sutis divergências podem conferir ganhos significativos para o setor produtivo. Assim como inferido por Basso et al.(22), mesmo que não significativas as diferenças na resposta fermentativa das leveduras representam grandes perdas ou ganhos na produção industrial. Comparando a resposta média total, a produção de etanol pela cepa LMQA SRC 143 pura foi 1,07 vezes maior do que para a PE-2, e 1,28 vezes maior na presença do contaminante. O substrato foi mais eficientemente consumido pela cepa PE-2, sendo 1,2 vezes maior quando pura, e 1,04 quando contaminada. Em relação à resposta fisiológica das leveduras puras, a cepa PE-2 é seguramente mais estável e robusta. Porém e contraditoriamente, em conjunto com o *Lactobacillus fermentum* CCT1668, a cepa LMQA SRC 143 se mostrou preparada para enfrentar o desgaste celular propiciado pela fermentação, podendo ser considerada uma cepa mais ajustada à processos altamente contaminados.

5. Conclusões

A agressividade química, física e biológica do processamento industrial de cana-de-açúcar para a produção de etanol combustível demanda leveduras robustas para a viabilização econômica do processo. Os dados deste trabalho ressaltam a capacidade fermentativa das cepas LMQA SRC 143 e PE-2 diante do reciclo de células adjunto à lavagem ácida, com maior equilíbrio e estabilidade das características fisiológicas de PE-2. A contaminação bacteriana pelo *L. fermentum* aditivou a resposta fermentativa da cepa LMQA SRC 143, além de melhorar a estabilidade fisiológica das células. Estas constatações destacam a importância da prospecção de leveduras em ambientes diferentes do ambiente da própria usina de etanol, e confere a possibilidade do estabelecimento de processos rentáveis por meio do equilíbrio ecológico entre leveduras e bactérias.

AGRADECIMENTOS

FERMENTEC S/A pela disponibilização da *Saccharomyces cerevisiae* cepa PE-2. Fundação “Andre Tosello” - Coleção de Culturas Tropical pelo fornecimento da cepa de *Lactobacillus fermentum* CCT1668. Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho e ao bacharel em química Lucas André Zeoly pela disponibilização e acompanhamento das análises no cromatógrafo gasoso do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos – IQ – Unicamp.

Referências

1. **Ramos CL, Duarte WF, Freire AL, Dias DR, Eleutherio ECA, Schwan RF, Dias, Disney Ribeiro, Eleutherio ECA, Schwan RF.** 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol* **44**:935–944.
2. **Borges EP, Lopes ML, Bernardino C, Godoy A, Ré FE, Cherubin RA, Paulillo SCL, Amorim H V.** 2015. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar Ind (Zuckerindustrie)* **4**:209–216.
3. **Lopes ML, Paulillo SC de L, Godoy A, Cherubin RA, Lorenzi MS, Giometti FHC, Bernardino CD, Amorim Neto HB de, Amorim HV de.** 2016. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian J Microbiol* **47**:64–76.
4. **Brexó RP, Sant’Ana AS.** 2017. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renew Sustain Energy Rev* **73**:423–434.
5. **Pereira FB, Gomes DG, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L.** 2012. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Biotechnol Lett* **34**:45–53.
6. **Wheals AE, Basso LC, Alves DM, Amorim H V.** 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol* **17**:482–7.
7. **Carvalho-Netto O V, Carazzolle MF, Mofatto LS, Teixeira PJ, Noronha MF, Calderón L AL, Mieczkowski PA, Argueso JL, Pereira GA.** 2015. *Saccharomyces*

- cerevisiae transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microb Cell Fact* **14**:13.
8. **Amorim H V., Leão RM.** 2005. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*, 1st ed. Fermentec, Piracicaba.
 9. **Paulillo SC de L, Yokoya F, Basso LC.** 2003. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. *Brazilian J Microbiol* **34**:249–254.
 10. **Amorim H V., Lopes ML, De Castro Oliveira JV, Buckeridge MS, Goldman GH.** 2011. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**:1267–1275.
 11. **Costa OYA, Souto BM, Tupinambá DD, Bergmann JC, Kyaw CM, Kruger RH, Barreto CC, Quirino BF.** 2015. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**:73–84.
 12. **Facciotti MCR.** 2001. Fermentação Contínua, p. 223–246. *In* Schmidell, W, Lima, UA, Aquarone, E, Borzani, W (eds.), *Biotecnologia Industrial II: Engenharia Bioquímica*. Edgar Blücher, São Paulo.
 13. **Beckner M, Ivey ML, Phister TG.** 2011. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Lett Appl Microbiol* **53**:387–394.
 14. **Skinner KA, Leathers TD.** 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* **31**:401–408.
 15. **Brexó RP, Sant’Ana AS.** 2017. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Crit Rev Biotechnol* Submitted-under review.
 16. **Gallo CR, CANHOS VP.** 1991. Efeitos do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana da fermentação alcoólica. *Stab Açúcar, Álcool e Subprodutos* **29**:35–37.
 17. **Lushia W, Heist P.** 2005. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. *Ethanol Prod Mag* **11**:80–81.
 18. **Gallo CR.** 1989. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. State University of Campinas - UNICAMP.
 19. **Lucena BTL, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira APB, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi A, Thompson FL, de Moraes MA.** 2010. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol* **10**:298.
 20. **Narendranath NV V., Hynes SHH, Thomas KCC, Ingledew WMM.** 1997. Effects

- of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Appl Environ Microbiol* **63**:4158–4163.
21. **Basso TO, Gomes FS, Lopes ML, De Amorim HV, Eggleston G, Basso LC.** 2014. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* **105**:169–177.
 22. **Basso LC, de Amorim H V., de Oliveira AJ, Lopes ML.** 2008. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res* **8**:1155–1163.
 23. **Chan LL, Kury A, Wilkinson A, Berkes C, Pirani A.** 2012. Novel image cytometric method for detection of physiological and metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **39**:1615–1623.
 24. **Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C.** 2010. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochem Eng J* **48**:385–407.
 25. **Brexó RP, Sant’ana A de S.** 2017. Yeasts in wild ferment for cachaça production and in bagaço de malte cervejeiro: biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. *J Ind Microbiol Biotechnol* Submitted-under review.
 26. **Brexó RP, Andrietta M da GS, Faria GCN, Sant’Ana AS.** 2017. Environment of artisanal cachaça distillery and bagaço de malte cervejeiro as sources of yeasts with potential for bioethanol production. *N Biotechnol* Submitted-under review.
 27. **Alvarenga VO.** 2008. Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana de açúcar. Universidade Estadual de Campinas.
 28. **Silva RDS, Oliveira PA de, Silva ÉRS da, Cardoso CAL, Ernandes JR, Batistote M.** 2015. Effect of acid treatment in alcoholic fermentation. *Ciência e Nat* **37**:52–56.
 29. **Basso L, Basso T, Rocha S.** 2011. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation, p. 85–100. *In* *Biofuel production - Recent Developments and Prospects*.
 30. **Francisco de AS e S, Carlos AV de A.** 2016. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African J Agric Res* **11**:3733–3740.
 31. **Tosin C, Andrietta SR, Andrietta M da GS.** 2015. Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *J Inst Brew* **121**:343–348.
 32. **Xavier LM.** 2015. Análise do perfil de expressão gênica diferencial de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* laboratoriais e selvagens em diferentes estresses por ferramentas de bioinformática. Federal University of Espirito Santo.

33. **Wang P-M, Zheng D-Q, Chi X-Q, Li O, Qian C-D, Liu T-Z, Zhang X-Y, Du F-G, Sun P-Y, Qu A-M, Wu X-C.** 2014. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Bioresour Technol* **152**:371–376.
34. **Dake MS, Jadhv JP, Patil NB.** 2010. Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations. *J Ind Microbiol Biotechnol* **37**:701–706.
35. **Pereira FB, Guimarães PMR, Teixeira JA, Domingues L.** 2011. Robust industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity bio-ethanol fermentations. *J Biosci Bioeng* **112**:130–136.
36. **Bleoanca I, Silva ARC, Pimentel C, Rodrigues-Pousada C, Menezes R de A.** 2013. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *J Biosci Bioeng* **116**:697–705.
37. **Garcia DM, Dietrich D, Clardy J, Jarosz DF.** A common bacterial metabolite elicits prion-based bypass of glucose repression. *Elife* 2016. doi: 10.7554/eLife.17978

DISCUSSÃO GERAL

O conhecimento da diversidade de leveduras presentes na fermentação espontânea de cachaça artesanal e no bagaço de malte residual da indústria de cerveja com a finalidade de bioprospectar leveduras convencionais (*S. cerevisiae*) e não convencionais é pioneiro e inovador. O princípio de que a riqueza microbiológica propiciada pela fermentação espontânea aumentaria a possibilidade do acesso a cepas mais adaptadas e robustas, e que de maneira divergente a singularidade do bagaço de malte ofertaria cepas diferenciadas norteou este trabalho. Diante dos resultados foi possível confirmar esta premissa pois a abundância de *S. cerevisiae* foi maior dentre as amostras da fermentação da cachaça, enquanto que dentre as leveduras provenientes da amostra de bagaço de malte as não-*Saccharomyces* foram maioria. Diferentemente de vários trabalhos que dão preferência para a investigação de espécies determinadas, mesmo recuperando e identificando grande diversidade de leveduras, neste trabalho não houve discriminação por espécie, portanto todas as 134 cepas isoladas foram analisadas, ressaltando a importância da investigação científica para espécies pouco relatadas (PATARO et al., 2000; FREITAS SCHWAN et al., 2001; GOMES et al., 2007; NOVA et al., 2009; ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016; PORTUGAL et al., 2016).

A característica fenotípica mais relevante observada pelas cepas não-convencionais foi a expressão de enzimas extracelulares, destacado pela espécie *Wickerhamomyces anomalus*. Esses dados ressaltam a possibilidade da diversificação da oferta de enzimas, uma vez que o mercado é dominado pela utilização de fungos filamentosos e bactérias principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Bacillus* (JOHNSON, 2013). O destaque para *S. cerevisiae* foram os atributos que favorece a robustez celular e a domínio no ambiente, como a síntese de ascósporos e a melhor performance na fermentação etanólica. Esta robustez pode estar relacionada com a grande variação no número de genes observados nesta espécie, que também favorece a expressão de outros atributos, como a síntese de proteínas *killer*, álcoois superiores e outras biomoléculas (CECCATO-ANTONINI; TOSTA; SILVA, 2004; JOHNSON, 2013; LIMA et al., 2013, BOYNTON; GREIG, 2014).

Para a produção de etanol combustível é inquestionável a supremacia das *S. cerevisiae*. Em todos os experimentos com fermentação esta espécie predominou, contudo, dentre os critérios de rendimento em etanol, rendimento em biomassa e produtividade, a cepa LMQA BSG 7 da espécie *Torulaspora delbrueckii* apresentou resultados tão relevantes quanto os

resultados da a *S. cerevisiae* LMQA SRN 65 e da cepa de referência PE-2. Atualmente o potencial brasileiro de produção de bioetanol é de aproximadamente 27,5 bilhões de litros por safra (CHAGAS et al., 2016). A seleção de leveduras é uma importante ferramenta para a otimização do processo. O acesso à leveduras que apresentem resultados como LMQA BSG 7 e a LMQA SRN 65 tem grande relevância no aumento da produtividade e contribuição para a redução de custos na produção de bioetanol (BASSO et al., 2008; BORGES et al., 2015). Todavia, existem outros desafios a serem enfrentados quanto à seleção de leveduras para a produção de etanol. Apesar dos mais de 40 anos de avanços no processo produtivo do bioetanol no Brasil, existem algumas lacunas que dificultam a implementação de leveduras selvagens. O reciclo de células atrelado à lavagem ácida e a frequente contaminação bacteriana do sistema representa grandes obstáculos a serem superados pelas cepas selecionadas (BASSO et al., 2008; AMORIM et al., 2011; CARVALHO-NETTO et al., 2015). Como mostrado neste trabalho, a contaminação bacteriana atua negativamente para atuação na fermentação, até mesmo para a cepa industrialmente utilizada PE-2 reconhecida pelo vigor e resistência. Paradoxalmente, para a levedura LMQA SRC 143 a presença do *L. fermentum* nas condições de reciclo de células e lavagem ácida representou uma melhor atuação fermentativa e um perceptível equilíbrio fisiológico. Estas descobertas, apesar de admiráveis, são cabíveis de investigações mais aprofundadas. Como apresentado no capítulo 1, são diversas as bactérias lácticas que contaminam os sistemas fermentativos, podendo leveduras selvagens contribuir para a modulação da capacidade fermentativa. O preparo do mosto de fermentação com o caldo-de-cana puro, ou em diferentes proporções com o xarope de cana-de-açúcar também pode acarretar alterações. Resumidamente, as condições laboratoriais são essenciais para o reconhecimento e desbravamento para a bioprospecção de leveduras, entretanto, somente com a comprovação a nível industrial pode assumir que uma resposta fiel e segura. Como descrito por Basso et al., (2008) este processo pode perdurar por mais de décadas, porém o resultado é compensador e estimulante.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir das análises das amostras provenientes da fermentação espontânea da produção artesanal de cachaça e do resíduo de malte da produção de cerveja foram isoladas 134 cepas identificadas como 10 espécies diferentes de 6 gêneros distintos. Em abundância, as leveduras não-*Saccharomyces* (não-convencionais) representaram 2/3 do total. Neste trabalho foi destacado a capacidade de formação de ascósporos por representantes da espécie *S. cerevisiae*. Entretanto, para a produção de enzimas, os representantes da espécies *Wickerhamomyces anomalus* apresentaram maior relevância. O antifúngico natamicina mostrou maior ação contra as cepas isoladas, enquanto que a actidiona apresentou seletividade, podendo ser usado para a triagem de leveduras potencialmente patogênicas, como a *Candida parapsilosis*. De acordo com a morfologia celular que favorece a floculação celular, 15 % das cepas isoladas não são aptas para a fermentação industrial de bioetanol. Representantes da espécie *S. cerevisiae* foram hegemonicamente a mais relevantes na produção de etanol. Em meio sintético e com condições de maior controle as cepas *S. cerevisiae* LMQA SNR 65 e *Torulaspora delbrueckii* LMQA BSG 7 demonstraram alto potencial para a aplicação industrial, apresentando alto rendimento em etanol, alto rendimento em biomassa e alta produtividade. Os dados da cariotipagem, embora importante ferramenta para a distinção das cepas de levedura, não apresentou correlação com a capacidade fermentativa das cepas. As fermentações consecutivas intercaladas com a lavagem ácida demonstraram que a cepa *S. cerevisiae* LMQA SRC 143 apresentou relevante capacidade fermentativa, entretanto, a cepa PE-2 apresentou maior estabilidade fisiológica. Em contradição com os dados de literatura, na presença do contaminante *Lactobacillus fermentum*, a cepa LMQA SRC 143 apresentou performance mais promissora, e maior estabilidade fisiológica em comparação com as células fermentadas na ausência do contaminante. Estes resultados destacam a importância do isolamento e seleção de leveduras em ambientes diversificados, ressaltando o potencial de aplicação das cepas não-*Saccharomyces* em processos biotecnológicos ou para a otimização de processos já estabelecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Growth rates of Dekkera/Brettanomyces yeasts hinder their ability to compete with Saccharomyces cerevisiae in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, n. 6, p. 641–647, 2005.

ABREU-CAVALHEIRO, A.; MONTEIRO, G. Solving ethanol production problems with genetically modified yeast strains - review. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 665–671, 2013.

AGGARWAL, C.; FEDERLE, M. J. Peptide Pheromones and Their Protein Receptors: Cellular Signaling in Gram-Positive Bacteria. In: *Molecular Life Sciences*. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 1–14.

AGGELOPOULOS, T.; BEKATOROU, A.; PANDEY, A.; KANELAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Discarded Oranges and Brewer's Spent Grains as Promoting Ingredients for Microbial Growth by Submerged and Solid State Fermentation of Agro-industrial Waste Mixtures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 170, n. 8, p. 1885–1895, 19 ago. 2013.

AHMED, I.; ZIA, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AKRAM, Z.; NAVEED, M. T.; NOWROUZI, A. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 9, n. 2, p. 148–154, abr. 2016.

ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 5, p. 2035–2046, mar. 2016.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. *Medical mycology*, v. 50, n. 4, p. 337–45, 2012.

ALCARDE, A. R. Cachaça. ciência, tecnologia e arte. [s.l.] Blucher, 2014.

ALCARDE, V. E. Avaliação de parâmetros que afetam a floculação de leveduras e bactérias isoladas de processos industriais de fermentação alcoólica. Tese. Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2001.

- ALEM, M. A. S.; OTEEF, M. D. Y.; FLOWERS, T. H.; DOUGLAS, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 10, p. 1770–1779, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- ALVARENGA, V. O. Modelagem preditiva do crescimento/morte de *Saccharomyces cerevisiae* em co-cultura com *Lactobacillus fermentum* em mosto de caldo de cana-de-açúcar. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2008.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. 1st. ed. Piracicaba: Fermentec, 2005.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- ANDRETTE, R. O.; ARRUDA-NETO, J. D. T.; BASSO, T. O.; BASSO, L. C.; CAVALCANTE-SILVA, E.; BITTENCOURT-OLIVEIRA, M. C.; GENOFRE, G. C. Use of radiation in strains of *Saccharomyces cerevisiae*: A new technique for industrial applications. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, v. 4, n. 3, p. 346–351, 2013.
- ANDRIETTA, G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. *Construindo a história dos Produtos Naturais*, p. 1–16, 2006.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proalcool. *International Sugar Journal*, v. 109, p. 195–200, 2007.
- ANTUNES, L. C. M.; FERREIRA, R. B. R. Intercellular communication in bacteria. *Critical reviews in microbiology*, v. 35, n. 2, p. 69–80, 2009.
- APACE. Intensive field trial of ethanol/petrol blend in vehicles. Executive ed. [s.l.] Apace Research Ltd, 1998.
- ASLANKOOHI, E.; ZHU, B.; REZAEI, M. N.; VOORDECKERS, K.; DE MAEYER, D.; MARCHAL, K.; DORNEZ, E.; COURTIN, C. M.; VERSTREPEN, K. J. Dynamics of the *Saccharomyces cerevisiae* Transcriptome during Bread Dough Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 23, p. 7325–7333, 1 dez. 2013.

- BALCIUNAS, E. M.; CASTILLO MARTINEZ, F. A.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. de M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, v. 32, n. 1, p. 134–142, jul. 2013.
- BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; CABAÑAS, A.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 129–132, p. 496–508, 2006.
- BARBOSA, H. S.; SILVEIRA, E. de A.; MIRANDA, M.; ERNANDES, J. R. Efficient very-high-gravity fermentation of sugarcane molasses by industrial yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 2, p. 329–333, jun. 2016.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. n. 5, p. 1295, 11 mar. 1990.
- BASÍLIO, A. C. M.; DE ARAÚJO, P. R. L.; DE MORAIS, J. O. F.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, M. A.; SIMÕES, D. A. Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Current Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 322–326, 2008.
- BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, n. 6, p. 582–587, 1999.
- BASSLER, B. L. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, v. 109, n. 4, p. 421–424, 2002.
- BASSLER, B. L.; LOSICK, R. Bacterially Speaking. *Cell*, v. 125, n. 2, p. 237–246, abr. 2006.
- BASSLER, B. L.; MILLER, M. B. Quorum Sensing. In: *The Prokaryotes*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 495–509.
- BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. In: *Biofuel production - Recent Developments and Prospects*. [s.l: s.n.]1530p. 85–100.
- BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, nov. 2008.

BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, v. 86, p. 112–120, ago. 2016.

BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; DE AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 105, n. 1, p. 169–177, 2014.

BAYROCK, D.; INGLEDEW, W. M. Changes in steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminant to a continuous culture ethanol fermentation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 39–45, 2001.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: Nutrient depletion and/or acid toxicity? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 362–368, 2004.

BECKNER, M.; IVEY, M. L.; PHISTER, T. G. Microbial contamination of fuel ethanol fermentations. *Letters in Applied Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 387–394, 2011.

BELDA, I.; CONCHILLO, L. B.; RUIZ, J.; NAVASCUÉS, E.; MARQUINA, D.; SANTOS, A. Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, v. 223, p. 1–8, abr. 2016.

BEVAN, D.; BOND, J. Microorganism in field and mill - a preliminary survey. In: *Conference of the Queensland society of sugar cane technologists, Brisbane. Anais... Brisbane: 1971.*

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 103, n. 1, p. 117–122, 2009.

BLEOANCA, I.; SILVA, A. R. C.; PIMENTEL, C.; RODRIGUES-POUSADA, C.; MENEZES, R. de A. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 116, n. 6, p. 697–705, dez. 2013.

BOCCHINI MARTINS, D. A.; DO PRADO, H. F. A.; RIBEIRO LEITE, R. S.; FERREIRA, H.; SOUZA MORETTI, M. M. de; DA, R.; GOMES, E. Agroindustrial Wastes as Substrates

for Microbial Enzymes Production and Source of Sugar for Bioethanol Production. In: Integrated Waste Management - Volume II. [s.l.] In Tech, 2011.

BON E. P. S. ET AL. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. [s.l.] Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ:FCT [Portugual], 2008.

BONY, M.; BARRE, P.; BLONDIN, B. Distribution of the flocculation protein flop, at the cell surface during yeast growth: The availability of flop determines the flocculation level. *Yeast*, v. 14, n. 1, p. 25–35, 1998.

BORGES, E. P.; LOPES, M. L.; BERNARDINO, C.; GODOY, A.; RÉ, F. E.; CHERUBIN, R. A.; PAULILLO, S. C. L.; AMORIM, H. V. The benefits of applied research: 37 years of discoveries, adaptations and solutions. *Sugar industry (Zuckerindustrie)*., v. 4, n. 140, p. 209–216, 2015.

BORGES, P. C. S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos. [s.l.] Blucher, 2001.

BOYNTON, P. J.; GREIG, D. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast*, v. 31, n. 12, p. 449-462, dez. 2014.

BRANCO, P.; FRANCISCO, D.; CHAMBON, C.; HÉBRAUD, M.; ARNEBORG, N.; ALMEIDA, M. G.; CALDEIRA, J.; ALBERGARIA, H. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 2, p. 843–853, 29 jan. 2014.

BRANCO, P.; VIANA, T.; ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells. *International Journal of Food Microbiology*, v. 205, p. 112–118, jul. 2015.

BREXÓ, R. P.; ANDRIETTA, M. da G. S.; FARIA, G. C. N.; SANT'ANA, A. S. Environment of artisanal cachaça distillery and brewer's spent grain as sources of yeasts with potential for bioethanol production. *New Biotechnology*, p. Submitted-under review, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. de S. Yeasts in wild ferment for cachaça production and in brewer's spent grain: biodiversity and phenotypic characterization for biotechnological purposes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, p. Submitted-under review, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Critical reviews in biotechnology*. In press, 2017.

BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 73, p. 423–434, jun. 2017.

BUCHANAN, B. W.; LLOYD, M. E.; ENGLE, S. M.; RUBENSTEIN, E. M. Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Visualized Experiments*, n. 110, 18 abr. 2016.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, n. 6, p. 1020–1025, dez. 2002.

CABRINI, K. T.; GALLO, C. R. Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do estado de São Paulo, Brasil. *Scientia Agricola*, v. 56, n. 1, p. 207–216, 1999.

CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, v. 311, n. 5764, p. 1113–1116, 2006.

CAMOLEZ M. A., M. M. J. R. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. *Stab - Açúcar, Alcool e Subprodutos*, v. 23, n. 5, p. 6–9, 2005.

CAMPANA, F. B. Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes. Tese. ESALQ – Universidade de São Paulo - USP, 2012.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap

fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 6, p. 1809–1824, 2007.

CARERE, C. R.; SPARLING, R.; CICEK, N.; LEVIN, D. B. Third Generation Biofuels via Direct Cellulose Fermentation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, n. 7, p. 1342–1360, jul. 2008.

CARVALHO-NETTO, O. V.; CARAZZOLLE, M. F.; MOFATTO, L. S.; TEIXEIRA, P. J.; NORONHA, M. F.; CALDERÓN, L. AL; MIECZKOWSKI, P. A.; ARGUESO, J. L.; PEREIRA, G. A. *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional reprogramming due to bacterial contamination during industrial scale bioethanol production. *Microbial Cell Factories*, v. 14, n. 1, p. 13, 30 dez. 2015.

CARVALHO, G. G.; MONTEIRO, R. A. B. A influência do teor de acidez e da contaminação bacteriana do mosto no rendimento fermentativo industrial para produção de etanol. *FAZU em Revista*, v. 8, p. 47–54, 2011.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: W. SCHMIDELL ET AL. (Ed.). *Biotecnologia Industrial II: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 193–204.

CAVALHEIRO, A. de A. Análise dos mutantes de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para melhoria na resistência e produção de etanol. Dissertação, Universidade de São Paulo - USP, 2013.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; SUDBERY, P. E. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, n. 3, p. 173–181, set. 2004.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; TOSTA, C. D.; SILVA, A. C. da. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n. 1, p. 13–23, mar. 2004.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. Volume 3 ed. [s.l.] Fundação Cargill, 2003.

CHAGAS, M. F.; BORDONAL, R. O.; CAVALETT, O.; CARVALHO, J. L. N.; BONOMI, A.; LA SCALA, N. Environmental and economic impacts of different sugarcane production systems in the ethanol biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 10, n. 1, p. 89–106, jan. 2016.

CHAN, L. L.; KURY, A.; WILKINSON, A.; BERKES, C.; PIRANI, A. Novel image cytometric method for detection of physiological and metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 39, n. 11, p. 1615–1623, 5 nov. 2012.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 1, p. 1–6, jan. 1997.

CHEN, H.; FINK, G. R. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & development*, v. 20, n. 9, p. 1150–1161, maio 2006.

COSTA, O. Y. A.; SOUTO, B. M.; TUPINAMBÁ, D. D.; BERGMANN, J. C.; KYAW, C. M.; KRUGER, R. H.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. Microbial diversity in sugarcane ethanol production in a Brazilian distillery using a culture-independent method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 73–84, 18 jan. 2015.

COSTA, V. M. Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos d(-) e l(+) do ácido láctico. Tese, ESALQ – Universidade de São Paulo - USP, 2006.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, v. 284, n. 5418, p. 1318–22, maio 1999.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 95–105, dez. 2012.

COTTIER, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A. Communication in fungi. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, 2012.

DA CONCEIÇÃO, L. E. F. R.; SARAIVA, M. A. F.; DINIZ, R. H. S.; OLIVEIRA, J.; BARBOSA, G. D.; ALVAREZ, F.; DA MATA CORREA, L. F.; MEZADRI, H.; COUTRIM, M. X.; AFONSO, R. J. de C. F.; LUCAS, C.; CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. Biotechnological potential of yeast isolates from cachaça: the Brazilian spirit. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 42, n. 2, p. 237–246, 25 fev. 2015.

DA SILVA, N.; TANIWAKI, M. H.; JUNQUEIRA, V. C.; SILVEIRA, N.; DO NASCIMENTO, M. D. S.; GOMES, R. A. R. Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual. London, UK: CRC Press, 2012.

DAKE, M. S.; JADHV, J. P.; PATIL, N. B. Variations of two pools of glycogen and carbohydrate in *Saccharomyces cerevisiae* grown with various ethanol concentrations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, n. 7, p. 701–706, 7 jul. 2010.

DASHKO, S.; ZHOU, N.; COMPAGNO, C.; PIŠKUR, J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, v. 14, n. 6, p. 826–832, set. 2014.

DE BARROS, M. M.; SZKLO, A. Petroleum refining flexibility and cost to address the risk of ethanol supply disruptions: The case of Brazil. *Renewable Energy*, v. 77, p. 20–31, 2015.

DE DEKEN, R. H. The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 149–156, 1 ago. 1966.

DE OLIVA-NETO, P.; DORTA, C.; FLAVIA, A.; CARVALHO, A.; GOMES DE LIMA, V. M.; FERNANDES, D.; SILVA, D.; AZEVEDO, F.; GOMES, V.; FERNANDES, D. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. *Formatex*, p. 371–379, 2013.

DE SOUZA LIBERAL, A. T.; BASÍLIO, A. C. M.; DO MONTE RESENDE, A.; BRASILEIRO, B. T. V.; DA SILVA-FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS, M. A. 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.

DE SOUZA LIBERAL, A. T.; DA SILVA FILHO, E. A.; DE MORAIS, J. O. F.; SIMOES, D. A.; DE MORAIS, M. A. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 19–23, jan. 2005.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

DEMIRBAS, A.; FATIH DEMIRBAS, M. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, n. 1, p. 163–170, 2011.

DEMIRBAS, M. F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. *Applied Energy*, v. 86, n. SUPPL. 1, p. S151–S161, 2009.

DESONGHE, G. *Traité complet de la fabrication de l'alcool et des levures*. Lile, v. 2, p. 554–570, 1889.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; CALASSO, M.; GOBBETTI, M. Proteomics of the bacterial cross-talk by quorum sensing. *Journal of Proteomics*, v. 74, n. 1, p. 19–34, 2011.

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; CALASSO, M.; VINCENTINI, O.; VERNOCCHI, P.; NDAGIJIMANA, M.; DE VINCENZI, M.; DESSÌ, M. R.; GUERZONI, M. E.; GOBBETTI, M. Quorum sensing in sourdough *Lactobacillus plantarum* DC400: Induction of plantaricin A (PlnA) under co-cultivation with other lactic acid bacteria and effect of PlnA on bacterial and Caco-2 cells. *PROTEOMICS*, v. 10, n. 11, p. 2175–2190, mar. 2010.

DIAS, M. O. D. S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V.; OLIVEIRA DE SOUZA DIAS, M.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; VAZ ROSSELL, C. E.; BONOMI, A.; LIMA, M. R.; LEAL, V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. *Environmental Development*, p. 1–17, 2015.

DIAS, M. O. de S. Desenvolvimento e otimização de processos de produção de etanol de primeira e segunda geração e eletricidade a partir da cana-de-açúcar. Tese, Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, 2011.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, v. 103, n. 1, p. 152–161, 2012a.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. *Energy*, v. 43, n. 1, p. 246–252, 2012b.

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L. A.; QUIRÓS, C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 3, p. 385–407, fev. 2010.

DICKINSON, J. R. Filament formation in *Saccharomyces cerevisiae* — a review. *Folia Microbiologica*, v. 53, n. 1, p. 3–14, jan. 2008.

DIGGLE, S. P.; MATTHIJS, S.; WRIGHT, V. J.; FLETCHER, M. P.; CHHABRA, S. R.; LAMONT, I. L.; KONG, X.; HIDER, R. C.; CORNELIS, P.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-Quinolone Signal Molecules HHQ and PQS Play Multifunctional Roles in Quorum Sensing and Iron Entrapment. *Chemistry & Biology*, v. 14, n. 1, p. 87–96, jan. 2007.

DONG, S.-J.; LIN, X.-H.; LI, H. Regulation of *Lactobacillus plantarum* contamination on the carbohydrate and energy related metabolisms of *Saccharomyces cerevisiae* during bioethanol fermentation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 68, p. 33–41, nov. 2015.

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

DRAGONE, G.; FERNANDES, B.; VICENTE, A.; TEIXEIRA, J. Third generation biofuels from microalgae. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. [s.l.] Formatex Research Center, 2010. p. 1355–1366.

DU, Y.; LI, T.; WAN, Y.; LONG, Q.; LIAO, P. Signal Molecule-Dependent Quorum-Sensing and Quorum-Quenching Enzymes in Bacteria. *Critical Reviews TM in Eukaryotic Gene Expression*, v. 24, n. 2, p. 117–132, 2014.

DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms Associated with Sugarcane Plants and Juices. *Applied Microbiology*, v. 12, n. 2, p. 173–177, 1964.

EDDY, A. A. Flocculation characteristics of yeast. I. Comparative survey of various strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Institute Brew*, v. 6, p. 307–312, 1955a.

EDDY, A. A. Flocculation characteristics of yeasts: iii. General role of flocculating agents and special characteristics of a yeast flocculated by alcohol. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 61, n. 4, p. 318–320, jul. 1955b.

EIJSINK, V. G. H.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HÅVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1–4, p. 639–54, ago. 2002.

EVEN-TOV, E.; OMER BENDORI, S.; VALASTYAN, J.; KE, X.; POLLAK, S.; BAREIA, T.; BEN-ZION, I.; BASSLER, B. L.; ELDAR, A. Social Evolution Selects for Redundancy in Bacterial Quorum Sensing *PLoS Biology*, 2016. .

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). *Biotecnologia Industrial II: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 223–246.

FETZNER, S. Quorum quenching enzymes. *Journal of Biotechnology*, v. 201, p. 2–14, maio 2015.

FIGUEIREDO, C. M. Análise molecular da floculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina- UFSC, 2008.

FILHO, E. A. da S.; DE MELO, H. F.; ANTUNES, D. F.; SANTOS, S. K. B. dos; RESENDE, A. do M.; SIMÕES, D. A.; DE MORAIS JR, M. A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 32, n. 10, p. 481–486, out. 2005a.

FLAVIER, A. B.; GANOVA-RAEVA, L. M.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Hierarchical autoinduction in *Ralstonia solanacearum*: control of acyl-homoserine lactone production by a novel autoregulatory system responsive to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Journal of bacteriology*, v. 179, n. 22, p. 7089–97, nov. 1997.

FLEET, G. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, n. 1–2, p. 11–22, set. 2003.

FLEET, G. H. The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. In: *Wine microbiology and biotechnology*. Switzerland: Academic Publishers, 1993. p. 1–25.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 979–995, nov. 2008.

FOWELL, R. R. The identification of wild yeast colonies on lysine agar. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 28, n. 3, p. 373–383, 1965.

FRANCISCO, de A. S. e S.; CARLOS, A. V. de A. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, v. 11, n. 39, p. 3733–3740, 29 set. 2016.

FREITAS, L. C.; KANEKO, S. Ethanol demand under the flex-fuel technology regime in Brazil. *Energy Economics*, v. 33, n. 6, p. 1146–1154, 2011.

FREITAS SCHWAN, R.; T. MENDONÇA, A.; DA SILVA JR., J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 79, n. 1, p. 89–96, 2001.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology*, v. 176, n. 2, p. 269–75, jan. 1994.

FURLAN, R. M. C. Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras. Dissertação, ESALQ – Universidade de São Paulo - USP, 2012.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1989. Tese, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 1989.

GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Efeitos do tratamento ácido no fermento sobre a microbiota bacteriana da fermentação alcoólica. *Stab. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 29, p. 35–37, 1991.

GARCÍA, A. E.; CARMONA, R. J.; LIENQUEO, M. E.; SALAZAR, O. The current status of liquid biofuels in Chile. *Energy*, v. 36, n. 4, p. 2077–2084, 2011.

GARCÍA, M.; ESTEVE-ZARZOSO, B.; ARROYO, T. Non-Saccharomyces Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production. In: LOIRA, A. M. AND I. (Ed.). *Grape and Wine Biotechnology*. Open acces ed. [s.l.] InTech, 2016. p. 249–271.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. [s.l.] Nobel, 2009.

GHOBIADIAN, B. Liquid biofuels potential and outlook in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 7, p. 4379–4384, 2012.

GHOSH, S. K.; SANTRA, T.; CHAKRAVARTY, A. Study of Yeast Flora of Fruits and Their in Vitro Screening for Antagonistic Property Against *Penicillium Digitatum*. *International Journal of Scientific Research*, v. 4, n. 7, p. online, 2016.

GILLILAND, R. B. The flocculation characteristics of brewing yeasts during fermentation. In: *Proceedings of the European Brewery Convention, Anais...*1951.

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes : Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *International sugar journal*, v. 110, n. 1311, p. 175–181, 2008.

GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; MARINI, M. M.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A. Use of selected indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for the production of the traditional cachaça in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 6, p. 2438–2447, 17 jul. 2007.

GORI, K.; KNUDSEN, P. B.; NIELSEN, K. F.; ARNEBORG, N.; JESPERSEN, L. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, v. 11, n. 8, p. 643–652, 2011.

GUERRA, J. B.; ARAUJO, R. A. C.; PATARO, C.; FRANCO, G. R.; MOREIRA, E. S. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Letters in Applied Microbiology*, v. 33, n. 2, p. 106–111, 4 ago. 2001.

GUICHARD, P. *Traite de distillerie. microbiologie du distillateur*. Technologi ed. [s.l.] J.B. bailliere et fils - Encyclopedie industrielle, 1896.

HAN, S.-M.; HYUN, S.-H.; LEE, H. B.; LEE, H. W.; KIM, H.-K.; LEE, J.-S. Isolation and Identification of Yeasts from Wild Flowers Collected around Jangseong Lake in Jeollanam-do, Republic of Korea, and Characterization of the Unrecorded Yeast *Bullera coprosmaensis*. *Mycobiology*, v. 43, n. 3, p. 266, 2015.

HARRIS, P. V.; XU, F.; KREEL, N. E.; KANG, C.; FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 19, p. 162–170, abr. 2014.

HARUN, R.; YIP, J. W. S.; THIRUVENKADAM, S.; GHANI, W. A. W. A. K.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M. K. Algal biomass conversion to bioethanol-a step-by-step assessment. *Biotechnology Journal*, v. 9, n. 1, p. 73–86, 2014.

HASSUANI, S.; J.; LEAL, M. R. L. V.; MACEDO, I. Biomass power generation. sugar cane bagasse and trash. 1st. ed. Piracicaba: PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento. CTC - Centro de Tecnologia Canavieira, 2005.

HAZELWOOD, L. A.; DARAN, J.-M.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 8, p. 2259–2266, abr. 2008.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, v. 14, n. 11, p. 648–656, 2004.

HENSE, B. A.; KUTTLER, C.; MÜLLER, J.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; KREFT, J.-U. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 230–239, mar. 2007.

HERSKOWITZ, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological reviews*, v. 52, n. 4, p. 536–553, 1988.

HILL, A.; (ED). *Brewing microbiology: managing microbes, ensuring quality and valorising waste*. 1st. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2015.

HOGAN, D. A. Quorum Sensing: Alcohols in a Social Situation. *Current Biology*, v. 16, n. 12, p. 457–458, 2006a.

HOGAN, D. A. Talking to Themselves: Autoregulation and Quorum Sensing in Fungi. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 4, p. 613–619, abr. 2006b.

HOLT, J. H. *Manual of determinative bacteriology*. 9th. ed. [s.l.] Williams & Wilkins, Springer, 1994.

HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHNKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum Sensing in the Dimorphic Fungus *Candida albicans* Is Mediated by Farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, jul. 2001.

- IVEY, M. Transcriptome analysis of *saccharomyces cerevisiae* under bacterial contamination and lactic acid stress during ethanolic fermentation. 2010. NC State University, 2010.
- IVEY, M.; MASSEL, M.; PHISTER, T. G. Microbial interactions in food fermentations. Annual review of food science and technology, v. 4, n. November 2012, p. 141–62, 2013.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Research, v. 65, n. 2–3, p. 197–209, mar. 2000.
- JANBON, G.; MAGNET, R.; BIGEY, F.; ARNAUD, A.; GALZY, P. Karyotype studies on different strains of *Candida molischiana* by pulsed-field gel electrophoresis. Current genetics, v. 28, n. 2, p. 150–4, jul. 1995.
- JOHN, R. P.; ANISHA, G. S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Bioresource Technology, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- JOHNSON, E. A. Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—the ascomycetes. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 97, n. 2, p. 503–517, 27 jan. 2013.
- KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: An overview. Biotechnology Advances, v. 31, n. 2, p. 224–245, mar. 2013.
- KARLSON, P.; LÜSCHER, M. “Pheromones”: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. Nature, v. 183, n. 4653, p. 55–56, jan. 1959.
- KELLER, L.; SURETTE, M. G. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. Nature Reviews Microbiology, v. 4, n. 4, p. 249–258, abr. 2006.
- KEMSAWASD, V.; BRANCO, P.; ALMEIDA, M. G.; CALDEIRA, J.; ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Cell-to-cell contact and antimicrobial peptides play a combined role in the death of *Lachanea thermotolerans* during mixed-culture alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, p. fnv103, 24 jun. 2015.
- KJELLEBERG, S.; MOLIN, S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? Current opinion in microbiology, v. 5, n. 3, p. 254–8, jun. 2002.
- KLEEREBEZEM, M.; QUADRI, L. E.; KUIPERS, O. P.; DE VOS, W. M. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. Molecular microbiology, v. 24, n. 5, p. 895–904, 1997.

KRIVOROTOVA, T.; CIRKOVAS, A.; MACIULYTE, S.; STANEVICIENE, R.; BUDRIENE, S.; SERVIENE, E.; SEREIKAITI, J. Nisin-loaded pectin nanoparticles for food preservation. *Food Hydrocolloids*, v. 54, p. 49–56, mar. 2016.

KUBOTA, H.; SENDA, S.; NOMURA, N.; TOKUDA, H.; UCHIYAMA, H. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 106, n. 4, p. 381–386, 2008.

KUIPERS, O. P.; DE RUYTER, P. G. G. A.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 64, n. 1, p. 15–21, 1998.

LACERDA, I. C. A.; GOMES, F. C. O.; BORELLI, B. M.; FARIA, C. L. L.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using cultureindependent 16s rrna gene sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 650–657, 2011.

LADE, H.; PAUL, D.; KWEON, J. H. N -Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing with Special Reference to Use of Quorum Quenching Bacteria in Membrane Biofouling Control. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–25, 2014.

LAITILA, A.; SARLIN, T.; RAULIO, M.; WILHELMSON, A.; KOTAVIITA, E.; HUTTUNEN, T.; JUVONEN, R. Yeasts in malting, with special emphasis on *Wickerhamomyces anomalus* (synonym *Pichia anomala*). *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 1, p. 75–84, 26 jan. 2011.

LAZAZZERA, B. A.; GROSSMAN, A. D. The ins and outs of peptide signaling. *Trends in microbiology*, v. 6, n. 7, p. 288–94, jul. 1998.

LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; RICH, J. O.; PRICE, N. P. J.; MANITCHOTPISIT, P.; NUNNALLY, M. S.; ANDERSON, A. M. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresource Technology*, v. 169, p. 45–51, 2014.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. *Bioresource Technology*, v. 165, p. 3–8, ago. 2014.

- LI, K.; LIU, S.; LIU, X. An overview of algae bioethanol production. *International journal of Energy Research*, v. 38, p. 965–977, 2014.
- LI, Q.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Bacterial Community Structure and Dynamics During Corn-Based Bioethanol Fermentation. *Microbial Ecology*, v. 71, n. 2, p. 409–421, 17 fev. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00248-015-0673-9>>.
- LI, Y.-H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 12, n. 3, p. 2519–38, 2012.
- LIMA, L. da R.; ALUÍZIO DE ABREU MARCONDES. Álcool carburante: uma estratégia brasileira. Curitiba - PR.: Editora da UFPR, 2002.
- LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro*, v. 83, p. 21–27, 1974.
- LIMA, J. R. de; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology*, v. 53, n. 7, p. 590–599, jul. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.201200049>>.
- LIN, C. S. K.; PFALTZGRAFF, L. A.; HERRERO-DAVILA, L.; MUBOFU, E. B.; ABDERRAHIM, S.; CLARK, J. H.; KOUTINAS, A. A.; KOPSAHELIS, N.; STAMATELATOU, K.; DICKSON, F.; THANKAPPAN, S.; MOHAMED, Z.; BROCKLESBY, R.; LUQUE, R. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, v. 6, n. 2, p. 426, 2013.
- LINGAPPA, B. T.; PRASAD, M.; LINGAPPA, Y.; HUNT, D. F.; BIEMANN, K. Phenethyl Alcohol and Tryptophol: Autoantibiotics Produced by the Fungus *Candida albicans*. *Science*, v. 163, n. 3863, p. 192–194, 1969.
- LONG, T.; TU, K. C.; WANG, Y.; MEHTA, P.; ONG, N. P.; BASSLER, B. L.; WINGREEN, N. S. Quantifying the Integration of Quorum-Sensing Signals with Single-Cell Resolution. *PLoS Biology*, v. 7, n. 3, p. e1000068, mar. 2009.
- LOPES, M. L. Estudo do polimorfismo cromossômico da linhagem de levedura PE-2. Tese, ESALQ: Universidade de São Paulo, 2000.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; CHERUBIN, R. A.; GODOY, A.; NETO, H. B. de A.; AMORIM, H. V. de. Tailored yeast strains selected for ethanol production: the process driven selection (e-book). 1st. ed. Piracicaba: Fermentec Tecnologias em Açúcar e Álcool Ltda, 2015.

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

LORENZ, M. C.; CUTLER, N. S.; HEITMAN, J. Characterization of Alcohol-induced Filamentous Growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, n. 1, p. 183–199, 2000.

LUCENA, B. T. Diversidade genética de bactérias lácticas presentes em destilarias de álcool combustível nos estados da paraíba e pernambuco. 2010a. Federal University of Pernambuco, 2010.

LUCENA, B. T. Genetic diversity of lactic bacteria present in alcohol fuel distilleries in the states of paraiba and pernambuco. 2010b. Federal University of Pernambuco, 2010.

LUCENA, B. T. L.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; DE MORAIS, M. A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC microbiology*, v. 10, n. 1, p. 298, 2010.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D. F. De. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 63–66, 2001.

LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. *Ethanol Producer Magazine*, v. 11, p. 80–81, 2005.

LYON, G. J.; MUIR, T. W. Chemical signaling among bacteria and its inhibition. *Chemistry & biology*, v. 10, n. 11, p. 1007–21, nov. 2003.

LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, v. 25, n. 9, p. 1389–1403, 2004.

LYONS, T. P.; JACQUES, K. A.; KELSALL, D. R. The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. 3rd. ed. [s.l.] Nottingham University Press, 1999.

MACEDO, M. De. Alcool etílico da cachaça ao cereal. [s.l.] Icone, 1993.

MACHADO1, C. M. M.; ABREU, F. R. e. Produção de álcool combustível a partir de carboidratos. *Política Agrícola*, v. 15, p. 64–78, 2006.

MACHIDA, K.; TANAKA, T.; FUJITA, K.; TANIGUCHI, M. Farnesol-induced generation of reactive oxygen species via indirect inhibition of the mitochondrial electron transport chain in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, v. 180, n. 17, p. 4460–5, set. 1998.

MACHIDA, K.; TANAKA, T.; YANO, Y.; OTANI, S.; TANIGUCHI, M. Farnesol-induced growth inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* by a cell cycle mechanism. *Microbiology*, v. 145, n. 2, p. 293–299, fev. 1999.

MADALENO, L. L.; MINARI, G. D.; DE ANNUNZIO, F. R.; DE CARVALHO, M. R.; BOSSA JÚNIOR, G. R.; SALES, D. C.; FRIGIERI, M. C. Use of antimicrobials for contamination control during ethanolic fermentation. *Científica*, v. 44, n. 2, p. 226, 30 mar. 2016.

MADHANI, H. D. Quorum sensing in fungi: Q&A. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 10, p. 10–12, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D.; CLARK, D. P. Brock biology of microorganisms. 13th ed ed. [s.l.] Benjamin Cummings, 2010.

MAGNUSSON, J.; SCHNÜRER, J.; MUCK, R. E. R. E.; WILKINSON, J. M.; DAVIES, D. R.; PAHLOW, G.; MUCK, R. E. R. E.; DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S. J. W. H. O.; SPOELSTRA, S. S. F.; DOLCI, P.; TABACCO, E.; COCOLIN, L.; BORREANI, G.; BALEIRAS COUTO, M. M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; HUIS IN'T VELD, J. H.; VAN DER VOSSEN, J. M.; *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 1–5, 2001.

MAKANJUOLA, D. B.; SPRINUIIAM, D. G. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated From Different Stages of Malt Whisky Distillery Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 90, n. 1, p. 13–19, 1984.

MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, n. 5, p. 350–357, 1992.

MARINI, M. M.; GOMES, F. C. O.; SILVA, C. L. C.; CADETE, R. M.; BADOTTI, F.; OLIVEIRA, E. S.; CARDOSO, C. R.; ROSA, C. A. The use of selected starter *Saccharomyces cerevisiae* strains to produce traditional and industrial cachaça: a comparative study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 235–242, fev. 2009.

MARTOS, M. A.; ZUBRESKI, E. R.; GARRO, O. A.; HOURS, R. A. Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels. *Biotechnology Research International*, v. 2013, p. 1–7, 2013.

MAS, A.; GUILLAMON, J. M.; TORIJA, M. J.; BELTRAN, G.; CEREZO, A. B.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Bioactive Compounds Derived from the Yeast Metabolism of Aromatic Amino Acids during Alcoholic Fermentation. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. *Microbial Cell Factories*, v. 13, n. 1, p. 34, 2014.

MATURANO, Y. P.; RODRÍGUEZ ASSAF, L. A.; TORO, M. E.; NALLY, M. C.; VALLEJO, M.; CASTELLANOS DE FIGUEROA, L. I.; COMBINA, M.; VAZQUEZ, F. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 155, n. 1–2, p. 43–50, abr. 2012.

MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. *Fermentation – a practical approach*. [s.l.] Oxford University Press, 1990.

MENESES, N. G. T.; TEIXEIRA, J. A.; MUSSATTO, S. I. Produção de etanol a partir de subproduto cervejeiro. *Boletim de Biotecnologia - Sociedade Portuguesa de Biotecnologia*, v. 2, n. 3, p. 27–28, 2013.

- MICHEL, M.; MEIER-DÖRNBERG, T.; JACOB, F.; METHNER, F.-J.; WAGNER, R. S.; HUTZLER, M. Review: Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 4, p. 569–587, out. 2016.
- MILANEZ, A. Y.; FAVERET FILHO, P. S. C.; DA ROSA, S. E. S. Perspectivas para o etanol brasileiro. *BNDES Setorial*, v. 27, p. 18, 2008.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 165–199, out. 2001.
- MOHAMED, M. A. N.; RANJARD, L.; CATROUX, C.; CATROUX, G.; HARTMANN, A. Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *Journal of Microbiological Methods*, v. 60, n. 1, p. 31–40, jan. 2005.
- MONNET, V.; JUILLARD, V.; GARDAN, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical reviews in microbiology*, v. 42, n. 3, p. 339–51, maio 2014.
- MORTIMER, R. K.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, M. Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, v. 10, n. 12, p. 1543–1552, dez. 1994.
- MUELLER, G. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. Burlington, MA: Academic Press, 2011.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, v. 43, n. 1, p. 1–14, jan. 2006.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 81, n. 3, p. 268–274, mar. 2006.
- MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 37, n. 3, p. 351–370, 2011.

MUTTON, M. J. R. Reflexos da qualidade da matéria-prima no processo industrial. In: Perdas de açúcares: do campo ao produto final. Simpósio Internacional da STAB., Águas de São Pedro. Anais... Águas de São Pedro: 2003.

NANDY, S. K. Bioprocess Technology Governs Enzyme Use and Production in Industrial Biotechnology: An Overview. *Enzyme Engineering*, v. 5, n. 1, 2016.

NARENDRANATH, N. V. Bacterial contamination and control in ethanol production. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). *The alcohol textbook*. 4. ed. [s.l: s.n.]p. 287–298.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4158–4163, 1997a.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Acetic Acid and Lactic Acid Inhibition of Growth of *Saccharomyces cerevisiae* by Different Mechanisms. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 59, n. 4, p. 187–194, 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Ethanol. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702>>.

NAVES, R. F.; DE SOUSA FERNANDES, F.; GOMES PINTO, O.; FALEIRO NAVES, P. L. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. *Enciclopédia Biosfera*, v. 6, n. 11, 2010a.

NEDER, R. N. Contribuição ao estudo de algumas leveduras regionais de fábricas de aguardente de cana: posição sistemática e valor industrial. Tese, ESALQ – Universidade de São Paulo - USP, 1975.

NEI, M.; KUMAR, S. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford Uni ed. [s.l: s.n.]

NEIMAN, A. M. Ascospore Formation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 4, p. 565–584, 1 dez. 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de lehninger*. [s.l.] Artmed, 2014.

NETO, P. O. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, 1990.

NETO, P. O. Estudo de diferentes fatores que influenciam o crescimento da população bacteriana contaminante da fermentação alcoólica por leveduras. Tese, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 1995.

NETO, P. O.; FUTOSHI, Y. Effects of nutritional factors on growth of *Lactobacillus fermentum* mixed with *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation. *Revista de Microbiologia*, v. 28, n. 1, p. 25–31, 1997.

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

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

NOGUEIRA, L.; SEABRA, J.; BEST, G.; LEAL, M.; POPPE, M. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

NOLASCO-JUNIOR, J. Development of thermal process optimized for sugarcane juice in alcoholic fermentation. 2005. State University of Campinas - UNICAMP, 2005.

NOVA, M. X. V.; SCHULER, A. R. P.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; MORAIS, M. A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiology*, v. 26, n. 5, p. 460–466, ago. 2009.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v. 242, n. 2, p. 205–215, 2002.

OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; MORGANO, M. A.; SERRA, G. E. Fermentation characteristics as criteria for selection of cachaça yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 19–24, fev. 2004.

OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; FIETTO, L. G.; DE MIRANDA CASTRO, I.; COUTRIM, M. X.; SCHULLER, D.; ALVES, H.; CASAL, M.; DE OLIVEIRA SANTOS, J.; ARAUJO, L. D.; DA SILVA, P. H. A.; BRANDAO, R. L. Biochemical and Molecular Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Obtained from Sugar-Cane Juice

Fermentations and Their Impact in Cachaca Production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 3, p. 693–701, 1 fev. 2008.

OSEI, G.; ARTHUR, R.; AFRANE, G.; AGYEMANG, E. O. Potential feedstocks for bioethanol production as a substitute for gasoline in Ghana. *Renewable Energy*, v. 55, p. 12–17, 2013.

PADILLA, B.; GIL, J. V.; MANZANARES, P. Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 31 mar. 2016.

PAGANI, D. M.; BRANDÃO, L. R.; SANTOS, A. R. O.; FELIX, C. R.; RAMOS, J. P.; BROETTO, L.; SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; ROSA, C. A.; VALENTE, P.; LANDELL, M. F. *Papiliotrema leoncinii* sp. nov. and *Papiliotrema miconiae* sp. nov., two tremellaceous yeast species from Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 1799–1806, 1 abr. 2016.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000.

PARAMITHIOTIS, S.; GIOULATOS, S.; TSAKALIDOU, E.; KALANTZOPOULOS, G. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry*, 2006.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; GOMES, F. C. O.; NEVES, M. J.; PIMENTEL, P. F.; ROSA, C. A. Trehalose accumulation, invertase activity and physiological characteristics of yeasts isolated from 24 h fermentative cycles during the production of artisanal Brazilian cachaça. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, n. 3, p. 202–208, set. 2002.

PATARO, C.; GUERRA, J. B.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; LINARDI, V. R.; ROSA, C. A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of applied microbiology*, v. 89, n. 1, p. 24–31, jul. 2000.

PATIL, A. G.; KOOLWAL, S. M.; BUTALA, H. D. Fusel Oil: Composition, Removal and Potential Utilization. *International sugar journal*, v. 104, n. 1238, p. 51–58, 2009.

PAULILLO, S. C. de L.; YOKOYA, F.; BASSO, L. C. Mobilization of endogenous glycogen and trehalose of industrial yeasts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 249–254, jul. 2003.

PEDERSON, C. S.; HUCKER, G. J. The significance of bacteria in sugar mills. *Meetg Assoc de Tech Azucareros de Cuba*, p. 225–230, 1946.

PENG, J.; ZHANG, L.; GU, Z.-H.; DING, Z.-Y.; SHI, G.-Y. The role of nisin in fuel ethanol production with *Saccharomyces cerevisiae*. *Letters in applied microbiology*, v. 55, n. 2, p. 128–34, ago. 2012.

PEREIRA, F. B.; GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Cell recycling during repeated very high gravity bio-ethanol fermentations using the industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain PE-2. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 1, p. 45–53, 6 jan. 2012.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 11, p. 1655–1661, 24 nov. 2010.

PEREIRA, G. D. A.; GOMES, G.; ROZOLEM, A.; DE NÓBREGA, G.; BARCELLOS, F.; RODRIGUES, E. Isolation, identification and screening of hidrolitic enzymes producing phylloplane yeasts. *BMC Proceedings*, v. 8, n. Suppl 4, p. P261, 2014.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 39, n. 8, p. 763–770, 2004.

PHILLIP, G. Z.; RICHARD, C. H. The isolament and characterization of flocculent yeasts. In: *Biological Research on Industrial yeast III*. [s.l.] CRC press, 1987. p. 185–196.

PIPPO, W. A.; LUENGO, C. A.; ALBERTERIS, L. A. M.; GARZONE, P.; CORNACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. *Waste and Biomass Valorization*, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2011.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. *Fungi and food spoilage*. Boston, MA: Springer US, 2009.

POLSINELLI, M.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; MORTIMER, R. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape vine. *Letters in applied microbiology*, v. 23, n. 2, p. 110–4, ago. 1996.

PORTO, L. M. Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica continua com reatores de mistura ligados em serie. Tese, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2006.

PORTUGAL, C. B.; ALCARDE, A. R.; BORTOLETTO, A. M.; DE SILVA, A. P. The role of spontaneous fermentation for the production of cachaça: a study of case. *European Food Research and Technology*, v. 242, n. 9, p. 1587–1597, 7 set. 2016.

PORTUGAL, C. B.; DE SILVA, A. P.; BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Research International*, nov. 2016.

PURI, M.; ABRAHAM, R. E.; BARROW, C. J. Biofuel production: Prospects, challenges and feedstock in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 8, p. 6022–6031, 2012.

QIU, H.; SUN, L.; HUANG, J.; ROZELLE, S. Liquid biofuels in China: Current status, government policies, and future opportunities and challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, n. 5, p. 3095–3104, 2012.

RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R. Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. *FEMS Yeast Research*, 2015.

RAJEE, O.; FABIAN, K. Q. S.; SHEN, L. J.; HAO, K. L.; GABRIEL, T. C. K.; ANN, T. K.; SEETHO, A. Potential and technological advancement of biofuels. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, v. 4, n. 4, p. 12–29, 2014.

RAMOS, C. L.; DUARTE, W. F.; FREIRE, A. L.; DIAS, D. R.; ELEUTHERIO, E. C. A.; SCHWAN, R. F.; DIAS, DISNEY RIBEIRO, ELEUTHERIO, E. C. A.; SCHWAN, R. F. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz. J. Microbiol.*, v. 44, n. 3, p. 935–944, set. 2013.

RATCLIFF, W. C.; TRAVISANO, M. Experimental Evolution of Multicellular Complexity in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioScience*, v. 64, n. 5, p. 383–393, 1 maio 2014.

RATÓN, T. O. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 21, p. 15–19, 2004.

READING, N. C.; SPERANDIO, V. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 254, n. 1, p. 1–11, jan. 2006.

READING, N. C.; TORRES, A. G.; KENDALL, M. M.; HUGHES, D. T.; YAMAMOTO, K.; SPERANDIO, V. A Novel Two-Component Signaling System That Activates Transcription of an Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Effector Involved in Remodeling of Host Actin. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 6, p. 2468–2476, mar. 2007.

REDFIELD, R. J. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in microbiology*, v. 10, n. 8, p. 365–70, ago. 2002.

REIN, P. Cane sugar engineering. [s.l.] Verlag Dr. Albert Bartens, 2007.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. Dissertação, ESALQ – Universidade de São Paulo - USP, 2011.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para produção de etanol. *Ciência & Tecnologia de Alimentos*, v. 1, p. 81, 2011.

RENNIE, R. J.; FREITAS, J. R. de; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 28, n. 5, p. 462–467, 1982.

RFA. World fuel ethanol production. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/world/>

RFA. Global Ethanol Production. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/>

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; ANDERSON, A. M.; NUNNALLY, M. S. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresource Technology*, v. 196, p. 347–354, nov. 2015.

ROACH, D. R.; KHATIBI, P. A.; BISCHOFF, K. M.; HUGHES, S. R.; DONOVAN, D. M. Bacteriophage-encoded lytic enzymes control growth of contaminating *Lactobacillus* found in fuel ethanol fermentations. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 20, 2013.

ROBERTSON, J. A.; I'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 890–896, jul. 2010.

RODINI, M. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Dissertation, ESALQ – Universidade de Paulo - USP, 1985.

ROSA-MAGRI, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Bioprospection of yeasts as biocontrol agents against phytopathogenic molds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 1, p. 1–5, fev. 2011.

ROSALES, S. Y. R. Contaminantes bacterianos da fermentação alcoólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Dissertação, Universidade Estadual de São Paulo UNESP (Rio Claro), 1989.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. da; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas: Comportamento multicelular em procarioto via comunicação intercelular. *Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento*, v. 33, p. 35–50, 2004.

RUTH, L. Bio or bust? The economic and ecological cost of biofuels. *EMBO reports*, v. 9, n. 2, p. 130–3, fev. 2008.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J. .; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; DEL NOZAL, M. . Variability of brewer's spent grain within a brewery. *Food Chemistry*, v. 80, n. 1, p. 17–21, jan. 2003.

SANTOS, M. T.; YOKOYA, F. Characteristics of yeast cell flocculation by *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 75, p. 151–154, 1993.

- SCANES, M. L. A.; HOHMANN, S. K. T.; PRIOR, B. A. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, v. 19, p. 17–24, 1998.
- SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. [s.l.] Springer, 1995. p. 7–18.
- SCHMITT, M. J.; BREINIG, F. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, n. 3, p. 257–276, ago. 2002.
- SENSES-ERGUL, S.; ÁGOSTON, R.; BELÁK, Á.; DEÁK, T. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, n. 1, p. 120–124, 2006.
- SERRA, G. E.; CEREDA, M. P.; FERES, R. J.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. T. Contaminação da fermentação alcoólica “floculação do fermento”. *Brasil Açucareiro*, v. 93, p. 26–31, 1979.
- SEVERIN, F. F.; MEER, M. V.; SMIRNOVA, E. A.; KNORRE, D. A.; SKULACHEV, V. P. Natural causes of programmed death of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1783, n. 7, p. 1350–1353, jul. 2008.
- SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal*, v. 27, n. 3, p. 379–423, jul. 1948.
- SHARMIN, F.; WAKELIN, S.; HUYGENS, F.; HARGREAVES, M. Firmicutes dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. *Scientific reports*, v. 3, p. 3107, 2013.
- SHI, L.; LI, Z.; TACHIKAWA, H.; GAO, X.-D.; NAKANISHI, H. Use of Yeast Spores for Microencapsulation of Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 15, p. 4502–4510, 1 ago. 2014.
- SHIRTLIFF, M. E.; PETERS, B. M.; JABRA-RIZK, M. A. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 299, n. 1, p. 1–8, out. 2009.
- SIDARI, R.; CARIDI, A.; HOWELL, K. S. Wild *Saccharomyces cerevisiae* strains display biofilm-like morphology in contact with polyphenols from grapes and wine. *International Journal of Food Microbiology*, v. 189, p. 146–152, out. 2014.

SILVA-FILHO, E. A. da; SANTOS, S. K. B. dos; RESENDE, A. do M.; MORAIS, J. O. F. de; MORAIS, M. A. de; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 88, n. 1, p. 13–23, jul. 2005.

SILVA, N. Influência do resfriamento em torre sobre a microbiota do caldo de cana no processo de produção de álcool. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 1988.

SILVA, R. D. S.; OLIVEIRA, P. A. de; SILVA, É. R. S. da; CARDOSO, C. A. L.; ERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. Effect of acid treatment in alcoholic fermentation. *Ciência e Natura*, v. 37, n. 1, p. 52–56, 20 jan. 2015.

SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. *Nature*, v. 163, n. 4148, p. 688–688, 30 abr. 1949.

SIMS, R. E. H.; MABEE, W.; SADDLER, J. N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 6, p. 1570–1580, mar. 2010.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G.-J. E. Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 16, p. 5473–5482, ago. 2012.

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

SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 9, p. 401–408, 2004.

SMITH, D.; WANG, J.-H.; SWATTON, J. E.; DAVENPORT, P.; PRICE, B.; MIKKELSEN, H.; STICKLAND, H.; NISHIKAWA, K.; GARDIOL, N.; SPRING, D. R.; WELCH, M. Variations on a theme: diverse N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. *Science progress*, v. 89, n. Pt 3-4, p. 167–211, 2006.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, n. 1, p. 1–18, 2011.

SOBRINHO, V. S.; SILVA, V. C. F. da; CEREDA., M. P. Fermentation of sugar cane juice (*Sacharum officinarum*) cultivar RB 7515 by wild yeasts resistant to UVC. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, v. 2, n. 1, p. 13–21, 2011.

SOLOMON, S. Post-harvest deterioration of sugarcane. *Sugar Tech*, v. 11, n. 2, p. 109–123, 2009.

SPRAGUE, G. F.; WINANS, S. C. Eukaryotes learn how to count: Quorum sensing by yeast. *Genes and Development*, v. 20, n. 9, p. 1045–1049, 2006.

STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. da G. S.; ANDRIETTA, S. R. Caracterização da biomassa isolada de processos fermentativos de produção de etanol para uso como biocombustíveis. In: *Proceedings of the 6. Encontro de Energia no Meio Rural, Campinas. Anais...* Campinas: 2006.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations *Annual Review of Microbiology*, 2014.

STENBERG, K.; TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 71, n. 4, p. 299–308, abr. 1998.

STRATFORD, M. Food and Beverage Spoilage Yeast. *Yeasts in food and beverages*, p. 335–379, 2006.

STROPPA, C. T. Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 1998.

STROPPA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; DE FIGUEIREDO, A. L. F.; CASTRO, C. C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. *Ciencia e Agrotecnologia*, v. 33, n. SUPPL., p. 1978–1983, 2009.

STURME, M. H. J.; FRANCKE, C.; SIEZEN, R. J.; DE VOS, W. M.; KLEEREBEZEM, M. Making sense of quorum sensing in lactobacilli: a special focus on *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbiology (Reading, England)*, v. 153, n. Pt 12, p. 3939–47, dez. 2007.

STURME, M. H. J.; KLEEREBEZEM, M.; NAKAYAMA, J.; AKKERMANS, A. D. L.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M. Cell to cell communication by autoinducing peptides in

gram-positive bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology, v. 81, n. 1–4, p. 233–243, 2002.

STURME, M. H. J.; NAKAYAMA, J.; MOLENAAR, D.; MURAKAMI, Y.; KUNUGI, R.; FUJII, T.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. An agr-like two-component regulatory system in *Lactobacillus plantarum* is involved in production of a novel cyclic peptide and regulation of adherence. Journal of bacteriology, v. 187, n. 15, p. 5224–35, ago. 2005.

SUÁREZ-LEPE, J. A.; MORATA, A. New trends in yeast selection for winemaking. Trends in Food Science and Technology, 2012. .

SUE, T.; OBOLONKIN, V.; GRIFFITHS, H.; VILLAS-BÔAS, S. G. An exometabolomics approach to monitoring microbial contamination in microalgal fermentation processes by using metabolic footprint analysis. Applied and Environmental Microbiology, v. 77, n. 21, p. 7605–7610, 2011.

TAGA, M. E.; BASSLER, B. L. Chemical communication among bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 100 Suppl, p. 14549–14554, 2003.

TAO, J.; YU, S.; WU, T. Review of China's bioethanol development and a case study of fuel supply, demand and distribution of bioethanol expansion by national application of E10. Biomass and Bioenergy, v. 35, n. 9, p. 3810–3829, 2011.

TATARIDIS, P.; KANELIS, A.; LOGOTETIS, S.; NERANCIS, E. Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, n. 124, p. 415–426, 2013.

TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J. G. (Ed.). Lactic acid bacteria in beverages and food. London: Academic Press, 1975. p. 171–177.

TISCIONE, N. B.; ALFORD, I.; YEATMAN, D. T.; SHAN, X. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. Journal of analytical toxicology, v. 35, n. 7, p. 501–11, set. 2011.

TOCHEVA, E. I.; ORTEGA, D. R.; JENSEN, G. J. Sporulation, bacterial cell envelopes and the origin of life. Nature Reviews Microbiology, v. 14, n. 8, p. 535–542, jun. 2016.

TOSIN, C.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. da G. S. Population dynamics of yeasts inhabiting bioethanol production with cell recycling. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 121, n. 3, p. 343–348, 2015.

TROFA, D.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 4, p. 606–625, 1 out. 2008.

TRUMAN STATE UNIVERSITY. Gas Chromatography: Principles and Determination of Percent Alcohol. Disponível em: <[chrome-extension://oemmndcbldboiebfnladdacbfmadadm/http://chemlab.truman.edu/CHEM222manual/pdf/gclab.pdf](http://chemlab.truman.edu/CHEM222manual/pdf/gclab.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2016.

TURGAY, K.; HAHN, J.; BURGHOOORN, J.; DUBNAU, D. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *The EMBO Journal*, v. 17, n. 22, p. 6730–6738, nov. 1998.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M. L. Quorum Sensing: Fact, Fiction, and Everything in Between. In: *Advances in Applied Microbiology*. [s.l.: s.n.]62p. 191–234.

VARELA, C. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 23, p. 9861–9874, 27 dez. 2016.

VERSTREPEN, K. J.; KLIS, F. M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 5–15, 2006.

VIANNA, C. R.; SILVA, C. L. C.; NEVES, M. J.; ROSA, C. A. *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 93, n. 1–2, p. 205–217, 15 fev. 2008.

VIEGAS, M. C. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. Tese, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, 2003.

VUYST, L. De; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 194–9, 2007.

WALKER, G. M. *Pichia anomala*: cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 1, p. 25–34, 14 jan. 2011.

WALLACE-SALINAS, V.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 151, 2013.

WALTER, A.; ROSILLO-CALLE, F.; DOLZAN, P.; PIACENTE, E.; BORGES DA CUNHA, K. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 8, p. 730–748, 2008.

WANG, L.; QUICENO, R.; PRICE, C.; MALPAS, R.; WOODS, J. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 40, p. 571–582, 2014.

WANG, P.-M.; ZHENG, D.-Q.; CHI, X.-Q.; LI, O.; QIAN, C.-D.; LIU, T.-Z.; ZHANG, X.-Y.; DU, F.-G.; SUN, P.-Y.; QU, A.-M.; WU, X.-C. Relationship of trehalose accumulation with ethanol fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 371–376, jan. 2014.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 21, n. 1081–0706 (Print), p. 319–46, 2005.

WEBER, M.; BUCETA, J. Dynamics of the quorum sensing switch: stochastic and non-stationary effects. *BMC Systems Biology*, v. 7, n. 1, p. 6, 2013.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Trends in biotechnology*, v. 17, n. 12, p. 482–7, dez. 1999.

WILLEY, J. M.; DONK, W. A. V. D. Lantibiotics: Peptides of Diverse Structure and Function. *Annual Review of Microbiology*, v. 61, n. 1, p. 477–501, out. 2007.

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CÁMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 362, n. 1483, p. 1119–1134, 2007.

WILLIAMS, T. C.; AVERESCH, N. J. H.; WINTER, G.; PLAN, M. R.; VICKERS, C. E.; NIELSEN, L. K.; KRÖMER, J. O. Quorum-sensing linked RNA interference for dynamic metabolic pathway control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 2015.

WINZER, K.; HARDIE, K. R.; WILLIAMS, P. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current opinion in microbiology*, v. 5, n. 2, p. 216–22, abr. 2002.

WITHERS, H.; SWIFT, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Current opinion in microbiology*, v. 4, n. 2, p. 186–93, abr. 2001.

WORLEY-MORSE, T. O.; DESHUSSES, M. A.; GUNSCH, C. K. Reduction of invasive bacteria in ethanol fermentations using bacteriophages. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 8, p. 1544–1553, ago. 2015.

WUSTER, A.; BABU, M. M. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Mol. BioSyst.*, v. 6, n. 1, p. 134–141, 2009.

XAVIER, L. M. Análise do perfil de expressão gênica diferencial de cepas de *saccharomyces cerevisiae* laboratoriais e selvagens em diferentes estresses por ferramentas de bioinformática. 2015. Federal University of Espirito Santo, 2015.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biotechnological Potential of Brewers Spent Grain and its Recent Applications. *Waste and Biomass Valorization*, v. 3, n. 2, p. 213–232, 25 jun. 2012.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). *The yeasts, a taxonomic study*. 4th. ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 1998. p. 7–100.

YOU, L.; WANG, S.; ZHOU, R.; HU, X.; CHU, Y.; WANG, T. Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. *J. Inst. Brew.*, v. 122, p. 517–523, 2016.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, v. 2, p. 50–56, 2012.

ZHANG, H.; TACHIKAWA, H.; GAO, X.-D.; NAKANISHI, H. Applied Usage of Yeast Spores as Chitosan Beads. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 16, p. 5098–5105, 15 ago. 2014.

ZHENG, D. Q.; WU, X. C.; TAO, X. L.; WANG, P. M.; LI, P.; CHI, X. Q.; LI, Y. D.; YAN, Q. F.; ZHAO, Y. H. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with

improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 3, p. 3020–3027, 2011.

ZUPAN, J.; AVBELJ, M.; BUTINAR, B.; KOSEL, J.; ŠERGAN, M.; RASPOR, P. Monitoring of quorum-sensing molecules during minifermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 10, p. 2496–2505, 2013.

APÊNDICE - CAPÍTULO 3

LEVEDURAS EM FERMENTO CAIPIRA DA PRODUÇÃO DE CACHAÇA ARTESANAL E DE BAGAÇO DE MALTE DA CERVEJARIA: BIODIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS

YEASTS IN WILD FERMENT FOR CACHAÇA PRODUCTION AND IN BREWER'S SPENT GRAIN: BIODIVERSITY AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION FOR BIOTECHNOLOGICAL PURPOSES

Materiais Suplementares -

1- Descrição do processo de fabricação da cachaça artesanal e coleta das amostras

De acordo com a metodologia empregada pelo produtor, o fermento caipira foi preparado com aproximadamente 10 kg de farelo de milho triturado e seco e 10 litros de caldo de cana-de-açúcar moído (para esta etapa foi utilizado preferencialmente a região apical dos colmos). Este preparado foi mantido em recipiente plástico, aberto e sob o efeito da variação da temperatura ambiente para o desenvolvimento da microbiota fermentadora (aproximadamente 48 - 72 horas para o início da fermentação espontânea). Para estimular o desenvolvimento celular, aproximadamente 2 litros de caldo de cana fresco é adicionado diariamente. O fermento é utilizado após 12 – 15 dias.

A fermentação sem o reciclo de células foi preparada em tonel plástico higienizado (porém não estéril) de 100 litros abastecidos com 90 litros de caldo de cana-de-açúcar fresco (imediatamente após a moagem). O início da fermentação ocorreu com a inclusão do fermento caipira pronto. A fermentação foi mantida sem controle de temperatura e agitação, coberta com uma peneira fina para evitar a deposição de insetos.

A fermentação com o reciclo de células foi preparada de forma idêntica, porém o inóculo usado foi a fração de 1/10 da fermentação anterior. Neste caso, 9/10 da fermentação antecessora foi destinada para a destilação e o vinho residual naturalmente decantado e rico em leveduras (denominado de “pé-de-cuba”) foi utilizado como inóculo.

2- Solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) e curva padrão

A base para a quantificação da atividade enzimática foi estabelecida pela curva padrão de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com os produtos das reações enzimáticas, sendo Xilose para xilanase, ácido galacturônico para pectinase, e glicose para celulase e amilase. A solução de DNS foi preparada com:

- 1) 500 mL de solução de 308 g.L^{-1} tartarato de sódio e potássio tetra-hidratado e $19,4 \text{ g.L}^{-1}$ hidróxido de sódio, 500 mL de solução $10,74 \text{ g.L}^{-1}$ Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.
- 2) 50 mL de solução de $83,4 \text{ g.L}^{-1}$ fenol e $83,4 \text{ g.L}^{-1}$ metabissulfito de sódio.

Após a estabilização, as soluções 1 e 2 foram homogeneizadas por agitação magnética por 5 minutos e em seguida filtrada em filtro de papel. A solução de DNS resultante foi armazenada em frasco escuro durante 7 dias para a completa estabilização dos reagentes antes da utilização para os testes enzimáticos.

Para a construção das curvas, os agentes redutores (xilose, ácido galacturônico e glicose) foram individualmente diluídos em água destilada na faixa de 0 a 10 mg.mL^{-1} constituindo 10 frações. A reação foi realizada através da fervura intermitente por 10 minutos de 1 mL de DNS em 1 mL do agente da curva diluído.

Para a leitura em espectrofotômetro, o produto da reação foi resfriado em banho de gelo e diluído com água destilada 8 mL de água destilada conferindo 10 mL de solução final. As leituras foram realizadas em triplicata em espectrofotômetro a 540nm com cubeta de quartzo. Foram considerados no mínimo seis pontos para a construção de cada curva padrão (**Figura 4**).

A reação colorimétrica para a determinação da atividade enzimática foi realizada com 1 mL do sobrenadante após a reação enzimática e 1 mL de solução de DNS fervidos intermitentemente por 10 minutos. A leitura em espectrofotômetro foi realizada de acordo com os passos supramencionados.

3- Tabelas com todas as cepas isoladas e as respectivas características fenotípicas

Tabela 1. Diversidade e perfil fenotípico da amostra de *Bagaço de Malte Cervejeiro* (BSG)

Relação das espécies isoladas da amostra de BSG e as características fenotípicas individuais de cada cepa.

Tabela 2. Diversidade e perfil fenotípico da amostra de *Fermento Caipira* (CSC)

Relação das espécies isoladas da amostra de CSC e as características fenotípicas individuais de cada cepa.

Tabela 3. Diversidade e perfil fenotípico da amostra de *Fermento sem Células Recicladas* (SNR)

Relação das espécies isoladas da amostra de SNR e as características fenotípicas individuais de cada cepa.

Tabela 4. Diversidade e perfil fenotípico da amostra de *Fermento Com Células Recicladas* (SRC)

Relação das espécies isoladas da amostra de SRC e as características fenotípicas individuais de cada cepa.

Nas tabelas o símbolo (+) representa que a característica descrita na coluna foi observada para a cepa descrita na linha. A representação Killer YSS e Killer 1006 corresponde a ação killer das cepas testadas sobre as cepas sensíveis *Candida glabrata* Y55 e *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1006 respectivamente. NAT – natamicina. ACT – actidiona (ciclohexamida). AMY – amilase. XYL – Xilanase. PEC – Pectinase. CEL – celulase. Qualit – teste qualitativo. Quantit – teste quantitativo

Bagaço de Malte Cervejeiro (BSG)		Killer YSS	Killer 1006	Ascósporo	37°C	45°C	50°C	NAT 50mg/L 100mg/L	ACT 50mg/L 100mg/L	AMY Qualit. Quantit.	XYL Qualit. Quantit.	PEC Qualit. Quantit.	CEL Qualit. Quantit.
Espécies	Cepas												
<i>C. lusitaniae</i>	LMQA BSG 2				+								
<i>C. lusitaniae</i>	LMQA BSG 3				+	+							
<i>P. kudriavzevii</i>	LMQA BSG 4				+	+							
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA BSG 5.1			+	+	+							
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 6				+					+	+	+	+
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 6.1				+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 7			+	+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 8			+	+								

Fermento Caipira (CSC)		Killer YSS	Killer 1006	Ascósporo	37°C	45°C	50°C	NAT 50mg/L 100mg/L	ACT 50mg/L 100mg/L	AMY Qualit. Quantit.	XYL Qualit. Quantit.	PEC Qualit. Quantit.	CEL Qualit. Quantit.
<i>Espécie</i>	Cepas												
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 1			+	+						+	+	
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 2			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 3				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 4			+	+								
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 5				+					+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 6	+			+						+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 7			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 8			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 10			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 11			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 12				+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA CSC 13	+			+			+	+		+	+	+
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 14				+						+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 15				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 16			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 17	+	+	+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 18	+	+	+	+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 19	+			+								
<i>P. manshurica</i>	LMQA CSC 20	+			+			+	+		+	+	
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 21				+					+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 22	+	+	+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 23	+	+	+	+	+							
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 24	+	+	+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 25			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 26			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 27	+		+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 28	+		+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 29			+	+								
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 30	+			+					+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 31			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 32	+		+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 33			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 34				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 35			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 36			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 37			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 38			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 39			+	+								
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 41	+			+					+	+	+	
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 42			+	+								
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 43	+			+					+	+	+	+
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 44	+			+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 46			+	+								
<i>P. manshurica</i>	LMQA CSC 47				+						+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 48				+						+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 49			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 50			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 51			+	+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 52	+			+						+	+	
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 53	+			+						+	+	+
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 54	+			+						+	+	

Fermento com células recicladas (SRC)		Killer YSS	Killer 1006	Ascósporo	37°C	45°C	50°C	NAT 50mg/L 100mg/L	ACT 50mg/L 100mg/L	AMY Qualit. Quantit.	XYL Qualit. Quantit.	PEC Qualit. Quantit.	CEL Qualit. Quantit.
Espécies	Cepas												
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 107			+	+								
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 108				+								
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 109				+								
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 110				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 111			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 112			+	+				+	+			
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 116			+	+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 117	+			+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 118			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 122			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 123			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 124			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 125			+	+								
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 126				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 127			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 128			+	+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 130				+				+	+			
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 131				+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 132				+				+	+			
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 133			+	+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 134				+				+	+			
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 136				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 137			+	+								
<i>W. anomalus</i>	LMQA SRC 138	+			+							+	
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 139				+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 140	+	+	+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 142	+	+	+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 143	+	+	+	+								
<i>T. delbruecki</i>	LMQA SRC 144				+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 146				+				+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 147			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 148			+	+								
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 149				+								
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 150				+				+				

4- Diferenciação: ascósporos e células vegetativas (Microfotografias)

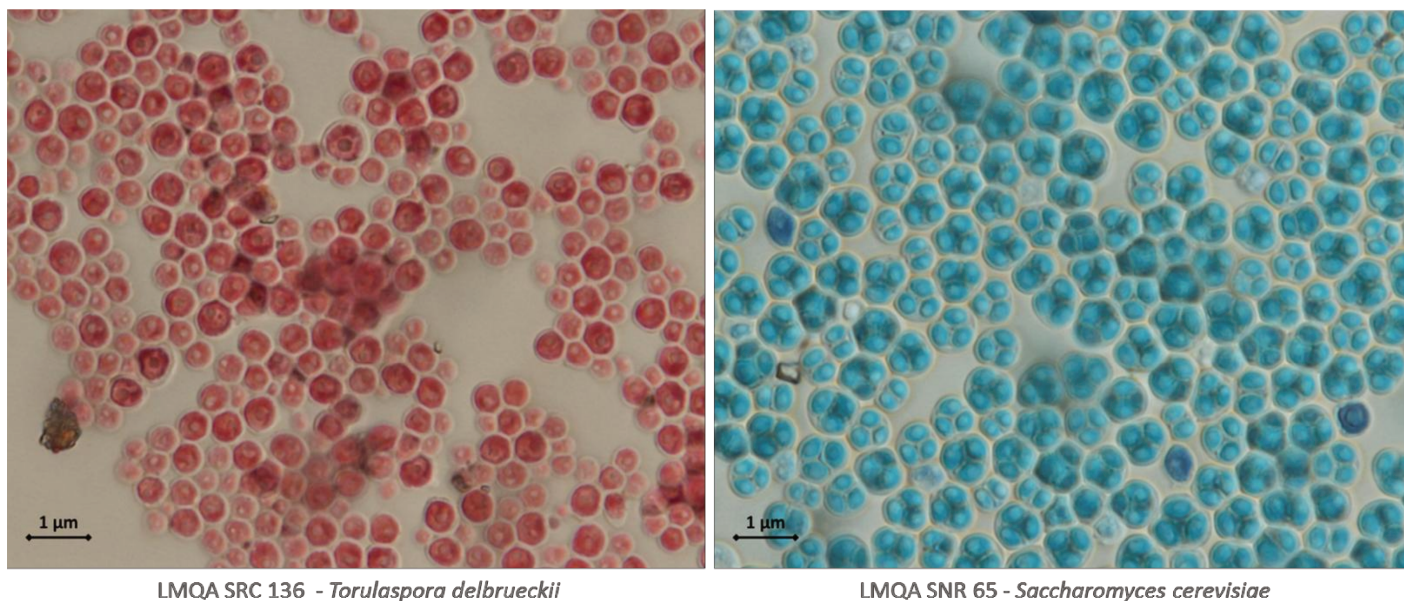


Figura 1 – Microfotografias de células vegetativas da cepa LMQA SRC 136 e dos ascósporos da cepa LMQA SNR 65 após o crescimento em meio acetato de potássio. A coloração de Wirtz-Conklin evidenciou os ascósporos em azul e as células vegetativas (cepas não produtoras de ascósporos) em vermelho. A observação microscópica também evidenciou a forma irregular contendo os ascósporos globulares no interior, enquanto que as células vegetativas são inteiriças e esféricas. As lâminas foram analisadas sob aumento de 100 vezes no microscópio Micro Nikon® Eclipse Ni equipado com Câmera Nikon® DS - Ri1 (Nikon, Tokyo, Japan).

APÊNDICE - CAPÍTULO 4

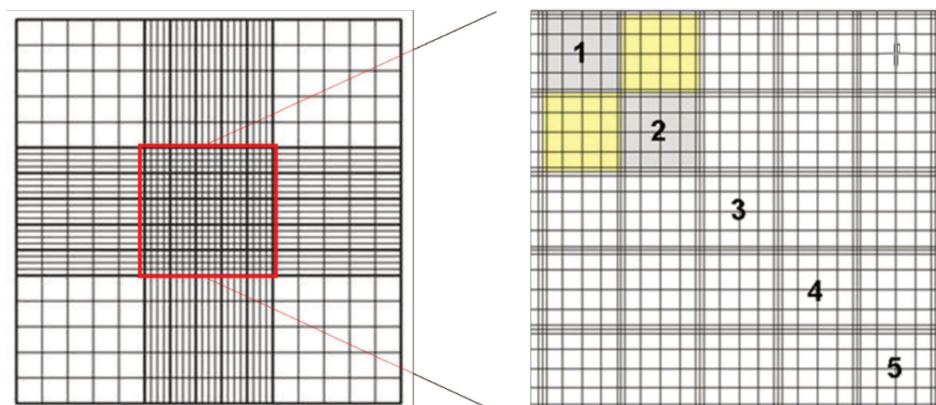
DESTILARIA DE CACHAÇA ARTESANAL E RESÍDUO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA: FONTES DE ISOLAMENTO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

ENVIROMMENT OF ARTISANAL CACHAÇA DISTILLERY AND BREWER'S SPENT GRAIN AS SOURCES OF YEASTS WITH POTENTIAL FOR BIOETHANOL PRODUCTION

Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice

1- Metodologia da contagem em Neubauer e ajuste do inóculo

Para a contagem na câmara de Neubaer, 100 μL da suspensão foi diluída em 900 μL da solução de azul de metileno 0,5 %. Para as suspensões com alta densidade celular, esta diluição decimal foi realizada mais uma ou duas vezes para facilitar a visualização e contagem. A solução de azul de metileno com as células foi transferida para a fenda da câmara de Neubauer e coberto com a lamínula. A contagem das células foi realizada em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Foi considerando o quadrante central como demonstrado na figura a seguir. A quantificação das células foi feita nos 5 quadrados médios na diagonal.



A transformação do número de células quantificado na câmara para a razão de células por mL foi realizada através da equação:

$$C = N \times 5 \times 10^4 \times D$$

No qual: C – concentração de células por mL; N – número total de células contabilizadas nos 5 quadrados médios diagonais; 5 – multiplicação do número de células para o total de 25 quadrados médios da câmara; 10^4 – correção do volume da câmara de Neubauer para mL (ou cm^3); D – fator de diluição da suspensão inicial de leveduras (OSCAR BASTIDAS - CELEROMICS).

De acordo com o resultado da contagem em câmara, a suspensão inicial foi ajustada com xarope de cana-de-açúcar 13 ° Brix até a concentração de 10^8 células por mL através da equação:

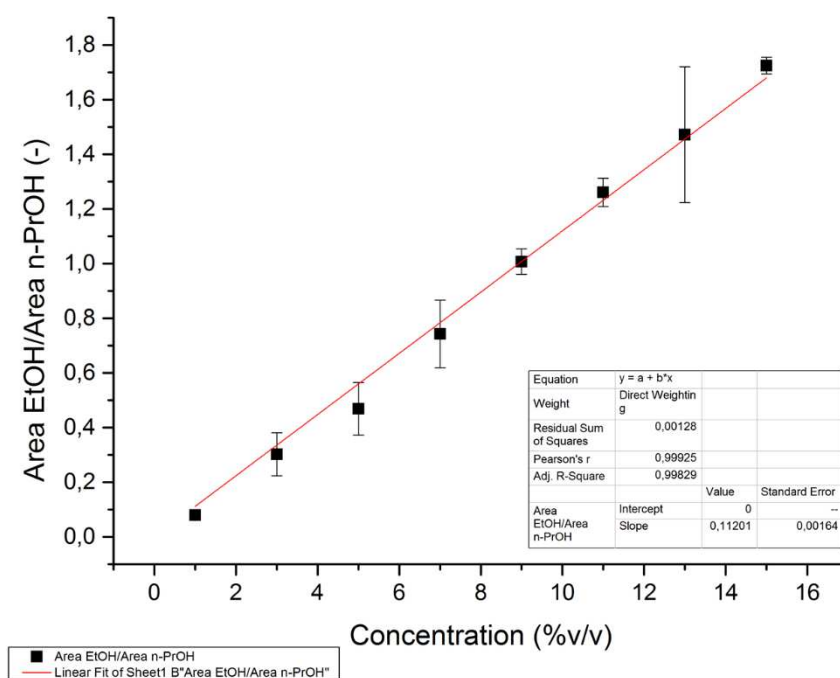
$$V_f = \frac{N_b \times V_i}{10^8}$$

Onde: V_f - volume final da suspensão; N_b – resultado da contagem em Neubauer; V_i – volume inicial da suspensão; e 10^8 – concentração final da suspensão.

2- Curva de calibração para as análises da concentração de etanol por cromatografia gasosa

A curva de calibração foi construída através da diluição de etanol P.A (V001641 VETEC, ACS reagent, 96%) em água destilada. Foram consideradas oito concentrações diferentes variando entre 1 a 16 % v/v, com intervalo de 2 % v/v entre cada fração analisada. Para a injeção no cromatógrafo gasoso, as soluções aquosas de etanol foram preparadas com a homogeneização com N-propanol e acetato de etila. O preparo foi realizado com a homogeneização de 100 μL da solução aquosa de etanol, 10 μL N-propanol e 800 μL de acetato de etila. Com injeção manual, a corrida foi realizada de acordo com os parâmetros descritos no tópico 2.1.5 do artigo. Todas as concentrações foram analisadas em triplicata.

A curva foi construída no software OriginPro 9.0.0. O gráfico foi construído considerando a média das triplicadas $\pm 3\sigma$ ($3\times$ desvio padrão). Para a projeção da reta foram considerados os desvios entre os dados e a interseção do eixo na origem (0;0). Foi aceita a reta com Pearson's r de 0,99925, R^2 de 0,99829. A inclinação da reta (slope) foi de 0,11201 com desvio padrão de 0,00164.



3- Tabelas com a relação das cepas flocculantes e as características fermentativas individuais

As tabelas estão apresentadas na ordem que segue:

Tabela 1. Relação das cepas flocculantes e da capacidade fermentativa das cepas provenientes da amostra de Fermento Caipira (CSC)

Tabela 2. Relação das cepas flocculantes e da capacidade fermentativa das cepas provenientes da amostra de Fermento sem Células Recicladas (SNR)

Tabela 3. Relação das cepas flocculantes e da capacidade fermentativa das cepas provenientes da amostra de Fermento Com Células Recicladas (SRC)

Tabela 4. Relação das cepas flocculantes e da capacidade fermentativa das cepas provenientes da amostra de Bagaço de Malte Cervejeiro (BSG).

Tabela 5. Relação das cepas flocculantes e da capacidade fermentativa das cepas industriais PE-2 e CAT-1 usadas como referencial fermentativo.

Nas tabelas o símbolo (+) representa que a característica descrita na coluna foi observada para a cepa descrita na linha. Os dados da variação de pH, consumo de substrato, aumento da concentração de células e da concentração final de etanol estão expressas pela média $\pm$ desvio padrão. As cepas marcadas com (*) estão entre as 10 melhores produtoras de etanol.

Fermento Caipira (CSC)		Formadoras de flocos	Baixo consumo (substrato)	FERMENTAÇÃO			
<i>Espécies</i>	Cepas			Δ pH	Δ Substrato (° Bx)	Δ [Célula] (log.mL ⁻¹)	Δ [EtOH] (% v/v)
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 1		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 2			1,18 ± 0,02	3,17 ± 0,68	2,19 ± 0,20	3,34 ± 0,23
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 3	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 4			1,23 ± 0,03	3,10 ± 1,04	2,17 ± 0,03	3,60 ± 0,051
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 5		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 6		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 7		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 8	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 10			1,21 ± 0,07	3,70 ± 0,52	2,15 ± 0,20	3,34 ± 0,08
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 11	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 12			1,21 ± 0,05	3,77 ± 0,12	1,80 ± 0,40	3,14 ± 0,22
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA CSC 13		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 14		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 15	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 16			1,21 ± 0,06	2,17 ± 0,29	2,16 ± 0,11	3,64 ± 0,16
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 17		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 18		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 19		+				
<i>P. manshurica</i>	LMQA CSC 20		+				
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 21		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 22		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 23		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 24	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 25		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 26	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 27			1,14 ± 0,02	2,03 ± 0,06	2,08 ± 0,05	3,28 ± 0,24
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 28		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 29		+				
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 30		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 31			1,18 ± 0,04	5,03 ± 0,15	2,04 ± 0,06	4,01 ± 0,17
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 32 *			1,20 ± 0,01	5,43 ± 0,21	2,06 ± 0,11	4,17 ± 0,16
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 33			1,14 ± 0,03	5,03 ± 0,32	1,99 ± 0,10	3,68 ± 0,16
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 34 *			1,19 ± 0,07	5,07 ± 0,32	2,00 ± 0,16	4,25 ± 0,20
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 35 *			1,16 ± 0,01	5,30 ± 0,17	2,01 ± 0,06	4,22 ± 0,36
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 36			1,17 ± 0,07	5,03 ± 0,58	2,05 ± 0,04	3,95 ± 0,25
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 37 *			1,22 ± 0,03	5,43 ± 0,47	2,10 ± 0,16	4,15 ± 0,29
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 38			1,05 ± 0,05	3,07 ± 0,23	2,16 ± 0,09	2,18 ± 0,10
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 39			1,18 ± 0,03	4,70 ± 0,20	1,93 ± 0,07	3,63 ± 0,06
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 41	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 42			1,19 ± 0,01	5,20 ± 0,00	2,07 ± 0,08	3,89 ± 0,18
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 43		+				
<i>W. anomalus</i>	LMQA CSC 44		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 46			1,17 ± 0,03	4,60 ± 0,44	2,31 ± 0,10	3,47 ± 0,19
<i>P. manshurica</i>	LMQA CSC 47		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 48	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 49			1,07 ± 0,04	4,10 ± 0,36	2,15 ± 0,06	3,07 ± 0,12
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 50			1,19 ± 0,06	4,87 ± 0,25	2,18 ± 0,09	3,58 ± 0,23
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA CSC 51			1,18 ± 0,05	4,87 ± 0,40	2,18 ± 0,11	3,71 ± 0,07
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 52		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 53		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA CSC 54		+				

Fermento sem células recicladas (SNR)		Formadora de flocos	Baixo consumo (substrato)	FERMENTAÇÃO			
<i>Espécies</i>	Cepas			Δ pH	Δ Substrato (° Bx)	Δ [Célula] (log,mL ⁻¹)	Δ [EtOH] (% v/v)
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 55			1,17 ± 0,05	4,37 ± 1,12	2,13 ± 0,09	3,83 ± 0,27
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SNR 56		+				
<i>P. manshurica</i>	LMQA SNR 58		+				
<i>P. manshurica</i>	LMQA SNR 60		+				
<i>P. manshurica</i>	LMQA SNR 62		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 63			1,15 ± 0,05	4,67 ± 0,21	2,32 ± 0,04	3,58 ± 0,04
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 64			1,08 ± 0,09	4,20 ± 0,20	2,10 ± 0,03	3,84 ± 0,11
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 65 *			1,25 ± 0,01	4,97 ± 0,06	2,09 ± 0,08	4,17 ± 0,13
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 66	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 67			1,12 ± 0,07	4,30 ± 0,17	2,02 ± 0,09	3,62 ± 0,10
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 68			1,13 ± 0,05	4,33 ± 0,12	2,10 ± 0,12	3,59 ± 0,25
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 69			1,26 ± 0,03	4,80 ± 0,10	1,99 ± 0,04	3,47 ± 0,17
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 70	+					
<i>W. anomalus</i>	LMQA SNR 71		+				
<i>C. aaseri</i>	LMQA SNR 73		+				
<i>C. pseudointermedia</i>	LMQA SNR 74	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 76		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 77			1,19 ± 0,04	4,47 ± 0,15	2,07 ± 0,14	3,96 ± 0,34
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 78			1,15 ± 0,02	4,37 ± 0,25	2,14 ± 0,12	3,61 ± 0,26
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 79			1,11 ± 0,05	4,47 ± 0,23	2,00 ± 0,04	3,26 ± 0,12
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 80			1,16 ± 0,04	4,60 ± 0,20	1,97 ± 0,12	2,88 ± 0,15
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 81			1,18 ± 0,06	5,76 ± 2,44	2,09 ± 0,12	3,42 ± 0,26
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 82			1,22 ± 0,03	4,60 ± 0,26	2,07 ± 0,23	3,82 ± 0,10
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 83			1,22 ± 0,03	5,07 ± 0,15	1,93 ± 0,28	4,05 ± 0,18
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 84			1,16 ± 0,07	2,87 ± 0,06	2,01 ± 0,11	1,63 ± 0,11
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 85	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 86		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 87			1,30 ± 0,04	3,17 ± 0,15	2,19 ± 0,18	2,24 ± 0,09
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 88			1,27 ± 0,03	2,43 ± 0,45	2,05 ± 0,08	1,64 ± 0,16
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 89			1,41 ± 0,05	3,70 ± 0,20	1,95 ± 0,28	2,61 ± 0,16
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SNR 90			1,53 ± 0,01	4,13 ± 0,15	2,09 ± 0,04	3,24 ± 0,13
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SNR 91		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 94			1,50 ± 0,02	3,97 ± 0,31	1,99 ± 0,08	2,91 ± 0,11
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SNR 95			1,37 ± 0,03	3,60 ± 0,10	2,14 ± 0,10	2,37 ± 0,01
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 96			1,42 ± 0,02	3,10 ± 0,10	2,12 ± 0,06	2,18 ± 0,09
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 97			1,49 ± 0,05	3,70 ± 0,20	2,09 ± 0,03	2,53 ± 0,12
<i>W. anomalus</i>	LMQA SNR 98			1,49 ± 0,01	3,80 ± 0,00	2,13 ± 0,03	2,74 ± 0,09
<i>W. anomalus</i>	LMQA SNR 99	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 100			1,39 ± 0,08	3,73 ± 0,31	2,10 ± 0,04	2,32 ± 0,10
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 103 *			1,21 ± 0,06	4,53 ± 1,22	2,11 ± 0,13	4,13 ± 0,35
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SNR 106			1,15 ± 0,05	4,27 ± 0,60	1,94 ± 0,26	3,53 ± 0,16

Fermento com células recicladas (SRC)		Formadoras de flocos	Baixo consumo (substrato)	FERMENTAÇÃO			
<i>Espécies</i>	Cepas			Δ pH	Δ Substrato (° Bx)	Δ [Célula] (log.mL ⁻¹)	Δ [EtOH] (% v/v)
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 107	+					
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 108		+				
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 109		+				
<i>C. intermedia</i>	LMQA SRC 110		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 111			1,00 ± 0,05	2,20 ± 0,10	2,26 ± 0,17	3,51 ± 0,07
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 112			1,08 ± 0,08	2,10 ± 1,04	2,19 ± 0,23	3,29 ± 0,14
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 116			1,23 ± 0,03	4,47 ± 0,76	2,11 ± 0,06	3,94 ± 0,11
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 117		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 118			1,04 ± 0,02	2,00 ± 0,10	2,04 ± 0,06	0,31 ± 0,02
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 122	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 123		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 124	+					
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 125			1,16 ± 0,05	2,83 ± 0,40	2,27 ± 0,19	3,82 ± 0,04
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 126		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 127			1,19 ± 0,02	2,77 ± 0,40	2,09 ± 0,11	3,69 ± 0,18
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 128	+					
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 130		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 131		+				
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 132		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 133 *			1,12 ± 0,05	4,40 ± 0,17	1,92 ± 0,70	4,12 ± 0,23
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 134		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 136		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 137	+					
<i>W. anomalus</i>	LMQA SRC 138		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA SRC 139		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 140			1,03 ± 0,07	3,77 ± 0,21	2,02 ± 0,07	3,08 ± 0,18
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 142 *			1,27 ± 0,02	5,23 ± 0,12	1,99 ± 0,06	4,31 ± 0,14
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 143 *			1,28 ± 0,03	5,80 ± 0,00	1,98 ± 0,02	4,47 ± 0,19
<i>T. delbruecki</i>	LMQA SRC 144		+				
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 146		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 147 *			1,27 ± 0,03	5,27 ± 0,06	2,05 ± 0,11	4,82 ± 0,24
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 148			0,84 ± 0,01	2,53 ± 0,06	2,19 ± 0,04	2,44 ± 0,17
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA SRC 149	+					
<i>C. parapsilosis</i>	LMQA SRC 150		+				

Bagaço de malte cervejeiro (BSG)		Formadoras de flocos	Baixo consumo (substrato)	FERMENTAÇÃO			
<i>Espécies</i>	Cepas			Δ pH	Δ Substrato (° Bx)	Δ [Célula] (log.mL ⁻¹)	Δ [EtOH] (% v/v)
<i>C. lusitaniae</i>	LMQA BSG 2		+				
<i>C. lusitaniae</i>	LMQA BSG 3		+				
<i>P. kudriavzevii</i>	LMQA BSG 4		+				
<i>S. cerevisiae</i>	LMQA BSG 5.1			1,14 ± 0,021	4,73 ± 0,153	2,26 ± 0,10	2,97 ± 0,04
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 6		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 6.1		+				
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 7			1,19 ± 0,026	5,2 ± 0,1	1,82 ± 0,15	3,54 ± 0,44
<i>T. delbrueckii</i>	LMQA BSG 8		+				

Cepas Industriais		Formadoras de flocos	Baixo consumo (Substrato)	FERMENTAÇÃO			
<i>Espécies</i>	Cepas			Δ pH	Δ Substrato (° Bx)	Δ [Célula] (log.mL ⁻¹)	Δ [EtOH] (% v/v)
S. cerevisiae	CAT 1			1,13 ± 0,06	5,30 ± 0,26	2,16 ± 0,07	4,26 ± 0,46
S. cerevisiae	PE 2			1,05 ± 0,05	5,00 ± 0,00	2,02 ± 0,10	4,21 ± 0,62

APÊNDICE - CAPÍTULO 5

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE CAUSADO PELA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA E RECICLO CELULAR SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* LMQA SRC 143 E PE-2

ASSESSMENT THE STRESS CAUSED BY BACTERIAL CONTAMINATION AND
CELL RECYCLING ON THE BIOETHANOL PRODUCTION AND CELL PHYSIOLOGY
IN YEASTS *Saccharomyces cerevisiae* LMQA SRC 143 AND PE-2

Materiais Suplementares - Apêndice - Apêndice

1- Preparo das soluções e dos corantes fluorescentes

Tampão Fosfato Salino (PBS): o tampão fosfato salino (PBS) 1× foi formulado de acordo com o Cold Spring Harb Protocol (2006). Todos os sais [8.0 g NaCl (Synth, Diadema, Brazil), 0.2 g KCl (Dinâmica, Diadema, Brazil), 1.42 g Na₂HPO₄·H₂O (Synth, Diadema, Brazil), 0.24 g KH₂PO₄ (Synth, Diadema, Brazil)] foram dissolvidos e homogeneizados em 800 mL de água deionizada. Em seguida o pH foi ajustado em 7.2 e o volume da solução completado até 1 litro em balão volumétrico.

Alaranjado de Acridina (AO): a solução stock de Acridine Orange (158550 Sigma-Aldrich) foi preparado na concentração de 5 g.L⁻¹ com água deionizada. A solução final foi preparada na razão de 2 mL.L⁻¹ de solução stock de AO em PBS.

Solução de Acriflavina: a solução stock de Acriflavine (A8126 Sigma-Aldrich) foi preparada com a dissolução completa de 0,5 g em 10 mL de Ácido Clorídrico (VETEC, Duque de Caxias, Brazil) 1M. A solução final foi preparada com a homogeneização de 1 mL da solução stock de Acriflavine em 9 mL de solução aquosa de sulfato de potássio (Synth, Diadema, Brazil) na concentração de 12,5 g.L⁻¹.

Fluoresceína diacetato (FDA): A solução stock de Fluorescein diacetate (F7378 Sigma-Aldrich) foi preparada em acetona (Anidrol, Diadema, Brazil) na concentração de 2 g.L⁻¹. A

solução final de FDA foi preparada com a homogeneização de 0,1 mL da solução stock em 10 mL de PBS.

A-fluorescein isothiocyanate (A-FITC): a solução de A-FITC protein (P5145 Sigma-Aldrich) foi preparada em PBS na concentração de 1 g.L⁻¹.

Somente o reagente Propidium iodide (P3566 Thermo Fisher Scientific) foi adquirido pronto para o uso.

2- Gráficos do estado fisiológico das células nos três diferentes tempos analisados

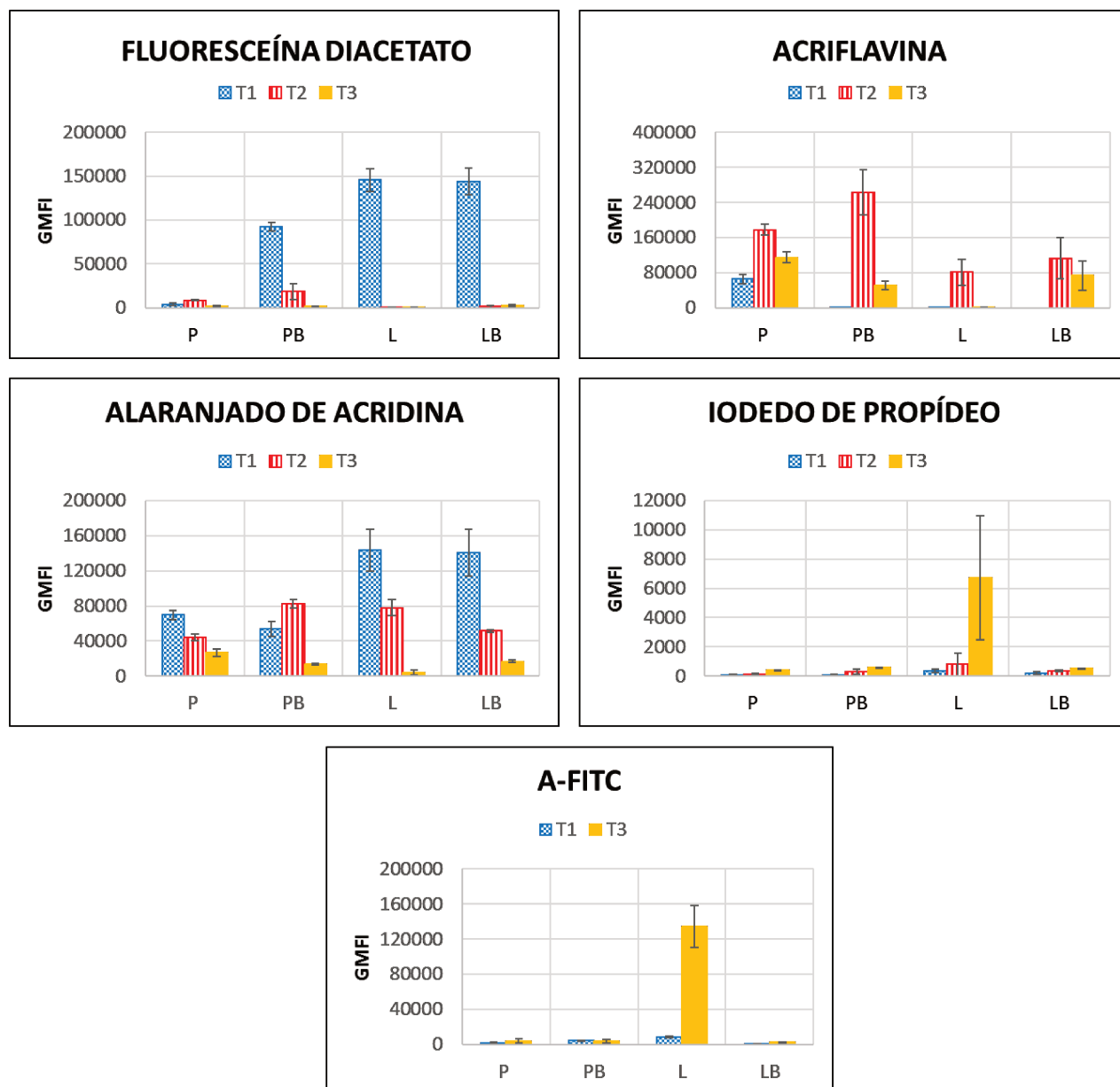


Figura 6- Os dados de fluoresceína diacetate, Acriflavine, A-FITC, Acridine Orange e Propidium iodide são apresentados pela média de GMFI (Média geométrica da Intensidade da fluorescência) $\pm$ desvio padrão.

ANEXOS

Permissão de uso dos artigos aceitos pelas revistas **Renewable and Sustainable Energy** e **Critical Reviews in Biotechnology**.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

May 24, 2017

This Agreement between Anderson S SantAna ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4115620518361
License date	May 24, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Renewable and Sustainable Energy Reviews
Licensed Content Title	Impact and significance of microbial contamination during fermentation for bioethanol production
Licensed Content Author	Ramon Peres Brexó, Anderson S. Sant'Ana
Licensed Content Date	Jun 1, 2017
Licensed Content Volume	73
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	12
Start Page	423
End Page	434
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	YEASTS FROM ARTISANAL CACHAÇA PROCESS AND BEER'S SPENT GRAINS: PHENOTYPICAL CHARACTERIZATION, ASSESSMENT OF INTERACTION WITH LACTIC ACID BACTERIA AND CELL RECYCLING ON YEAST'S CELL VITALITY AND BIOETHANOL PRODUCTION
Expected completion date	Jun 2017
Estimated size (number of pages)	250
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Anderson S SantAna Rua Monteiro Lobato, 80 Barao Geraldo Campinas, Sao Paulo 13083862 Brazil Attn: Anderson S SantAna
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and

their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been

peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional

private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full

details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

PUBLISHING AGREEMENT

This is an agreement under which you, the author, assign copyright in your article to Informa UK Limited registered in England under no. 1072954 trading as Taylor & Francis Group, Registered Office: 5 Howick Place, London, SW1P 1WG (hereinafter 'Taylor & Francis') to allow us to publish your article, including abstract, tables, figures, data, and supplemental material hosted by us, as the Version of Record (VoR) in the Journal for the full period of copyright throughout the world, in all forms and all media, subject to the Terms & Conditions below.

Article (the "Article") entitled:	Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role?
Article DOI:	10.1080/07388551.2017.1332570
Author(s):	Ramon Peres Brexo, Anderson de Souza Sant'Ana
To publish in the Journal:	Critical Reviews in Biotechnology
Journal ISSN:	1549-7801

STATEMENT OF ORIGINAL COPYRIGHT OWNERSHIP / CONDITIONS

In consideration of the publication of the Article, you hereby grant with full title guarantee all rights of copyright and related rights in the above specified Article as the Version of Scholarly Record which is intended for publication in all forms and all media (whether known at this time or developed at any time in the future) throughout the world, in all languages, for the full term of copyright, to take effect if and when the Article is accepted for publication in the Journal.

ASSIGNMENT OF PUBLISHING RIGHTS

I hereby assign Taylor & Francis with full title guarantee all rights of copyright and related publishing rights in my article, in all forms and all media (whether known at this time or developed at any time in the future) throughout the world, in all languages, where our rights include but are not limited to the right to translate, create adaptations, extracts, or derivative works and to sub-license such rights, for the full term of copyright (including all renewals and extensions of that term), to take effect if and when the article is accepted for publication. If a statement of government or corporate ownership appears above, that statement modifies this assignment as described.

I confirm that I have read and accept the full Terms & Conditions below including my author warranties, and have read and agree to comply with the Journal's policies on peer review and publishing ethics.

Signed and dated: **Anderson de Souza Sant'Ana, 17 May 2017**

Taylor and Francis, 17 May 2017

ASSIGNMENT OF COPYRIGHT: TERMS & CONDITIONS

DEFINITION

1. Your article is defined as comprising (a) your Accepted Manuscript (AM) in its final form; (b) the final, definitive, and citable Version of Record (VoR) including the abstract, text, bibliography, and all accompanying tables, illustrations, data, and media; and (c) any supplemental material hosted by Taylor & Francis. This assignment and these Terms & Conditions constitute the entire agreement and the sole understanding between you and us ('agreement'); no amendment, addendum, or other communication will be taken into account when interpreting your and our rights and obligations under this agreement, unless amended by a written document signed by both of us.

TAYLOR & FRANCIS' RESPONSIBILITIES

2. If deemed acceptable by the Editors of the Journal, we shall prepare and publish your article in the Journal. We may post your accepted manuscript in advance of the formal publication of the VoR. We reserve the right to make such editorial changes as may be necessary to make the article suitable for publication, or as we reasonably consider necessary to avoid infringing third-party rights or breaching any laws; and we reserve the right not to proceed with publication for whatever reason.
3. Taylor & Francis will deposit your Accepted Manuscript (AM) to any designated institutional repository including [PubMedCentral \(PMC\)](#) with which Taylor & Francis has an article deposit agreement; see 4 iv (a) below.

RIGHTS RETAINED BY YOU AS AUTHOR

4. These rights are personal to you, and your co-authors, and cannot be transferred by you to anyone else. Without prejudice to your rights as author set out below, you undertake that the fully reference-linked Version of Record (VOR) will not be published elsewhere without our prior written consent. You assert and retain the following rights as author(s):
 - i. The right to be identified as the author of your article, whenever and wherever the article is published, such rights including moral rights arising under § 77, Copyright, Designs & Patents Act 1988, and, so far as is legally possible, any corresponding rights we may have in any territory of the world.
 - ii. The right to retain patent rights, trademark rights, or rights to any process, product or procedure described in your article.
 - iii. The right to post and maintain at any time the Author's Original Manuscript (AOM; your manuscript in its original and unrefereed form; a 'preprint').
 - iv. The right to post at any time after publication of the VoR your AM (your manuscript in its revised after peer review and accepted for publication form; a 'postprint') as a digital file on your own personal or departmental website, provided that you do not use the VoR published by us, and that you include any amendments or deletions or warnings relating to the article issued or published by us; and with the acknowledgement: 'The Version of Record of this manuscript has been published and is available in <JOURNAL TITLE> <date of publication> <http://www.tandfonline.com> <Article DOI>'.
 - a. Please note that embargoes apply with respect to posting the AM to an institutional or subject repository. For further information, please see our list of journals with applicable embargo periods: [PDF](#) | [Excel](#). For the avoidance of doubt, you are not permitted to post the final published paper, the VoR published by us, to any site, unless it has been published as Open Access on our website.
 - b. If, following publication, you or your funder pay an Article Publishing Charge for [retrospective Open Access publication](#), you may then opt for one of three licenses: [CC BY](#), [CC BY-NC](#), or [CC BY-NC-ND](#); if you do not respond, we shall assign a CC BY licence. All rights in the article will revert to you as author.
 - v. The right to share with colleagues copies of the article in its published form as supplied to you by Taylor & Francis as a [digital eprint](#) or printed reprint on a non-commercial basis.
 - vi. The right to make printed copies of all or part of the article on a non-commercial basis for use by you for lecture or classroom purposes provided that such copies are not offered for sale or distributed in any systematic way, and provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is given.
 - vii. The right, if the article has been produced within the scope of your employment, for your employer to use all or part of the article internally within the institution or company on a non-commercial basis provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is given.
 - viii. The right to include the article in a thesis or dissertation that is not to be published commercially, provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is given.
 - ix. The right to present the article at a meeting or conference and to distribute printed copies of the article to the delegates attending the meeting provided that this is not for commercial purposes and provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is given.
 - x. The right to use the article in its published form in whole or in part without revision or modification in personal compilations, or other publications of your own work, provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is given.
 - xi. The right to expand your article into book-length form for publication provided that acknowledgement to prior publication in the Journal is made explicit (see below). Where permission is sought to re-use an article in a book chapter or edited collection on a commercial basis a fee will be due, payable by the publisher of the new work. Where you as the author of the article have had the lead role in the new work (i.e., you are the author of the new work or the editor of the edited collection), fees will be waived. Acknowledgement to prior publication in the Journal should be made explicit (see below):

Acknowledgement: This <chapter or book> is derived in part from an article published in <JOURNAL TITLE> <date of publication> <copyright Taylor & Francis>, available online: <http://www.tandfonline.com> <Article DOI>

If you wish to use your article in a way that is not permitted by this agreement, please contact permissionrequest@tandf.co.uk

WARRANTIES MADE BY YOU AS AUTHOR

5. You warrant that:
 - i. All persons who have a reasonable claim to authorship are named in the article as co-authors including yourself, and you have not

- fabricated or misappropriated anyone's identity, including your own.
- ii. You have been authorized by all such co-authors to sign this agreement as agent on their behalf, and to agree on their behalf the priority of the assertion of copyright and the order of names in the publication of the article.
 - iii. The article is your original work, apart from any permitted third-party copyright material you include, and does not infringe any intellectual property rights of any other person or entity and cannot be construed as plagiarizing any other published work, including your own published work.
 - iv. The article is not currently under submission to, nor is under consideration by, nor has been accepted by any other journal or publication, nor has been previously published by any other journal or publication, nor has been assigned or licensed by you to any third party.
 - v. The article contains no content that is abusive, defamatory, libelous, obscene, fraudulent, nor in any way infringes the rights of others, nor is in any other way unlawful or in violation of applicable laws.
 - vi. Research reported in the article has been conducted in an ethical and responsible manner, in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All articles which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section that such work was conducted with the formal approval of the local human subject or animal care committees, and that clinical trials have been registered as applicable legislation requires.
 - vii. Any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research or clinical experiment or study who is described in the article has given written consent to the inclusion of material, text or image, pertaining to themselves, and that they acknowledge that they cannot be identified via the article and that you have anonymized them and that you do not identify them in any way. Where such a person is deceased, you warrant you have obtained the written consent of the deceased person's family or estate.
 - viii. You have complied with all mandatory laboratory health and safety procedures in the course of conducting any experimental work reported in your article; your article contains all appropriate warnings concerning any specific and particular hazards that may be involved in carrying out experiments or procedures described in the article or involved in instructions, materials, or formulae in the article; your article includes explicitly relevant safety precautions; and cites, if an accepted Standard or Code of Practice is relevant, a reference to the relevant Standard or Code.
 - ix. You have acknowledged all sources of research funding, as required by your research funder, and disclosed any financial interest or benefit you have arising from the direct applications of your research.
 - x. You have obtained the [necessary written permission](#) to include material in your article that is owned and held in copyright by a third party, which shall include but is not limited to any proprietary text, illustration, table, or other material, including data, audio, video, film stills, screenshots, musical notation and any supplemental material.
 - xi. You have read and complied with our policy on [publishing ethics](#).
 - xii. You have read and complied with the Journal's Instructions for Authors.
 - xiii. You have read and complied with our guide on [peer review](#).
 - xiv. You will keep us and our affiliates indemnified in full against all loss, damages, injury, costs and expenses (including legal and other professional fees and expenses) awarded against or incurred or paid by us as a result of your breach of the warranties given in this agreement.
 - xv. You consent to allowing us to use your article for marketing and promotional purposes.

GOVERNING LAW

6. This agreement (and any dispute, proceeding, claim or controversy in relation to it) is subject to English law and the parties hereby submit to the exclusive jurisdiction of the Courts of England and Wales.